UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS

DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences, Technologies

Équipe Croissance et Métabolisme, Unité de Recherches Avicoles,

INRA, Nouzilly

THÈSE présentée par :

Sourour BOUSSAID-OM EZZINE

soutenue le : **11 Octobre 2011**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**
Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie

Adaptations environnementales de la protéosynthèse et de la protéolyse dans le muscle de poulet ;

voies de signalisation impliquées

THÈSE dirigée par :

Mme TESSERAUD Sophie	Directrice de Recherches, INRA, Nouzilly

RAPPORTEURS :

Mme GONDRET Florence	Chargée de Recherches (HDR), INRA, Rennes
Mr PANSERAT Stéphane	Directeur de Recherches, INRA, St Pée-sur-Nivelle

---

JURY :

Mr CHEVRIER Claude	Professeur, Université François Rabelais de Tours
Mme GONDRET Florence	Chargée de Recherches (HDR), INRA, Rennes
Mr PANSERAT Stéphane	Directeur de Recherches, INRA, St Pée-sur-Nivelle
Mme TESSERAUD Sophie	Directrice de Recherches, INRA, Nouzilly

Je dédie cette thèse

A LA MEMOIRE DE MON FRERE KACEM

Ton image demeure toujours présente à mon esprit. Tellement tu me manques.
Que le paradis soit ta céleste demeure.

A Mes CHERS PARENTS

Pour toutes les peines et tous les sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation. Vous m'avez appris à me battre jusqu'au bout pour réussir, je n'ai été guidée jusqu'à présent que par le désir de vous honorer.

A MON CHER HICHEM

Depuis le jour où je t'ai connu, ma vie est comblée de bonheur. Ta présence m'inspire la sérénité et la tranquillité de l'âme. Que dieu nous bénisse, protège notre amour et nous aide à réaliser tous nos rêves partagés.

A mon fils Jihed et ma fille Salma

Les plus beaux cadeaux de ma vie.

A ma belle famille

Qui a porté un grand intérêt à mes travaux de recherche.

A tous ceux qui me sont chers au cœur

Iskander, Nejia, Siraj, Sana, Ikram, Nour El Houda et Amal.

A mes proches amies : *Mouna, Mariam, Rafika, Manel & Kamla.*

Remerciements

Ce travail a été effectué à l'Unité de Recherches Avicoles (URA) de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Tours-Nouzilly France, dans l'équipe « Croissance et Métabolisme » dirigée par Sophie TESSERAUD. Il a pu être réalisé grâce à une bourse de thèse cofinancée par le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique en Tunisie et l'INRA.

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements à :

Monsieur Claude CHEVRIER, professeur à l'université, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Monsieur Stéphane PANSERAT et madame Florence GONDRET qui ont accepté la lourde tâche d'évaluer et de juger ce travail en qualité de rapporteurs.

Mes plus vifs remerciements s'adressent à Sophie TESSERAUD, pour son encadrement scientifique et sa disponibilité, malgré un emploi du temps assez chargé. Merci Sophie pour la rigueur scientifique que tu m'as enseignée, pour ta bonne humeur et surtout ta patience. Je ne suis pas certaine que des simples mots suffiront à te dire merci.

Je remercie chaleureusement Anne COLLIN pour ses grandes qualités humaines, pour ses connaissances scientifiques dont elle a su me faire profiter et pour son aide précieuse lors de la rédaction de l'étude bibliographique.

Je remercie également Sonia METAYER-COUSTARD et Nicole RIDEAU pour l'intérêt qu'elles ont témoigné envers notre travail et pour tous les conseils critiques lors de la rédaction des articles et du manuscrit de thèse.

Merci à Iban SEILIEZ pour m'avoir accueilli au sein de l'unité NuAGe de l'INRA de Saint Pée-sur-Nivelle et à Christiane VACHOT pour l'aide technique lors des mesures des activités protéosomales.

Je ne saurais oublier de remercier toutes les personnes de l'équipe Croissance et Métabolisme qui ont collaboré à ce travail et qui m'ont soutenu techniquement, notamment Sabine CROCHET que j'estime beaucoup. Heureusement que tu es là, Sabine, je ne t'oublierai jamais… Je pense aussi à Christophe PRAUD pour son aide lors de la culture cellulaire.

Merci à Aurélien BRIONNE de l'Équipe Fonction et Régulation des Protéines de l'œuf pour tous les échanges techniques et pour sa sympathie.

Un grand merci à Maamer JLALI pour sa grande patience et pour avoir toujours su me remonter le moral.

Enfin, je remercie tout spécialement ma famille et Hichem pour leur patience, leurs continuels encouragements et leur soutien sans faille.

Résumé

La synthèse et la dégradation des protéines, deux processus déterminant le dépôt protéique, sont régulées par des facteurs physiologiques, génétiques et environnementaux. Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié les mécanismes d'adaptation environnementale du métabolisme protéique au niveau du muscle *Pectoralis major* de poulet. Nous nous sommes intéressés à la régulation des voies de signalisation intracellulaire médiées par la protéine mTOR, la p70S6 kinase (S6K1) et la protéine ribosomale S6, qui contrôlent la phase d'initiation de la traduction. Nous avons également porté une attention particulière sur la régulation des expressions des ARNm de MuRF1 et d'atrogin-1, impliqués dans le contrôle de la protéolyse musculaire.

Notre premier modèle d'étude est une adaptation à long-terme suite à une exposition pendant une semaine à une température élevée (32°C *vs.* 22°C) qui entraîne chez le poulet de chair en finition une détérioration des performances de croissance. L'exposition à la chaleur et la diminution de l'ingéré associée modifient l'expression de quelques gènes impliqués dans le métabolisme énergétique (e.g. PGC-1α) et le métabolisme protéique (e.g. atrogin-1). Cependant, l'expression de nombreux gènes du métabolisme musculaire est inchangée. La protéine ribosomale S6 est légèrement moins activée par un traitement anabolique glucose et arginine à 32°C comparé à 22°C, ce qui pourrait indiquer une efficacité un peu moindre de la traduction des ARNm en protéines au chaud. De plus, la capacité de synthèse des protéines musculaires (Cs) est clairement réduite au chaud.

Le deuxième modèle d'étude est une adaptation à court-terme induite par une distribution séquentielle d'aliments variant en énergie et/ou en protéines. Les expressions de MuRF1 et atrogin-1 sont régulées par les variations du régime en protéines (P+ *vs.* P-) et en énergie (E+ *vs.* E-). Les régimes mixtes E-P+ et E+P- régulent l'expression d'atrogin-1 mais pas de MuRF1. L'effet important des variations d'apport en protéines sur atrogin-1 est cohérent avec les données *in vitro* montrant un contrôle de cet atrogène par les acides aminés (via mTOR). Dans nos conditions, la cascade de signalisation mTOR/S6K1/S6 est fortement activée par le régime riche en protéines P+ (*vs*. P-). Les variations d'atrogin-1 et des acteurs importants dans le contrôle de la protéosynthèse indiquent très probablement une régulation à court-terme de l'équilibre protéosynthèse/protéolyse par l'apport alimentaire.

Mots clés : Adaptation, métabolisme protéique, atrogin-1, muscle, poulet.

Résumé en anglais

Protein synthesis and degradation, two processes determining protein deposition, are controlled by physiological, genetic and environmental factors. In this PhD thesis, we studied the mechanisms involved in the environmental adaptation of protein metabolism in the *Pectoralis major* muscle of chickens. We explored the regulation of the mammalian target of rapamycin (mTOR)/p70S6 kinase (S6K1)/ribosomal protein S6 intracellular signaling cascade that mediates initiation of protein translation. We also focused our attention on the regulation of MuRF1 and atrogin-1 mRNA expressions, which control muscle proteolysis.

Our first experimental model was a long-term adaptation following one week exposure to a high ambient temperature (32°C *vs.* 22°C), which deteriorates growth performance in finishing broiler chickens. Both heat exposure and the associated reduction of feed intake modified the expression of some genes related to energy metabolism (e.g. PGC-1α) and protein metabolism (e.g. atrogin-1). However, the expression of many genes of muscle metabolism was unchanged. The ribosomal protein S6 was slightly less activated by an anabolic glucose and arginine treatment at 32°C compared to 22°C, suggesting a somewhat lower efficiency of mRNA translation into proteins under hot conditions. Moreover, the capacity for synthesis of muscle proteins (Cs) was clearly reduced by heat exposure.

The second experimental model was a short-term adaptation induced by sequential distribution of diets varying in energy and/or protein contents. The levels of atrogin-1 and MuRF1 mRNA were regulated by the alternation of diets varying in protein (P- *vs.* P+) and energy (E+ *vs.* E-). Within the mixed diet sequence (E+P- *vs.* E-P+), the expression of atrogin-1 was altered but not that of MuRF1. The particularly high effect of daily variations in protein levels on atrogin-1 expression was in agreement with data showing an *in vitro* control of this atrogene by amino acids (via mTOR). Under our conditions, the mTOR/S6K1/S6 signaling cascade was highly activated by the high protein diet P+ (*vs.* P -). The changes of atrogin-1 and key mediators controlling protein synthesis most probably indicate a short-term regulation of protein synthesis/proteolysis balance by dietary supply.

Key words: Adaptation, protein metabolism, atrogin-1, muscle, chickens.

Table des matières

Dédicace……..2

Remerciements 3

Résumé 5

Résumé en anglais 6

Table des matières 7

Liste des abrévaiations 12

Liste des tableaux 16

Liste des figures 17

Liste des annexes 20

Liste des publications 21

INTRODUCTION

Introduction 23

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Partie A. MUSCLE ET METABOLISME PROTEIQUE 25

I. Généralités 25

1. Organisation du muscle strié squelettique 25

2. Typologie des fibres musculaires 26

3. Généralités sur le métabolisme des protéines 28

II. Mécanismes du renouvellement protéique musculaire 28

1. La protéosynthèse 28

1.1. Contrôle traductionnel de la protéosynthèse 29

1.2. Initiation de la traduction 29

2. La protéolyse 32

2.1. La voie lysosomale 32

2.2. La voie Calcium-dépendante 34

2.3. La voie apoptotique via l'activité des caspases 35
2.4. La voie ubiquitine protéasome-dépendante 37
2.4.1. L'ubiquitinylation des protéines 37
2.4.2. Dégradation des conjugués polyubiquitinylés 37
2.4.2.1. Le protéasome 37
2.4.2.2. Activités protéolytiques du protéasome 38
2.4.3. E3 ubiquitines ligases 39
2.4.3.1. MuRF1 39
2.4.3.2. MAFbx/Atrogin-1 41
Partie B. REGULATION Hormonale et nutritionelle du Métabolisme Protéique 43
I. Généralités 43
1. Contrôle nutritionnel 43
1.1. Effet du repas 43
1.2. Effet du jeûne 44
1.3. Effet des apports alimentaires 44
2. Contrôle hormonal 45
II. L'insuline 46
1. Structure et sécrétion 46
2. Rôle de l'insuline 47
3. Signalisation de l'insuline 47
3.1. Récepteur à l'insuline 49
3.2. Substrats du récepteur à l'insuline IRS 49
3.3. Voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR 51
3.3.1. Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase (PI3K) 51
3.3.2. La protéine kinase B (Akt) 53
3.3.3. Akt régule les facteurs de transcription FoxO 55

3.3.4. TSC1/2 et Rheb 55

3.3.5. La protéine kinase mTOR 56

3.3.5.1. Le complexe mTORC1 58

3.3.5.2. Le complexe mTORC2 59

3.3.6. p70S6K et 4E-BP1 : Effecteurs de mTORC1 60

3.3.6.1. La protéine kinase p70S6K (S6K1) et sa cible la protéine ribosomale S6 60

3.3.6.2. La protéine 4E-BP1 62

3.3.7. MuRF1 et Atrogin-1 : cibles de FoxO et/ou mTOR 62

III. Régulation du métabolisme protéique par les acides aminés 63

1. Rôles des acides aminés 63

2. Rôle signal des acides aminés 64

2.1 Voie de signalisation impliquant mTOR 65

2.2. La voie de signalisation impliquant GCN2 68

3. Interaction entre les acides aminés et l'insuline au niveau des voies de signalisation cellulaires 70

Partie C. ADAPTATION CHEZ LE POULET : EXPOSITION A LA CHALEUR ET MODELE D'ALIMENTATION SEQUENTIELLE 71

I. Exposition à la chaleur 71

1. Performances et modifications physiologiques au chaud 71

1. Diminution des performances au chaud 71

2. Notion d'homéothermie et d'hyperthermie 73

3. Modifications de la dépense énergétique au chaud 73

3.1. Augmentation de la thermolyse 73

3.2. Diminution de la thermogenèse 74

3.3. Dépense énergétique et composition corporelle 75

2. Modifications métaboliques en climat chaud 76

2.1. Métabolisme glucidique 76

2.2. Métabolisme lipidique 77

2.3. Métabolisme protéique 78

2.3.1. Protéosynthèse et protéolyse 78

2.3.2. Protéines de choc thermique 78

2.4. Stress oxydant 79

II. Alimentation séquentielle 79

1. Objectif de l'alimentation séquentielle 80

2. Optimisation de la technique d'alimentation séquentielle 81

3. Adaptation métabolique 82

CONCLUSION & OBJECTIFS DE LA THESE 84

Materiels et méthodes

Expérience 1. Exposition chronique à la chaleur 86

1. Animaux et dispositif expérimental 86

2. Choix expérimentaux 86

3. Mesures effectuées 88

4. Limites de l'étude réalisée 89

4.1. Sensibilité à l'insuline au chaud ? 89

4.2. Transporteurs du glucose chez le poulet ? 89

Expérience 2. Alimentation séquentielle 91

1. Animaux et dispositif expérimental 91

2. Choix expérimentaux 92

3. Mesures effectuées 93

4. Limites de l'étude réalisée 94

RESULTATS & DISCUSSIONS

Avant-propos 95

Résumé publication 1 96

Publication n°1 97

I. Principaux résultats 104

II. Résultats complémentaires 105

III. Discussion 106

Résumé publication 2 111

Publication n°2 112

I. Principaux résultats 125

II. Résultats complémentaires 126

III. Discussion 130

DISCUSSION GENERALE-CONCLUSION & PERSPECTIVES

I. Signalisation intracellulaire 136

II. Protéolyse musculaire 139

III. Adaptation métabolique 142

1. Métabolisme protéique 142

2. Autres modifications physiologiques 143

3. Importance du facteur temps 144

4. Conséquences en termes de stratégies nutritionnelles et/ou pratiques d'élevage 146

BIBLIOGRAPHIE 149

ANNEXES

Annexe 1 175

Annexe 2 .....

Annexe 3 .....

Résumé .....

Résumé en anglais .....

Listes des abréviations

AARE : Amino Acid Response Element
Akt : Protein Kinase B (PKB)
APC : Anaphase Promoting Complex
ARNm : ARN messager
ARNr : ARN ribosomal
ARNt : ARN de transfert
ATF4 : Activating Transcription Factor 4
Atg : Autophagy specific Gene
avUCP : avian Uncoupling Protein
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
BRAAP : Branched Amino Acid Peptidase
CaM : Calmodulin
Caspase-1 : Cysteinyl-Aspartate-cleaving proteases
CBC : Cullin2-elongine B-elongine C
Cdc42 : Cell division cycle 42
CIT : Complexe d'Initiation de la Traduction
CSS1 : Calpain Small Subunit 1
Cul1 : Cullin-1
Deptor : DEP-Domain-Containing TOR-interacting Protein
E1 : Ubiquitin-activating enzyme
E2 : Ubiquitin-conjugating enzyme
E3 : Ubiquitin ligase
4E-BP1 : eIF4E Binding Protein 1
eEF : eukaryotic Elongation Factor
eIF : eukaryotic Initiation Factor
FAT : FRAP ATM TRRAP
FATC : FAT C terminus
FKBP12 : FK506-Binding Protein 12
FKBP38 : FK506 Binding Protein 38
FKHR : Forkhead Homolog in Rhabdmyosarcoma
FoxO : Forkhead box Other class

FRAP : FKBP-RAP Associated Protein
FRB : FKBP12 Rapamycin Binding Domain
FTG : Fast Twitch Glycolytique
FTOG : Fast Twitch Oxydo-Glycolytic
GβL : G protein β -Subunit-Like Protein
GCN2 : General Control Nonrepressed 2
GDP : Guanosine Diphosphate
GPCR : G Proteine Coupled Receptors
GS : Glycogen Synthase
GSK-3 : Glycogen Synthase kinase 3
GTP : Guanosine Triphosphate
GTPasique : GAP, GTPase Activating Protein
HECT : Homologous to E6-AP-Carboxy-Terminus
HRI : Heme-Regulated Inhibitor
HSP : Heat Shock Protein
ICE : Interleukin-1-β Converting Enzyme
IGF-1 : Insulin-like growth factor 1
IRES : Internal Ribosome Entry Site
IRS : Insulin Receptor Substrate
LCD : Leucine-Charged residue-rich Domain
LMH : Leghorn Male Hepatoma
LZ : Leucine Zipper
MAFbx/Atrogin-1 : Muscle Atrophy F-box /Atrophy gene-1
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MAP4K3 : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase Kinase 3
MAPKSP1 : Mitogen-activated protein kinase scaffold protein 1
m^7GTP : 7-methylguanosine 5'-triphosphate
MIP1 : MEKK2 Interacting Protein 1
mLST8 : Mammalian Lethal with Sec 13 protein 8
Mov34/MPN : Mpr1/Pad1 N-terminal
mSIN : mammalian Stress-activated protein kinase [SAPK]-Interacting protein
mTOR : mammalian Target of Rapamycin
mTORC1 : mTOR Complex 1
mTORC2 : mTOR Complex 2

MuRF1 : Muscle Specific Ring Finger 1

MyoD : Myogenic Determinant factor 1

NLS : Nuclear Localization Signal

$p90^{rsk}$: 90 kDa ribosomale S6 kinase

PERK : PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase

PDK1 : 3-Phosphoinositide Dependent protein Kinase-1

PGC-1α : Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1α

PH : Pleckstrin Homology

PHAS-1 : Protein Heat and Acid Stable-1

PI3K : Phosphoinositol 3-Kinase

PIKK : Phosphatidylinositol 3-Kinase-related protein Kinase

PIPs : Phosphatidylinositol Phosphates

$PI(3,4)P_2$: Phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate

$PI(3,4,5)P_3$: Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate

PKR : Protein kinase R

PLD1 : Phospholipase D1

PPARγ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ

PRAS40 : Proline-Rich Akt Substrate 40

PRR5 : Proline Rich protein 5

PTB : Phosphotyrosine Binding domain

RAFT1 : RAP FKBP12 Target

Rag-GTPases : Ras-related GTPase

RAPT1 : RAP Target

Raptor : Regulatory-Associated Protein of TOR

RD : Repressor Domain

RF : Releasing Factor

Rheb : Ras Homolog Enriched in Brain

RI : Récepteur à l'insuline

Rictor : Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR

RING-finger : Really Interesting New Gene

ROBLD3 : Roadblock Domain containing 3

ROS : Reactive Oxygen Species

RTK : Receptor Tyrosine Kinases

S6 : Ribosomal protein S6

S6K1	: p70 ribosomal protein S6 kinase 1
SCF	: Skp1-Cullin-F-box
Shc	: Src homology and collagen protein
SNAAP	: Small Neutral AA Peptidase
Skp1	: S phase Kinase-associated Protein 1
STO	: Slow Twitch Oxidative
Ta	: Température ambiante
T3	: Triiodothyronine
T4	: Thyroxine
TSC	: Tuberous Sclerosis Protein
TOS	: TOR Signalling
Ub	: Ubiquitine
UBC	: Ubiquitin Carrier Protein
UBP	: Ubiquitin-specific Proteases
UCH	: Ubiquitin C-terminal Hydrolases
uORFs	: upstream Open Reading Frame
5’UTR	: 5' Untranslated Region
VLDL	: Very Low Density Lipoprotein
Vps34	: Vacuolar protein-sorting-associated protein 34

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des différents types de fibres musculaires chez les volailles et le porc 26

Tableau 2 : Pourcentages de types de fibres musculaires dans le muscle *Pectoralis major* du poulet et de la dinde 26

Tableau 3 : Les différents facteurs d'initiation impliqués dans l'initiation de la traduction…… 29

Tableau 4 : Nomenclature internationale des calpaïnes chez les mammifères 34

Tableau 5 : Concentrations plasmatiques d'insuline, triiodothyronine (T_3), thyroxine (T_4) et corticostérone 74

Tableau 6 : Composition et caractéristiques théoriques des aliments expérimentaux 91

Tableau 7 : Effet de l'alimentation séquentielle (cycles de 48 heures) avec des aliments variant à la fois en protéines et en énergie sur l'expression des gènes impliqués dans la protéolyse au niveau du muscle *Pectoralis major* de poulets de 14 à 15 jours d'âge 126

Tableau 8 : Protocole de production des anticorps anti-eIF3f 129

Liste des figures

Figure 1. Anatomie du muscle squelettique au niveau macroscopique et microscopique….. 25
Figure 2. Schéma général du métabolisme protéique chez un homme adulte 28
Figure 3. Processus de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes 31
Figure 4. Modèle d'interaction entre eIF3 et mTOR, S6K1 et eIF4B..... 32
Figure 5. Cathepsines à cystéine. (A) Phylogénie et nomenclature des cathepsines (B) Structure et synthèse des cathepsines..... 33
Figure 6. Structure de la μ- et de la m-calpaïne 35
Figure 7. Structure et activation des caspases 36
Figure 8. Ubiquitinylation des protéines ciblées par le protéasome..... 37
Figure 9. Assemblage du protéasome 26S 38
Figure 10. Organisation et rôles du protéasome 19S..... 38
Figure 11. Représentation schématique des E3 ubiquitines ligases: (A) MuRF1; (B) MAFbx/Atrogin-1 40
Figure 12. (A) : Schéma représentatif de l'organisation de la titine dans le sarcomère (B) : Interaction de MuRF1 et la titine 41
Figure 13. MAFbx interagit avec eIF3f..... 42
Figure 14. Représentation schématique du renouvellement protéique..... 43
Figure 15. Effet du repas sur la balance azotée musculaire 43
Figure 16. Schéma représentatif de la synthèse et la structure de l'insuline..... 46
Figure 17. Effets pléïotropes de l'insuline 47
Figure 18. (A) Structure du récepteur de l'insuline et (B) interaction avec son substrat IRS1/2. 49
Figure 19. Structure de substrat du récepteur à l'insuline, IRS-1 et sesdifférents sites de phosphorylation..... 50
Figure 20. Classification des membres de la famille des phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) 51
Figure 21. Représentation schématique de la structure et de l'activation d'Akt..... 53
Figure 22. Représentation schématique de la structure de mTOR..... 57
Figure 23. Représentation schématique de la structure des complexes mTORC1 et mTORC2… 58

Figure 24. Domaines et sites de phosphorylation de S6K1 et S6K2 61
Figure 25. Représentation schématique de la voie de régulation de mTORC1 65
Figure 26. Translocation Rag-dépendante de mTORC1 en réponse à une stimulation par les acides aminés 67
Figure 27. Rôle du complexe Ragulator-Rag dans l'activation de mTORC1 par les acides aminés 68
Figure 28. Voie de réponse au stress et aux déficits en acides aminés impliquant la protéine kinase GCN2 69
Figure 29. Voies de signalisation du contrôle de la synthèse et la dégradation des protéines par les acides aminés et l'insuline 70
Figure 30. Rétrocontrôle négatif des acides aminés sur la voie de signalisation de l'insuline : phosphorylation d'IRS1 sur résidus sérine par les kinases TOR et S6K1 71
Figure 31. Effets des hormones thyroïdiennes (T2, T3 et T4) 75
Figure 32. Représentation schématique du modèle expérimental d'exposition d'une semaine à la chaleur 86
Figure 33. Protocole d'alimentation séquentielle (AS) 92
Figure 34. Niveaux de phosphorylation de S6K1 sur Thr389 et Thr421/Ser424 au niveau du muscle pectoral (*Pectoralis major*) de poulets à 5 semaines d'âge 105
Figure 35. Niveaux de phosphorylation de la protéine ribosomale S6 au niveau du muscle pectoral (*Pectoralis major*) de poulets à 5 semaines d'âge 105
Figure 36. Niveaux de phosphorylation d'Akt et de GSK3 au niveau du muscle pectoral (*Pectoralis major*) de poulets à 5 semaines d'âge 105
Figure 37. Niveaux d'expression de deux isoformes de chaînes lourdes de myosine (MyHC) (A) et de β-actine (B) au niveau du muscle pectoral (*Pectoralis major*) de poulets à 5 semaines d'âge 106
Figure 38. Effets des changements journaliers des teneurs du régime en énergie et/ou protéines sur la quantité des protéines polyubiquitinylées dans le muscle *Pectoralis major* de poulets à 14-15 j d'âge 126
Figure 39. Comparaison de la séquence de eIF3f de poulet avec différentes espèces 127
Figure 40. (A) Représentation schématique des résidus lysine de eIF3f, résidus responsables de son ubiquitinylation. (B) Rôle d'échafaudage du facteur eIF3f et implication dans le contrôle de la protéosynthèse 128

Figure 41. Structure tridimensionnelle de la protéine eIF3f et choix des peptides pour la production d'anticorps..... 128
Figure 42. Régulation et rôle de eIF3f dans le contrôle de l'équilibre protéosynthèse/protéolyse 133
Figure 43. Voies de signalisation AMPK et GSK3 impliquées dans le métabolisme du glycogène 134
Figure 44. Régulation des niveaux de phosphorylation de p-AMPK et de p-GS ainsi que la teneur en glycogène par l'alimentation séquentielle 134

Liste des annexes

Annexe 1. Daily Variations in Dietary Protein and Energy Content Regulate Protein Metabolism in Chicken Skeletal Muscle. Communication orale au congrès *XIIIth European Poultry Conference*, August 23-27, 2010 (EPC 2010).

Annexe 2. Insulin and amino acid availability regulate atrogin-1 in avian QT6 cells (Article, *Biochem Biophys Res Commun*, 25 ; 357(1):181-186, 2007).

Annexe 3. Manipulating Tissue Metabolism by Amino Acids (Review, *World's Poult Sci J,* 67: 243-252, 2011).

Liste des publications

- **Articles scientifiques publiés** (revues avec comité de lecture)

Tesseraud, S., Métayer-Coustard, S., **Boussaid, S**., Crochet, S., Audouin, E., Derouet, M., Seiliez, I. Insulin and amino acid availability regulate atrogin-1 in avian QT6 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 357:181-186.

Boussaid-Om Ezzine, **S**., Everaert, N., Métayer Coustard, S., Rideau N., Berri, C., Joubert, R., Temim, S., Collin, A., Tesseraud, S. Effects of heat exposure on Akt/S6K1 signaling and expression of genes related to protein and energy metabolism in chicken (Gallus gallus) Pectoralis major muscle. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* - Part B, 2010, 157 (3):281-287.

Boussaid-Om Ezzine, S., Métayer-Coustard, S., Collin, A., Rideau, N., Leterrier, C., Bouvarel, I., Seiliez, I., Tesseraud, S. Regulators of protein metabolism are affected by cyclical nutritional treatments with diets varying in protein and energy content. (Accepté dans *J Nutr Biochem, Septembre 2011*).

Tesseraud, S., Everaert, N., **Boussaid-Om Ezzine**, **S**., Collin, A., Métayer-Coustard, S., Berri, C. Manipulating tissue metabolism by amino acids. *World's Poult Sci J*, 2011, 67:243-252.

- **Communications à des congrès ou journées scientifiques**

Boussaid, **S**. Adaptations environnementales du métabolisme : Exposition à la chaleur et signalisation de l'insuline au niveau du muscle pectoral du poulet de chair. In: 9ème Journée "Thésards" de l'Unité Recherches Avicoles; Nouzilly (FRA); 2008/04/13, 1 p. INRA, Unité de Recherches Avicoles, Nouzilly (FRA). (Communication orale).

Boussaid, **S**. & Tesseraud, S. Des poulets de chair exposés à la chaleur présentent-ils une modification de régulation de la voie PKB/S6K1 au niveau du muscle pectoral ? In: Forum de l'Ecole Doctorale "Santé, Sciences, Technologies", Université François Rabelais; Tours (FRA); 2008/06/12. (Résumé) (Communication orale).

Boussaid, **S**., Métayer-Coustard, S., Rideau, N., Collin, A., Tesseraud, S. Does chronic heat exposure alter the regulation of the PKB/S6K1 pathway in chicken skeletal muscles? In: 9th

International Symposium on Avian Endocrinology; Leuven (BEL); 2008/07/11-15. (Résumé) (Poster).

Tesseraud, S., **Boussaid**, **S**., Bouvarel, I., Métayer-Coustard, S., Collin, A., Seiliez, I., Leterrier, C. L'expression de MuRF1 et Atrogin-1 dans le muscle pectoral du poulet est régulée par les modifications journalières des apports en lysine ou en protéines/énergie. In : 7èmes Journées Francophones de Nutrition ; Breast (FRA) ; 2008/11/26-28. (Résumé) (Poster).

Métayer-Coustard, S., Collin, A., Chagneau, AM., Mameri, H., **Boussaid, S.**, Joubert, R., Crochet, S., Audouin, E., Berri, C., Bouvarel, I., Lescoat, P., Tesseraud, S. Impact des variations alimentaires sur le statut métabolique et la qualité de la viande de poulet : Recherches des mécanismes d'adaptation. In : Crédits Incitatifs PHASE ; Tours (FRA) ; 2008/11/26-27. (Résumé) (Poster).

Boussaid-OM Ezzine, S. 2009. Mécanismes d'adaptation environnementale de la protéosynthèse et de la protéolyse chez le poulet de chair : voies de signalisation impliquées. In: 10ème Journée "Thésards" de l'Unité Recherches Avicoles; Nouzilly (FRA); 2009/05/07, 1 p. INRA, Unité de Recherches Avicoles, Nouzilly (FRA). (Communication orale).

Boussaid-Om Ezzine, **S**., Mameri, H., Métayer-Coustard, S., Collin, A., Cailleau-Audouin, E., Crochet, S., Chagneau, A.M., Bouvarel, I., Seiliez, I., Leterrier, C., Tesseraud, S. Daily Variations in Dietary Protein and Energy Content Regulate Protein Metabolism in Chicken Skeletal Muscle. In XIIIth European Poultry Conference. Tours (France) (Abstract accepted), 2010/08/23-27 (Oral Communication).

Tesseraud, S., Everaert, N., **Boussaid-Om Ezzine**, **S**., Collin, A., Métayer-Coustard, S., Berri, C. Manipulating tissue metabolism by amino acids. In XIIIth European Poultry Conference. Tours (France) (Abstract accepted), 2010/08/23-27 (Oral Communication).

INTRODUCTION

Introduction

La croissance musculaire est conditionnée par différentes voies métaboliques (métabolisme protéique, énergétique et/ou glucidique) qui sont toutes étroitement connectées, avec des acteurs ou des régulateurs communs (e.g. protéines kinases, hormones…). Dans ce travail de thèse, nous avons focalisé notre attention sur le métabolisme protéique en ciblant en particulier l'équilibre protéosynthèse/protéolyse au niveau du muscle pectoral du poulet. La synthèse et la dégradation des protéines sont régulées par des facteurs physiologiques, génétiques et environnementaux. La régulation nutritionnelle du métabolisme protéique implique les nutriments eux-mêmes (acides aminés, glucose…) mais aussi les hormones, en particulier l'hormone anabolique qu'est l'insuline. Au niveau cellulaire, le signal induit par l'insuline est médié par l'activation des kinases intracellulaires et de leurs effecteurs. De même les acides aminés agissent comme des « nutriments signal », en régulant l'activité de protéines kinases intracellulaires. Cependant, les mécanismes de régulations sont complexes, d'autant plus si le facteur temps (régulation à court et long-terme du métabolisme) et les facteurs environnementaux (température ambiante, apports alimentaires…) sont pris en compte. Ce travail de thèse doit donc permettre de mieux connaître les mécanismes de régulation de l'équilibre synthèse/dégradation des protéines afin de maîtriser le dépôt protéique musculaire quelles que soient les conditions environnementales, y compris les critiques.

Les températures ambiantes élevées réduisent la croissance des poulets. Les oiseaux sont en effet des homéothermes, ce qui signifie qu'ils sont capables de maintenir une température interne quasi constante et pour cela les pertes de chaleur doivent être égales à la quantité de chaleur produite. Or, l'ingestion et l'utilisation métabolique de l'aliment entraînent une augmentation de la chaleur. Ainsi, la production de chaleur doit diminuer par réduction de l'ingéré alimentaire. De nombreux auteurs ont rapporté une diminution de la consommation au chaud qui n'explique toutefois pas la totalité de la réduction de la croissance. Il existe un effet propre de la chaleur sur l'utilisation métabolique de l'aliment qui se traduit par une réduction de la croissance, une baisse de la rétention azotée et une baisse du dépôt protéique musculaire. Nous avons voulu étudier l'impact de la chaleur sur les voies de signalisation et l'expression des gènes impliquées dans le métabolisme protéino-énergétique. Ce modèle d'étude est intéressant dans la mesure où il permet de dégager l'effet à long-terme de la température ambiante sur les performances de croissance et sur les voies métaboliques.

De façon intéressante, l'exposition prolongée à la chaleur comparée à un coup de chaleur, provoque des changements relativement faibles sur une assez longue période jusqu'à atteindre un nouvel équilibre (homéostasie) qui permet à l'animal de s'adapter à son nouvel environnement. Ce modèle d'exposition prolongée à la chaleur doit générer des connaissances sur les mécanismes d'adaptation métaboliques au chaud.

Les variations à cout-terme du métabolisme protéino-énergétique du poulet de chair en fonction de l'aliment consommé sont également mal connus. C'est pourquoi nous avons utilisé un deuxième modèle, l'alimentation séquentielle avec des variations un jour sur deux (cycles de 48h) de la teneur de l'aliment en protéines et/ou en énergie. Ce modèle vise à comprendre les mécanismes d'adaptation du poulet à des variations d'apport alimentaire afin de mieux optimiser les différents apports en protéines et en énergie au cours du temps. Plus précisément, nous avons examiné les variations des voies de signalisation ainsi que l'expression de certains gènes contrôlant le métabolisme protéique musculaire en fonction de l'aliment consommé.

À travers ces deux modèles d'étude, nous avons exploré l'expression des gènes MuRF1 et atrogin-1, impliqués dans le contrôle de la protéolyse musculaire. Ces E3-ubiquitine ligases appelées atrogènes sont sur-exprimées dans des conditions atrophiques. Elles sont impliquées dans l'ubiquitinylation des protéines destinées à la dégradation protéasomale et leur régulation met en jeu des voies de signalisation stimulées par les hormones insuline et IGF-1. Les acides aminés régulent aussi l'expression de atrogin-1, au moins *in vitro* . L'effet de la nutrition et de la température ambiante de MuRF1 et atrogin-1 restant peu connu, notre objectif a été d'analyser la régulation de leur expression et d'approfondir les mécanismes sous-jacents.

C'est dans ce cadre précis que je me suis proposé de présenter en première approche une étude bibliographique résumant les connaissances sur les mécanismes impliqués dans la régulation nutritionnelle et hormonale du métabolisme protéique chez les mammifères tout en insistant sur les particularités du modèle aviaire. Les protocoles utilisés dans notre travail expérimental sont décrits puis les principaux résultats et les résultats complémentaires sont présentés et discutés. Dans la dernière partie, nous faisons le point des idées acquises au cours de cette thèse et présentons les perspectives qui en découlent.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

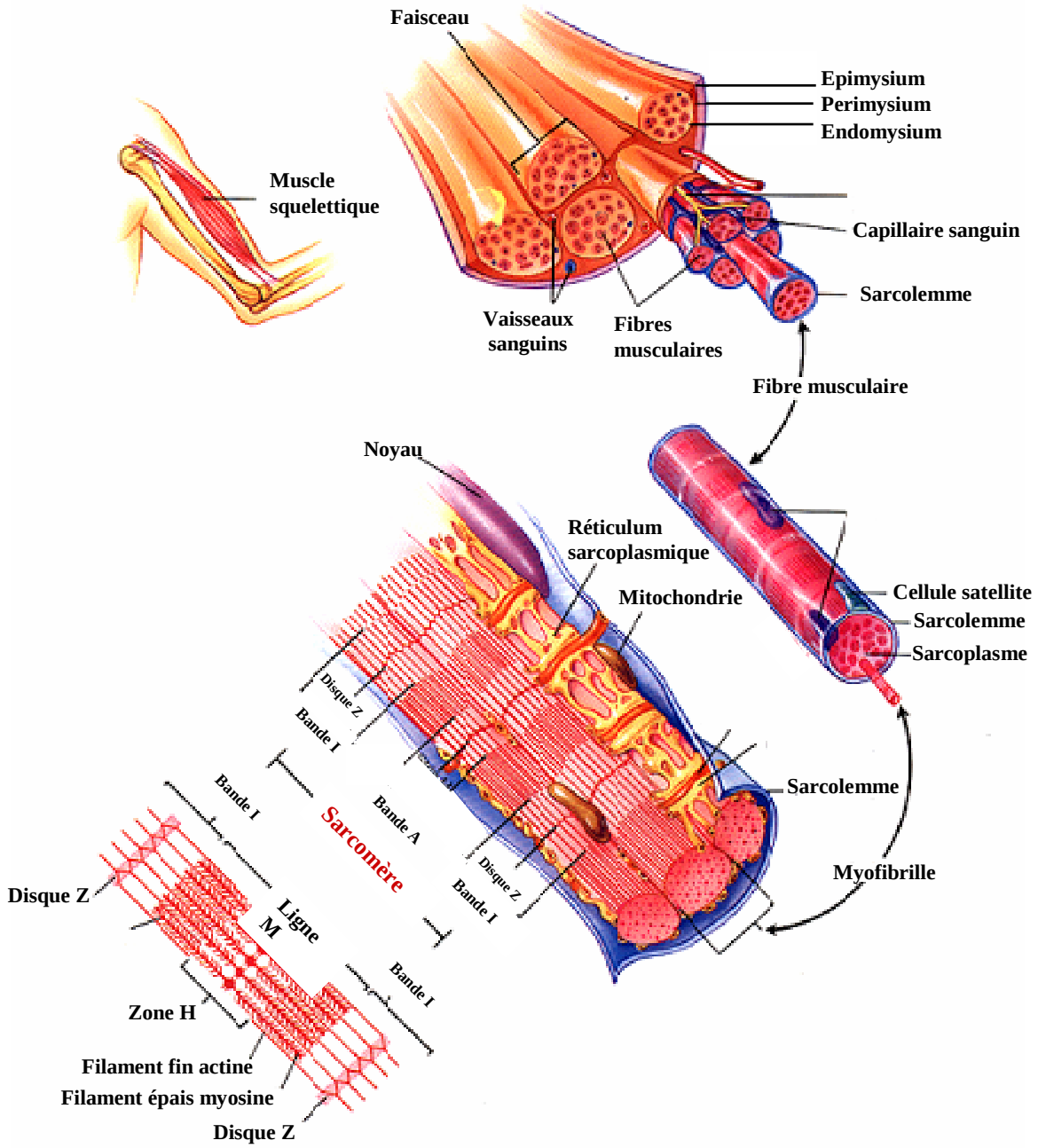


Figure 1. Anatomie du muscle squelettique au niveau macroscopique et microscopique (d'après Tortora et al., 1994).

Partie A. MUSCLE ET METABOLISME PROTEIQUE

I. Généralités

1. Organisation du muscle strié squelettique

Le muscle squelettique est un tissu constitué de cellules allongées et de forme cylindrique nommées fibres musculaires. Leur fixation sur les os se fait par l'intermédiaire de tendons constitués par le prolongement des gaines conjonctives : l'endomysisum entoure chaque fibre musculaire, le périmysium assemble les différentes fibres musculaires en faisceau de fibres musculaires et l'épimysium recouvre l'ensemble du muscle (**Figure 1**). Ce tissu confère au muscle une certaine élasticité. Par ailleurs, le muscle strié squelettique contient un réseau complexe de nerfs permettant l'innervation sensitive et motrice et de vaisseaux sanguins assurant l'irrigation (pour revue Sandow, 1970). La fibre musculaire présente une striation caractéristique due à la présence de myofibrilles arrangées entre elles. Les myofibrilles sont constituées de sarcomères placés en série. Les sarcomères ont une longueur constante. En effet, l'accroissement en longueur d'un muscle se faisant par formation de nouveaux sarcomères. L'apparence en microscopie électronique des sarcomères révèle une striation transversale due à l'alternance de bandes claires (ou I pour isotropes) et sombres (ou A pour anisotropes). Les bandes I et A présentent, en leur milieu respectif, le disque Z et la ligne M (Luther, 2009) (**Figure 1**). Le sarcomère est composé de deux sortes de filaments : les filaments fins constitués d'actine associés à de la tropomyosine et de la troponine, et filaments épais constitués de myosine (pour revue Clark et al., 2002).

- Les filaments d'actine sont les composantes principales des bandes I (filaments minces) et s'étendent jusqu'aux bandes A. Ils sont reliés à la titine dans le disque Z via la protéine α-actinine. Signalons que la titine est la plus grosse protéine à l'état naturel. Elle joue un rôle structural majeur au niveau du sarcomère, pour son assemblage et le maintien de sa structure.

- Les filaments de myosine (filaments épais) sont localisés au milieu du sarcomère au niveau de la bande A et se superposent dans la ligne M (au centre du sarcomère). Ils sont liés à ce niveau à la titine via les protéines myomésines et protéines M.

Tableau 1 : Caractéristiques des différents types de fibres musculaires chez les mammifères (Bacou & Vigneron, 1976).

	Type de fibres		
Nomenclature			
Brooke & Kaiser, 1970	I	IIA	IIB
Ashmore & Doerr, 1971	βR	αR	αW
Peter et al., 1972	SO	FOG	FG
Physiologie			
Contraction	Lente	Rapide	Rapide
Résistance à la fatigue	+++	++	+
Morphologie			
Couleur	Rouge	Rouge	Blanche
Myoglobine	+++	+++	+
Densité capillaire	+++	++	+
Nombre de mitochondries	+++	+++	+
Épaisseur de la strie Z	+++	++	+
Richesse en collagène	+++	++	++
Aire de section	+	+++	+++
Métabolisme énergétique			
Teneur en Glycogène	+	+++	+++
Teneur en Lipides	+++	+++	+
ATPase myofibrillaire	+	+++	+++
Enzymes glycolytiques	+	++	+++
Enzymes mitochondriales	+++	++	+

Tableau 2 : Nomenclatures des types de fibres musculaires chez les oiseaux (Berri & Duclos, 2003).

Type selon Ashmore & Doerr (1971)	αw	αr’	βr	β’	α
Type selon Barnard et al. (1982)	IIB	IIA	I	IIIb	IIIa
ATPase (pH acide)	-	-	+	+	+/-
ATPase (pH basique	+	+	-	+	+/-
Succinate déshydrogénase (SDH)	+	++	++	++	++

SO (Slow Oxidative)

FOG (Fast Oxydo-Glycolytic)

FG (Fast Glycolytique)

2. Typologie des fibres musculaires

Plusieurs classifications des fibres basées sur la révélation des propriétés contractiles et/ou métaboliques ont été établies (**Tableau 1**). La révélation de l'activité ATPasique des fibres a tout d'abord était utilisée pour classer les fibres selon leur vitesse de contraction. En effet, cette activité se situe au niveau des chaînes de la myosine (MyHC) qui est la seule protéine myofibrillaire présentant une activité enzymatique. Son action permet l'hydrolyse de l'ATP pour fournir de l'énergie lors de la contraction musculaire. La combinaison de plusieurs pH d'incubation des fibres selon la méthode de Brooke & Kaiser (1970) a permis de distinguer trois types de fibres (I, IIA, IIB) décrits dans **tableau 1**. D'autres auteurs, tels que Peter et al. (1972) ont combiné la révélation du type contractile, par analyse de l'activité ATPasique myofibrillaire, et du type métabolique par révélation de l'activité d'une enzyme du métabolisme oxydatif telle que la SDH (Succinate Déshydrogénase) (**Tableau1**). Ces auteurs définissent ainsi, trois classes de fibres : les SO (Slow Oxidative), FOG (Fast Oxydo-Glycolytic) et les FG (Fast Glycolytic). Il est à signaler que chez les volailles (poulets et dindes), le muscle pectoral est formé presque exclusivement de FG (Von Lengerken et al., 2002). Une autre classification prenant en compte en complément la couleur a abouti à la classification de Ashmore & Doerr (1971). Selon ces auteurs, les muscles rouges d'où leur nom de Red (R) ont une vitesse de contraction rapide (α) ou lente (β) d'où les types (αR et βR). En revanche, les muscles blancs ou White (W) sont formés majoritairement de fibres à vitesse de contraction rapide (**Tableau 1**).

Ces classifications, considérées équivalentes, se sont rapidement révélées divergentes, aboutissant à l'identification de sous-types (pour revue Pette & Staron, 1990). En particulier, des fibres appelées IIC, intermédiaires entre les fibres I et IIA, ont été identifiées.

Comme chez les mammifères, les fibres musculaires des oiseaux peuvent être classées sur la base de leur métabolisme énergétique et de leur activité contractile (**Tableau 2**). Selon la classification de Ashmore & Doerr (1971), il existe chez les oiseaux trois principaux types de fibres : les fibres βR lentes oxydatives, les fibres αR rapides oxydo-glycolytiques, et les fibres αW rapides glycolytiques. Elles sont mono-innervées et phasiques et correspondent respectivement aux fibres I, IIA et IIB décrites par Barnard et al. (1982). Les travaux de ce dernier ont permis de mettre en évidence une classe additionnelle spécifique aux muscles aviaires, les fibres lentes toniques multi-innervées de types IIIa (α') et IIIb (β'). Ces fibres de

type III n'existent pas au sein des muscles squelettiques des mammifères, on les retrouve uniquement dans leurs muscles oculomoteurs (pour revue Berri & Duclos, 2003).

Plus récemment, l'utilisation d'anticorps anti-MyHC a permis l'identification d'une catégorie supplémentaire de fibres à vitesse de contraction rapide et à métabolisme oxydo-glycolytique IIx, intermédiaire entre celui des fibres IIA et IIB (**Tableau 2**). Ces fibres appelées IIx, ont été tout d'abord mises en évidence chez les rongeurs puis dans d'autres espèces (pour revue Picard et al., 2003). Chez les oiseaux, ce type de fibre n'a pas été formellement mis en évidence.

Chez les volailles comme chez les mammifères, la mise en place des fibres musculaires débute très tôt au cours de la vie fœtale. Le nombre total de fibres reste stable après l'éclosion et l'augmentation des poids et rendement en filet se fait principalement par une augmentation de la taille des fibres musculaires (hypertrophie). Les principales étapes de la différenciation contractile et métabolique des fibres ont lieu durant les deux semaines qui suivent la naissance (pour revue Picard et al., 2003).

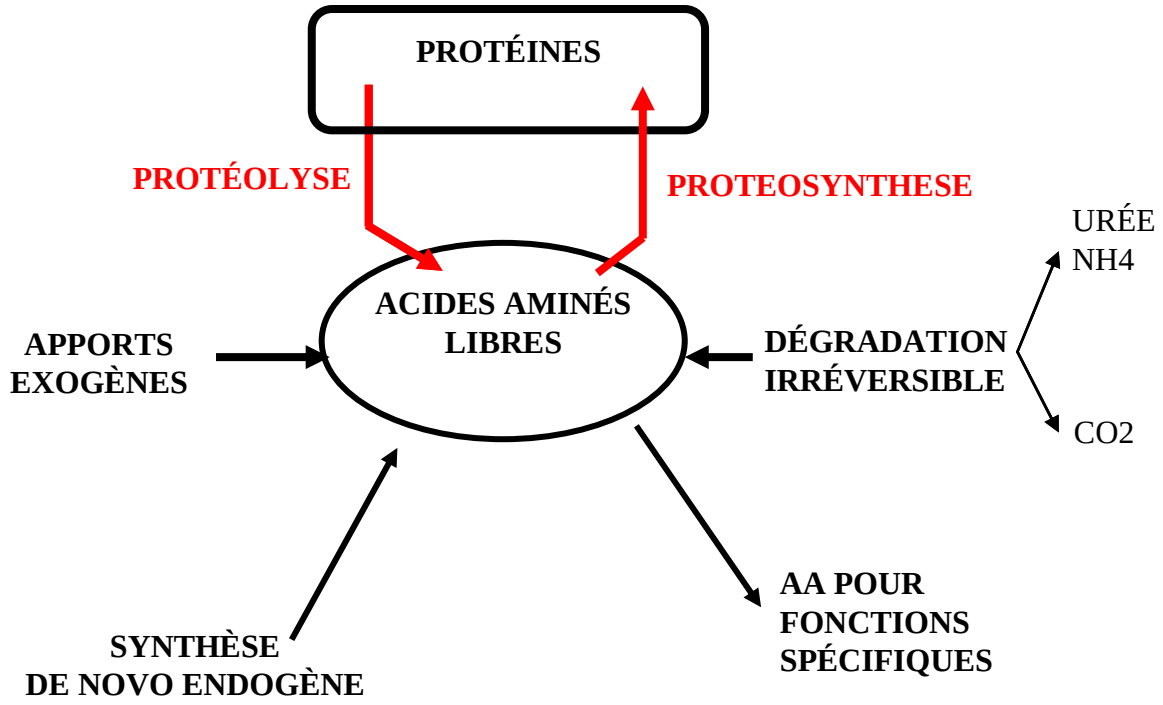


Figure 2. Schéma général du métabolisme protéique chez un homme adulte.

AA : acides aminés.

L'excrétion d'azote se fait sous forme d'acide urique chez le poulet.

3. Généralités sur le métabolisme des protéines

Une protéine est une molécule comportant de l'azote et composée d'une séquence d'acides aminés (ils sont au nombre de 20) reliés par des liaisons peptidiques. La séquence détermine la structure primaire de la protéine, la configuration de la chaîne peptidique dans l'espace détermine les structures secondaires et tertiaires, l'association de plusieurs chaînes peptidiques détermine la structure quaternaire. Les protéines ont différentes fonctions : protéines de structure (collagène...), protéines contractiles (myosine...), enzymes, hormones, récepteurs, etc... Les pools des acides aminés et des protéines sont en équilibre dynamique. Les facteurs conditionnant cet équilibre sont le flux des protéines alimentaires, la synthèse des acides aminés *de novo,* la synthèse et la dégradation des protéines (turnover protéique) et l'oxydation des acides aminés résultant en une production d'azote et de CO_2 (**Figure 2**) (pour revue Tesseraud et al., 1995). Les acides aminés libres sont utilisés pour la synthèse de nouvelles protéines, de molécules azotées non protéiques, des acides aminés non essentiels et des molécules non azotées comme les corps cétoniques et le glucose en situation de jeûne.

II. Mécanismes du renouvellement protéique musculaire

La conservation de la masse musculaire dépend de l'équilibre entre synthèse et dégradation des protéines (i.e. protéosynthèse et protéolyse). Ces deux processus sont simultanés et constituent le renouvellement protéique ou turnover protéique. La différence entre protéosynthèse et protéolyse représente le bilan protéique (bilan azoté). Une synthèse supérieure à la protéolyse résulte en une accrétion protéique. Dans le cas contraire, une protéolyse supérieure à la synthèse résulte en une diminution de la masse musculaire.

1. La protéosynthèse

La synthèse des protéines comprend deux étapes : 1) **la transcription** donne naissance à une dizaine d'ARN différents dont les trois principaux sont l'ARN messager (ARNm), l'ARN ribosomal (ARNr) et l'ARN de transfert (ARNt). Ces trois ARN sont transportés du noyau au cytoplasme, 2) **la traduction** correspond à la synthèse d'une protéine à partir de décodage d'un ARNm par une unité de lecture appelée ribosome. Chez les eucaryotes, le ribosome est constitué de 2 sous-unités de coéfficients de sédimentation différents : la grande sous-unité a un coefficient de 60S et la petite sous-unité un coefficient de 40S.

Tableau 3 : Les différents facteurs d'initiation impliqués dans l'initiation de la traduction (d'après Dever et al., 2002).

Facteurs eucaryotiques	***Sous-unités***	***Fonction***
eIF1		Fidélité de la reconnaissance du codon AUG
eIF1A		Facilite la liaison du Met-ARNti à la petite sous-unité 40S
eIF2	β α	Liaison de Met-ARNti et du GTP ; sélection de AUG
eIF2B	α, β γ, δ	Facteur échangeur de nucléotide guanidines sur eIF2
eIF3		Permet la fixation de Met-ARNti et ARNm à la sous-unité 40S
eIF4A		Hélicase ATP-dépendante
eIF4B		Stimule l'activité hélicase de eIF4A
eIF4F	eIF4E eIF4A eIF4G	Liaison à la coiffe m^7GTP de l'ARNm Activité hélicase, ATPase Liaison à eIF4E, eIF4A et eIF3
eIF5		Permet l'activité GTPase de eIF2

La grande sous-unité est composé de 3 ARNr (5S, 5,8S et 28S) et la petite sous-unité d'un seul ARNr de 18S (Lodish et al., 2005). La synthèse protéique peut être régulée au niveau de la capacité ribosomale (Cs) qui représente le potentiel de synthèse en relation avec la machinerie de la synthèse protéique. Dans mon travail de thèse, nous focaliserons sur l'étape de traduction des protéines pour mieux comprendre les mécanismes de régulation de la synthèse protéique.

1.1. Contrôle traductionnel de la protéosynthèse

La traduction des ARNm en protéines est divisée en trois phases distinctes : initiation, élongation et terminaison (Mathews et al., 2002). La phase d'initiation a pour but de recruter le ribosome à l'ARNm et de permettre la reconnaissance du codon initiateur. La petite sous-unité ribosomale 40S est d'abord recrutée et ce n'est qu'une fois le codon initiateur AUG reconnu qu'est recrutée la grande sous-unité 60S. Pendant la phase d'élongation le ribosome parcourt le brin d'ARNm et va permettre de construire la chaîne polypeptidique en incorporant les acides aminés chargés sur les ARNt. La phase de terminaison se produit lorsque le ribosome rencontre un des trois codons stop (UAA, UGA, UAG) portés par l'ARNm. La protéine complète est libérée dans le cytoplasme où elle subit des modifications post-traductionnelles.

Les différentes étapes de la traduction sont contrôlées respectivement, par des facteurs d'initiation eIF (eukaryotic Initiation Factor), d'élongation eEF (eukaryotic Elongation Facor) et de libération RF (Releasing Factor). L'initiation de la traduction d'ARNm fait intervenir différents facteurs d'initiation qui seront présentés dans le **tableau 3** avec un bref résumé de leur fonctions (pour revue Dever, 2002 ; Yoshizawa, 2004). Nous nous limiterons à décrire dans cette étude bibliographique la phase d'initiation de la traduction qui est l'étape limitante de la traduction (pour revues Rhoads, 1999 ; Dever, 2002), ainsi que les éléments intracellulaires intervenant dans sa régulation.

1.2. Initiation de la traduction

Les ARNm eucaryotes sont traduits dans leur majorité de façon dépendante d'une structure particulière appelée coiffe m^7GTP, présente à l'extrémité 5' non traduite (5'UTR) des ARNm (Von Der Haar et al., 2004). En effet, l'initiation de la traduction se produit par fixation du ribosome près du codant initiateur AUG le plus proche de l'extrémité 5'UTR. Le

ribosome peut se fixer aussi au niveau d'une séquence interne de l'ARNm IRES (Internal Ribosome Entry Site) et on parle alors de traduction IRES-dépendante (pour revue Vagner et al., 2001). Ce mécanisme permet de détourner la machinerie traductionnelle de la cellule durant l'infection virale.

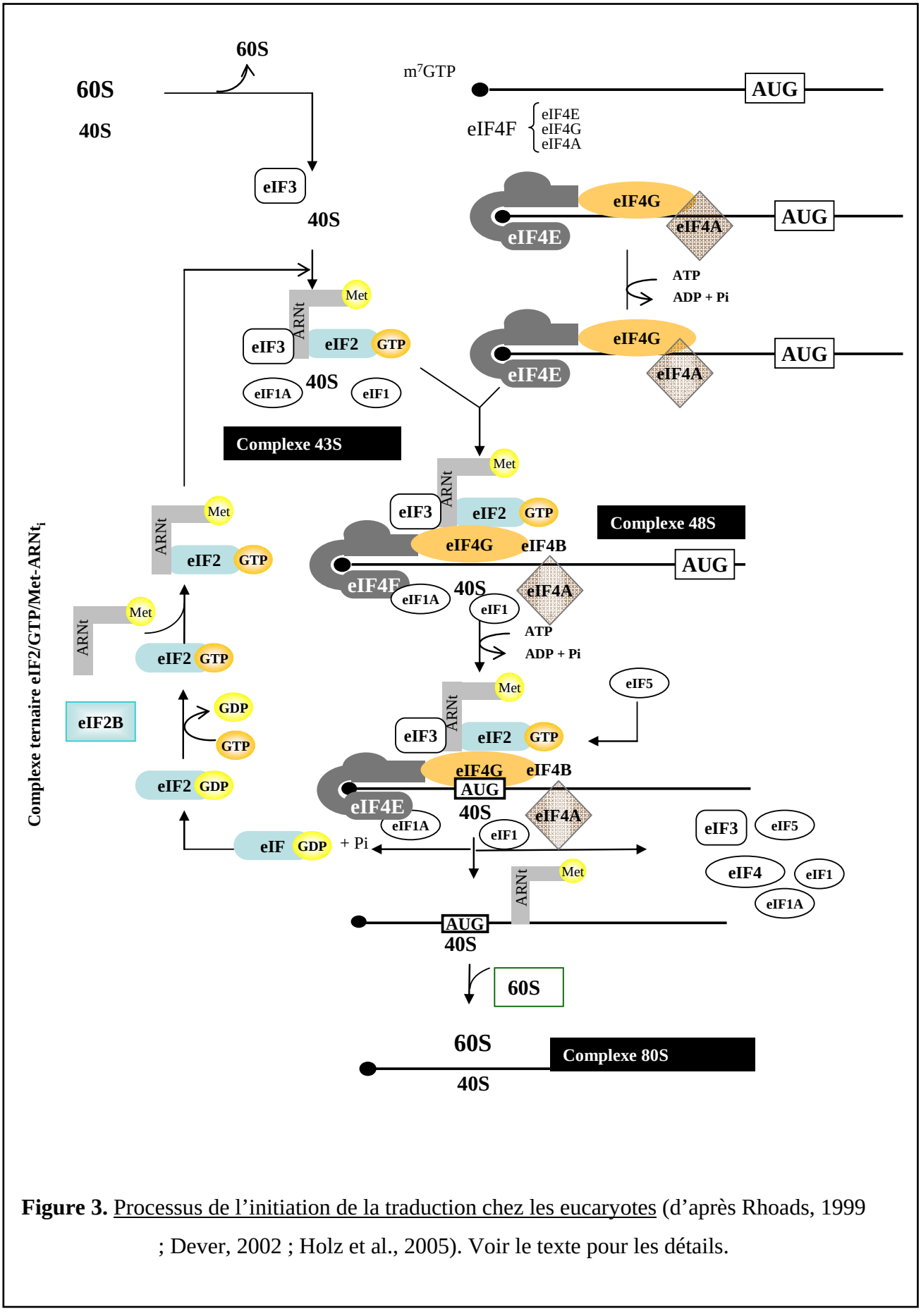


Figure 3. Processus de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes (d'après Rhoads, 1999 ; Dever, 2002 ; Holz et al., 2005). Voir le texte pour les détails.

L'initiation de la traduction a lieu en trois étapes successives (**Figure 3**). Lors de la première étape, le facteur d'initiation eIF2 couplé à un GTP (eIF2/GTP), lie l'ARNt initiateur qui porte une méthionine (Met-ARNti) et forme ainsi le complexe ternaire (eIF2/GTP/Met-ARNti) (pour revue Gingras et al., 2001). Le complexe ternaire est recruté au niveau de la sous-unité 40S liée à la protéine d'échafaudage eIF3 (40S/eIF3). Le complexe de préinitiation **43S** est formé lorsque la sous-unité ribosomale 40S/eIF3 est liée à eIF1A et au complexe ternaire (**Figure 3**).

La seconde étape fait intervenir le complexe eIF4F qui est constitué des facteurs d'initiation eIF4E, eIF4A et eIF4G. eIF4E reconnaît l'extrémité de la coiffe m^7GTP de l'ARNm. La protéine eIF4E est un acteur clé de la régulation de l'initiation de la traduction car présent en faible quantité dans la cellule (Sonenberg & Hinnebush, 2009). La disponibilité en eIF4E dépend de son association avec 4E-BP1 (eIF4E Binding Protein 1). En effet, 4E-BP1 fixe eIF4E au même site de fixation que eIF4G ce qui lui donne le rôle d'un inhibiteur compétitif de la formation du complexe eIF4E/eIF4G. La phosphorylation de 4E-BP1 provoque la dissociation de eIF4E, qui se fixe alors à eIF4G permettant la formation du complexe eIF4F. Le facteur eIF4B s'associe dans un second temps à l'ARNm et favorise l'activité hélicase du facteur eIF4A, ce qui permet le déroulement des structures secondaires de l'ARN de manière ATP-dépendante. Le complexe de préinitiation 43S et l'ARNm lié à eIF4F et eIF4B s'associent pour former le complexe **48S**.

Le complexe 48S, recruté sur la coiffe de l'ARNm va alors avancer le long de l'ARNm par un mécanisme de balayage appelé « ribosome scanning », jusqu'à atteindre le premier codon d'initiation AUG. Celui-ci doit toutefois se situer dans un contexte qui, chez les eucaryotes, est représenté par la séquence de Kozak : 5' GCCACC**AUG**G 3' (pour revue Kozak, 1989). Ce balayage de l'ARNm par le ribosome est facilité par l'activité hélicase de eIF4A et eIF4B qui sont recrutées par eIF4G pour déplier les structures secondaires de l'ARNm (Pisarev et al., 2007 ; Sonenberg & Hinnebusch, 2009). La fidélité de reconnaissance de l'AUG est portée par eIF1 et son cofacteur eIF1A, leur absence combinée induisant la reconnaissance d'un codon erroné (Pestova et al., 1998).

Pendant la troisième étape, le codon d'initiation reconnu lève l'inhibition exercée par eIF1 sur eIF5 qui hydrolyse alors le GTP lié à eIF2 (Algire et al., 2005). eIF2/GDP possède une affinité réduite pour la sous-unité 40S et est donc en conséquence dissocié. eIF2 libéré est recyclé par eIF2B qui échange le GDP par du GTP.

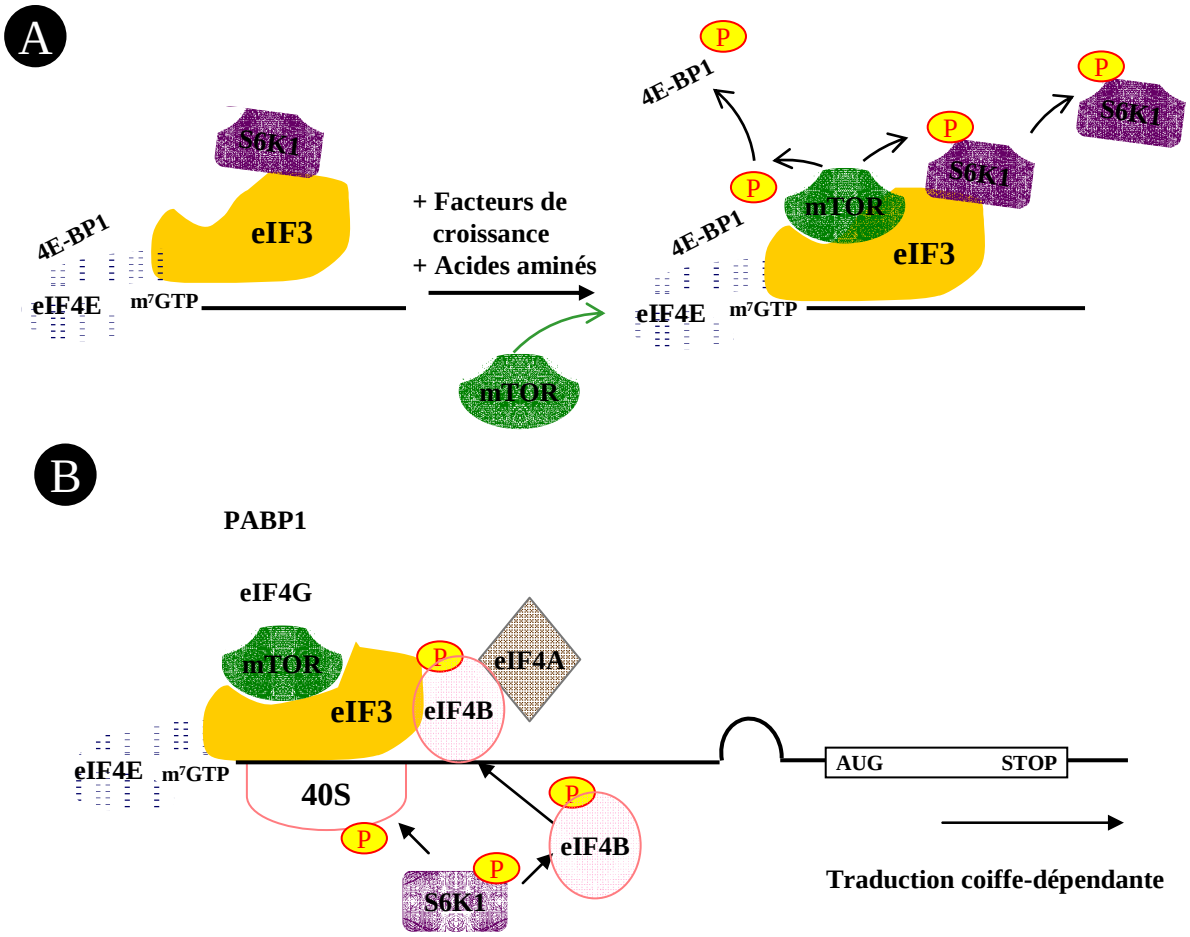


Figure 4. Modèle d'interaction entre eIF3 et mTOR, S6K1 et eIF4B

(d'après Holz et al., 2005).

CIT : Complexe d'initiation de la traduction.

La S6K1 est associée avec le complexe eIF3.

Après une stimulation, mTOR est recrutée au complexe eIF3 et phosphoryle S6K1 et 4E-BP1.

A. La phosphorylation de S6K1 sur Thr389 conduit à sa dissociation du complexe eIF3. La phosphorylation de 4E-BP1 par mTOR permet sa dissociation au niveau de la coiffe.

B. La S6K1 activée phosphoryle eIF4B et permet son association avec le complexe CIT. eIF4G est recruté aussi au niveau de la coiffe. Cette séquence d'événements conduit à l'assemblage du CIT et l'initiation de la traduction.

La perte d'eIF2 entraîne la dissociation en cascade des autres facteurs (eIF5, eIF3, eIF1 et eIF1A) qui sont associés à eIF2. Ceci enlève l'encombrement créé à la surface de la sous-unité 40S et ouvre la voie à l'ancrage de la sous-unité 60S du ribosome, formant ainsi le complexe **80S**. L'élongation peut alors commencer.

Lors de l'initiation coiffe-dépendante, un complexe d'initiation de la traduction (CIT) se forme au niveau de la coiffe m^7GTP. Le CIT est formé de 2 structures : le complexe de préinitiation 43S et le complexe eIF4F. Selon Holz et al. (2005) la séquence d'événements conduisant à l'assemblage du CIT fait intervenir aussi d'autres kinases qui seront présentées plus loin telles que la protéine ribosomale S6K1 (p70S6 kinase 1), 4E-BP1 et mTOR (mammalian Target of Rapamycin) (**Figure 4**).

2. La protéolyse

Les mécanismes de la protéolyse ont été beaucoup moins étudiés que ceux de la synthèse protéique, mais la progression des connaissances a été rapide au cours des dix dernières années. Pendant le processus de protéolyse, les protéines sont dégradées par des enzymes protéolytiques, les protéases. Nous présenterons les 4 principaux systèmes protéolytiques, en insistant plus particulièrement sur la voie ubiquitine protéasome-dépendante. En effet, cette voie exerce un rôle prépondérant en ce qui concerne la protéolyse musculaire.

2.1.La voie lysosomale

Les lysosomes sont des organites cellulaires de 0,2 à 0,5 microns présents dans le cytosol de toutes les cellules eucaryotes, à l'exception des hématies. Leur nom de lysosome, dérivé du grec *lithos*, pierre et *soma*, corps, est dû à leur aspect granuleux. La membrane lysosomale contient des protéines de transport, des pompes à protons et des canaux ioniques. Ces pompes à protons et ces canaux ioniques permettent le maintien à l'intérieur des lysosomes d'un pH compris entre 4 et 5, indispensable au fonctionnement des hydrolases acides qu'ils contiennent (Kirschke & Barett, 1985). Cette voie nécessite de l'énergie sous forme d'ATP pour maintenir le pH acide à l'intérieur des lysosomes. La protéolyse lysosomale est principalement assurée par les cathepsines (**Figure 5**). Ces endoprotéases forment une famille d'au moins 11 membres, dont les cathepsines B, D, H et L, qui même présentes avec des faibles concentrations sont actives dans le muscle squelettique adulte (pour revue Béchet et al., 2005).

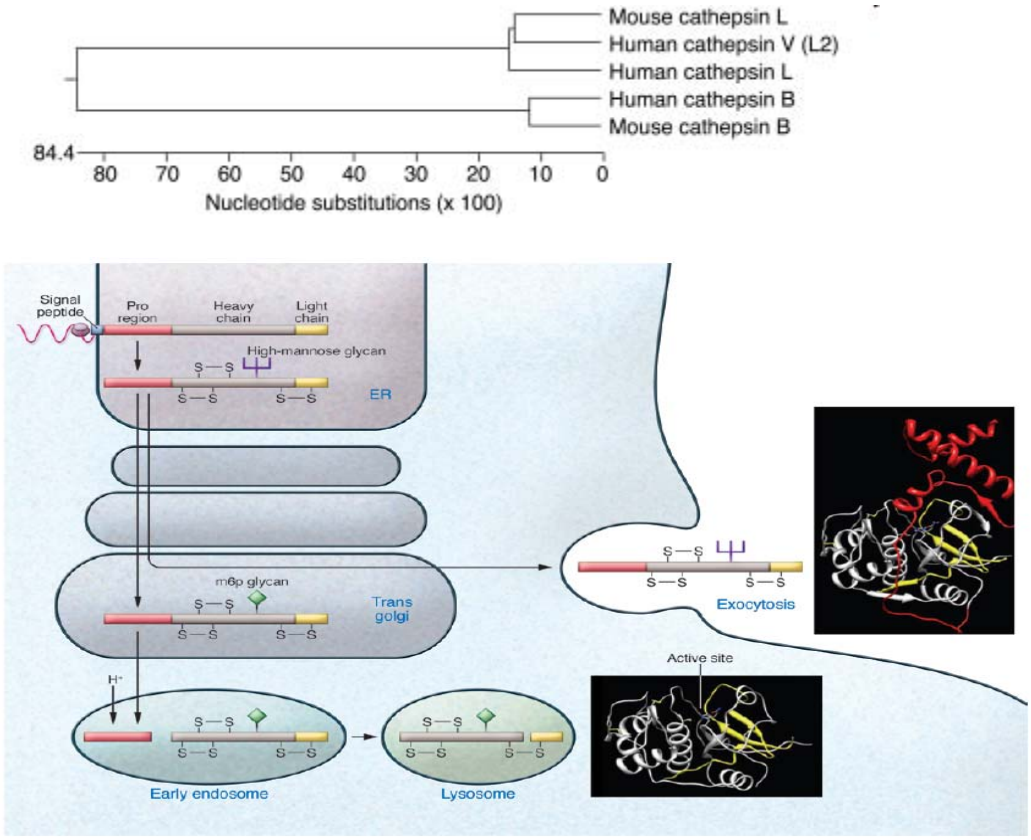


Figure 5. Cathepsines à cystéine. (A) Phylogénie et nomenclature des cathepsines. (B) Structure et synthèse des cathepsines (d'après Reiser et al., 2010).

(A) : Arbre phylogénique des cathepsines humaines et de souris. La cathepsine L de souris, la cathepsine humaine V et la cathepsine humaine L sont comparées entre elles et avec la cathepsine B humaine et de souris afin de démontrer la distance phylogénique avec d'autres membres de la famille des cathepsines à cystéine.

(A) : Les cathepsines contiennent un peptide signal (bleu) qui permet le passage de la protéine dans la lumière du réticulum endoplasmique (ER). Le peptide signal est ensuite clivé et la proenzyme subit des modifications : formation des ponts dissulfures et glycosylation. Dans le réseau trans-golgien, les résidus mannose 6-phosphate permettent la liaison des proenzymes aux récepteurs du mannose 6-phosphate qui les dirigent vers un compartiment prélysosomal où le pH acide permet le clivage de la prorégion. La proenzyme subit ensuite une maturation avec le clivage d'un peptide en région C-terminale (jaune).

Leur niveau d'expression semble être régulé de façon type de fibre-dépendante. Les muscles oxydatifs à contractions lentes présentent un niveau plus élevé en cathepsines que les muscles glycolytiques à contractions rapides. L'activité des cathepsines est régulée aussi par leurs inhibiteurs spécifiques, les cystatines (Abrahamson et al., 2003). Signalons que différents cathepsines, en particulier les cathepsines B, H et L sont caractérisées chez le poulet (Ahn et al., 2010). Cependant, au niveau musculaire, c'est principalement la cathepsine B dont l'expression est mesurée (Nakashima et al., 2007 ; Dupont et al., 2008 ; Tesseraud et al., 2009a).

De manière différente de ce que l'on a avec les autres systèmes protéolytiques, les protéases lysosomales sont physiquement isolées des constituants cytoplasmiques par la membrane lysosomale. Divers mécanismes d'autophagie sont ainsi nécessaires pour amener les substrats cytoplasmiques dans les lysososmes. Ainsi, des organites cellulaires détruits (protéines ou des organites comme les mitochondries) s'entourent d'une membrane provenant du réticulum endoplasmique pour former des vésicules autophagiques (pour revue Mizushima et al., 2007). La formation de ces vésicules autophagiques par l'action des protéines Atg (Autophagy specific Gene) est une étape majeure dans le transport des protéines substrats dans les lysosomes.

La protéolyse lysosomale joue un rôle majeur dans la dégradation des protéines hépatiques où les lysosomes sont particulièrement abondants (Bloommaart et al., 1997). À l'inverse, les principales protéases lysosomales sont peu abondantes dans le muscle squelettique (Béchet et al., 2005). Certaines études *in vivo* ont montré la faible contribution des lysosomes dans la dégradation des protéines musculaires pendant l'atrophie (Taillandier et al., 1996 ; Ikemoto et al., 2001). Cependant, il a été observé une augmentation de l'expression et de l'activité des cathepsines B et D induites par plusieurs conditions telles qu'un traitement avec des glucocorticoïdes, la cachexie, le sepsis, la dénervation et la sarcopénie (Dardevet et al., 1995 ; Taillandier et al., 1996 ; Jagoe et al., 2002).

Donc, les cathepsines B et D pourraient jouer un rôle non négligeable dans le contrôle de la dégradation des protéines pendant l'atrophie musculaire. Des analyses de microarray ont aussi permis d'identifier la cathepsine L en tant que gène spécifique de l'atrophie et la cathepsine L peut être considérée comme un marqueur général de l'activité lysosomale dans ces conditions (Lecker et al., 2004 ; Sacheck et al., 2007).

Tableau 4 : Nomenclature internationale des calpaïnes chez les mammifères (FASEB Summer Research Conferences, 2001).

Calpaïne	*Gène*	*Autres noms*	*EF-hand*	*Tissus*	*Espèces*	*Chromosome*
Calpaïne 1	capn1	μ-calpaïne, CAPN1	+	ubiquitaire	Homme Souris, Rat	11q13 19, NI
Calpaïne 2	Capn2	m-calpaïne, CAPN2	+	ubiquitaire	Homme Souris Rat	1q41 NI NI
Calpaïne 3	Capn3	nCL-1, p94, (Lp82, Lp85, Rt88	+	muscle squelettique, rétine	Homme Souris Rat	15q15,1 2 NI
Calpaïne 5	Capn5	htra3, nCL-3	-	ubiquitaire	Homme Souris, Rat	11q14 7, NI
Calpaïne 6	Capn6	CAPNX, calpamodulin	-	placenta	Homme Souris, Rat	Xq28 X, NI
Calpaïne 7	Capn7	palBH	-	ubiquitaire	Homme Souris, Rat	3p24-p25 NI, NI
Calpaïne 8	Capn8	nCL-2	+	muqueuse stomacale	Homme Souris, Rat	1q41 NI, NI
Calpaïne 9	Capn9	nCL-4	+	appareil digestif	Homme Souris, Rat	1q42 NI, NI
Calpaïne 10	capn10	CAPN10, CAPN8	-	ubiquitaire	Homme Souris, Rat	2q37.3 NI, NI
Calpaïne 11	capn10	CAPN11	+	testicules	Homme Souris, Rat	6p12 NI, NI
Calpaïne 12	Capn12	CAPN12	+	ubiquitaire	Homme Souris, Rat	NI 19q13, NI
Calpaïne 13	capn13	CAPN13	+	testicules, poumons	Homme	2p22,2-p22,3
Calpaïne 14	capn14	CAPN14	-	Ubiquitaire	Homme	2p22,2-p22,3
Calpaïne 15	capn15	Sol H	-	Ubiquitaire	Homme Souris, Rat	16p13.3 17A3,3, NI
Calpaïne Small Subunit 1	capn-s1 ou cpns1	CAPN4	+	ubiquitaire	Homme Souris Rat	19q13,1 NI NI
Calpaïne Small Subunit 2	capn-s2 ou cpns2		+	non identifié (NI)	Homme Souris Rat	16 NI NI

2.2. La voie Calcium-dépendante

Les calpaïnes sont des protéases à cystéine intracellulaires, non-lysosomales, responsables de la protéolyse calcium (Ca^{2+})-dépendante. Découvertes par Guroff (1964), les calpaïnes (pour calcium et papaïne) sont activées par le calcium à pH neutre (Croall & De Martino, 1991). Les calpaïnes possèdent un domaine leur permettant d'interagir avec le calcium. Ce domaine, fortement homologue à la calmoduline, est dit calmoduline-like et présente des structures EF-Hand capables de lier les ions calcium. Le site actif des calpaïnes est constitué de trois acides aminés : Cystéine (C), Histidine (H) et Asparagine (N). Actuellement, 14 différents calpaïnes ont été identifiées chez les mammifères (**Tableau 4**). Les principales sont les calpaïnes 1 et 2 d'un poids moléculaire de 78-80 kDa. La micro (µ)-calpaïne ou calpaïne 1 et la milli (m)-calpaïne ou calpaïne 2 sont activées *in vitro* respectivement, par des concentrations calciques de l'ordre du micro- et du milli-molaire. Ces deux isoformes sont exprimées de manière ubiquitaire dans les tissus des animaux dont le poulet (Sorimachi et al., 1995). Chez le poulet, en plus de ces 2 calpaïnes, une troisième forme ubiquitaire a été décrite correspondant à un type intermédiaire et appelé µ/m-calpaïne car sa sensibilité au calcium est intermédiaire entre celles de la µ- et de la m-calpaïne (Sorimachi et al., 1995 ; Lee et al., 2007 ; Macqueen et al., 2010). Bien que la µ- et la m-calpaïne soient actuellement les plus étudiées et les mieux connues, il existe 6 autres calpaïnes ubiquitaires : les calpaïnes 5, 7, 10, 12, 14 et 15. Les autres calpaïnes 3, 6, 8, 9, 11 et 13 sont tissu-spécifiques. Les fibres musculaires contiennent en plus de la µ- et la m-calpaïne, la calpaïne 3 ou p94 (pour revue Bartoli et al., 2005). La calpaïne 3 a été identifiée aussi chez le poulet (Sorimachi et al., 1995).

La structure de la µ- et de la m-calpaïne est organisée en 4 domaines différents (I, II, III et IV) (**Figure 6**). Chacune forme un hétérodimère avec CSS1 (Calpain Small Subunit 1), une sous-unité régulatrice d'environ 28 kDa. La structure de CSS1 est organisée en deux domaines (V et VI) (**Figure 6**). Les domaines IV (ou domaine calmoduline-like) et VI sont des régions constituées de 5 motifs EF-Hand, qui ont une forte affinité pour le calcium (Goll et al., 2003 ; Bartoli et al., 2005).

Les calpaïnes ubiquitaires, en particulier la µ- et la m-calpaïne, sont synthétisées sous forme inactive, protégeant ainsi la cellule de la protéolyse. La fixation du calcium au niveau des structures EF-hand des domaines IV et VI permet l'interaction de ces domaines, favorisant ainsi l'association des deux sous-unités.

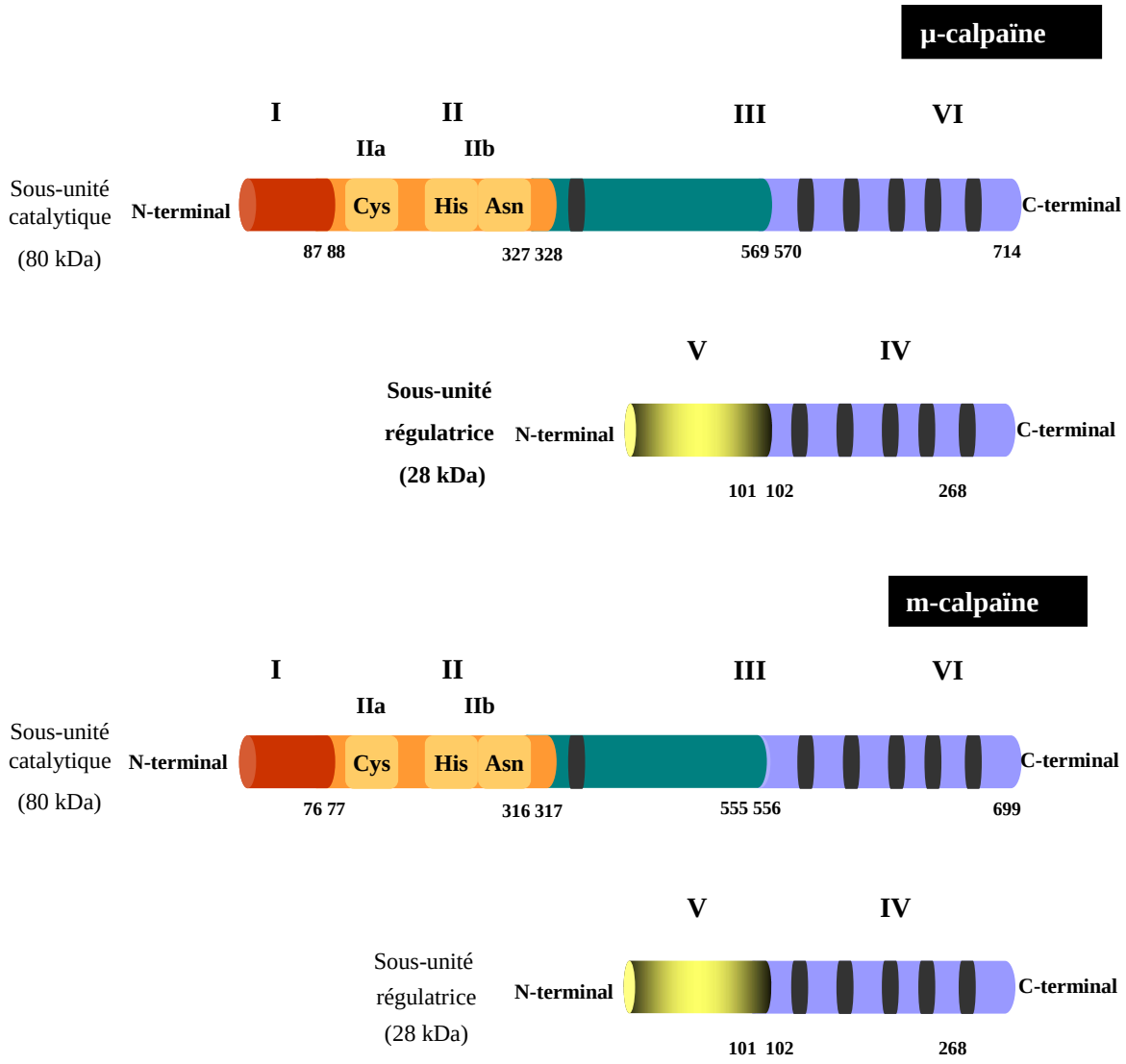


Figure 6. Structure de la μ- et de la m-calpaïne (d'après Goll et al., 2003).

- Les domaines EFhand sont représentés en noir.

De plus, le calcium serait à l'origine de nombreux changements conformationnels, notamment au niveau du domaine II où il permet le rapprochement des sous-domaines IIa et IIb, rendant le site actif opérationnel. Après avoir fixé le calcium, les calpaïnes migrent vers la membrane plasmique où les phospholipides membranaires interagissent avec les domaines III et V via leurs régions hydrophobes (Cottin et al., 2001). L'activité des μ- et m-calpaïnes est régulée non seulement par le calcium, mais aussi par la calpastatine**.** La calpastatine interagit avec les domaines IV et VI de ces deux calpaïnes ubiquitaires. Elle possède des sites de phosphorylation en position N-terminale (Goll et al., 2003).

Les substrats des calpaïnes peuvent être des enzymes (calcium/calmoduline-dépendante protéine kinase, EGF récepteur kinase, phospholipase C, protéine kinase C), des protéines du cytosquelette et contractiles telles que la myosine, la tropomyosine, la vinculine et la tubuline (Santella et al., 2000 ; Serrano & Devine, 2004 ; Mazères et al., 2006), des protéines membranaires telles que la cadhérine et la cavéoline 3 (Moyen et al., 2004), et des facteurs de transcription comme la myogénine. Bien que l'activité de la calpaïne semble nécessaire au bon fonctionnement du muscle, son rôle précis dans la protéolyse calcium-dépendante au niveau du muscle squelettique reste encore à élucider. Il semble peu probable que cette voie joue un rôle prépondérant dans le turnover protéique du muscle squelettique (Attaix et al., 1994), mais elle pourrait agir de manière cordonnée avec les autres voies. En effet, la voie protéolytique calcium-dépendante débute la dégradation des protéines myofibrillaires. Les calpaïnes permettent de dissocier les myofilaments épais et fins, afin que ces substrats soient accessibles aux autres systèmes protéolytiques tels que le système ubiquitine protéasome-dépendant (voir paragraphe 2.4.), en particulier dans les situations d'hyperprotéolyse (Neti et al., 2009).

2.3. La voie apoptotique via l'activité des caspases

Le rôle important des caspases dans l'apoptose a été montré lors de la découverte du gène ced-3 chez *C. elegans* (Ellis & Horvitz, 1986). La protéine issue du gène ced-3 était une cystéine-protéase similaire à la protéine ICE chez les mammifères (Interleukin-1-β Converting Enzyme) (Yuan et al., 1993). Cette enzyme ICE a été renommée caspase-1 (Cysteinyl-Aspartate-cleaving proteases) (Alnemri et al., 1996).

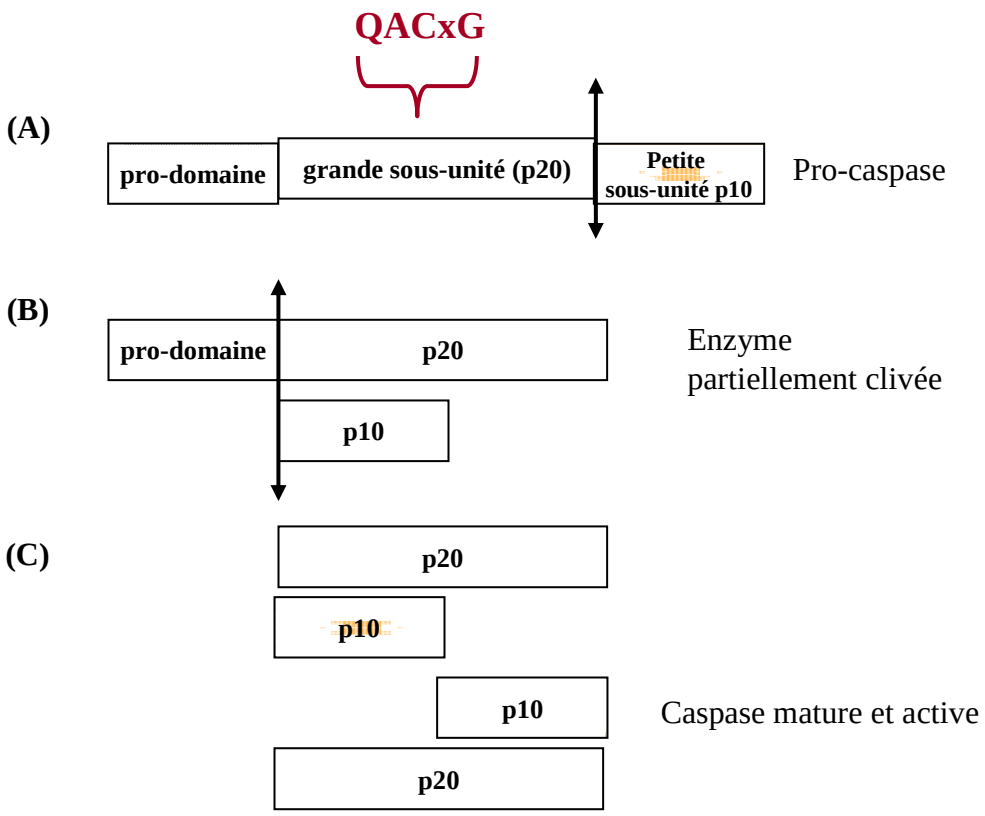


Figure 7. Structure et activation des caspases (d'après Rathmell & Thompson, 1999).

La séquence QACxG correspond au site actif des caspases (x= R, Q ou G).

Les flèches noires représentent les clivages nécessaires à l'activation des caspases.

(A) : Le premier clivage libère p10 qui s'associe alors avec p20.

(B) : Le second libère le pro-domaine.

(C) : La caspase s'assemble alors sous sa forme mature et active (p10/p20)2.

Les caspases possèdent une structure très conservée comprenant : un pro-domaine N-terminal de taille variable, un domaine qui deviendra après clivage la grande sous-unité (17-21 kDa) et un domaine qui deviendra après clivage la petite sous-unité (10-14 kDa). Elles possèdent toutes un site catalytique très conservé, composé d'un résidu cystéine inclus dans une séquence peptidique de type QACXG (ou le résidu X est R, Q ou G). Les caspases sont présentes dans le cytoplasme sous forme de pro-enzymes inactives appelés pro-caspases. Ces pro-caspases vont ensuite être clivées et, dans certains cas, dimérisées pour former les caspases actives. Les caspases activées vont pouvoir à leur tour activer d'autres pro-caspases et ainsi développer une activation en cascade (pour revue Rathmell & Thompson, 1999 ; Rotonda et al., 1996) (**Figure 7**).

Quinze caspases ont été identifiées chez les mammifères. Selon le mécanisme qui les active et leur place dans la cascade des événements, les caspases se répartissent en deux groupes :

- Les caspases initiatrices : caspases (2, 8, 9 et 10). Le cytchrome C joue un rôle très important dans l'activation des pro-caspases initiatrices au niveau de la mitochondrie. Les caspases initiatrices sont souvent clivées, mais cette coupure n'est pas nécessaire à l'expression de leur activité. Les substrats des caspases initiatrices sont les caspases effectrices.

- Les caspases effectrices : caspases (3, 6 et 7) activées par protéolyse. Elles sont synthétisées sous forme inactive, pro-caspases effectrices, dans lesquelles le site catalytique est masqué à l'intérieur de la protéine. Au contraire des caspases initiatrices, leur activation nécessite une coupure de la protéine après un résidu aspartate.

Les caspases clivent des protéines de différents types telles que des protéines de structure, des protéines régulatrices du génome, des protéines impliquées dans la transduction du signal et des protéines impliquées dans l'apoptose. Contrairement aux cathepsines et au protéasome, les caspases sont responsables d'une protéolyse limitée et sont donc incapables de dégrader leurs substrats en acides aminés. Au cours du processus apoptotique, les caspases inhibent les voies protectrices et activent les molécules participant à la mort cellulaire. L'activation et les fonctions de ces protéases sont régulées par de nombreux facteurs comme les protéines Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), les calpaïnes et le calcium. Dans le muscle squelettique la caspase-3 intervient dans les premières étapes de dégradation des protéines contractiles dans certaines conditions cataboliques (Du et al., 2004).

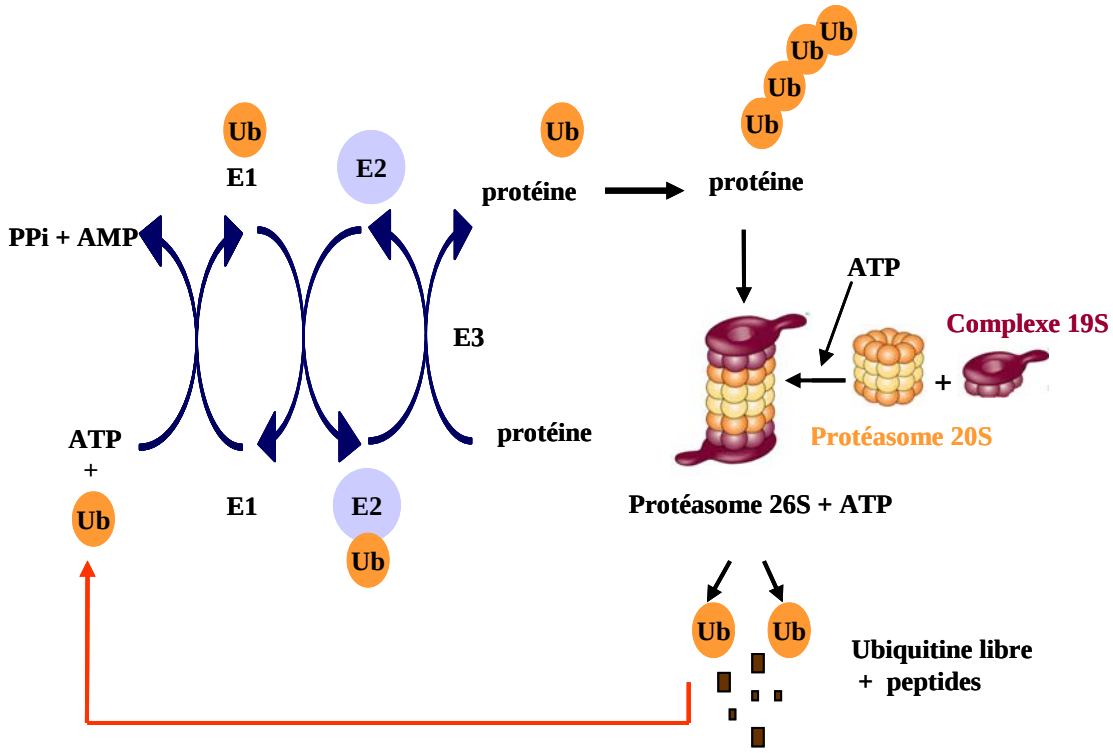


Figure 8. Ubiquitinylation des protéines ciblées par le protéasome (d'après Adams, 2004).

- Une enzyme activatrice de l'ubiquitine (E1) se lie à l'ubiquitine qui est transférée à une enzyme de congugaison (E2).
- Une ubiquitine ligase (E3) aide le transfert de l'ubiquitine à la protéine substrat.
- Au moins quatre ubiquitine sont attachées aux protéines cibles avant leur reconnaissance et dégradation par le protéasome 26S.
- Avant la dégradation la chaîne d'ubiquitines est détachée permettant à l'ubiquitine libre d'être recyclée.

2.4. La voie ubiquitine protéasome-dépendante

Le système protéolytique ATP et ubiquitine protéasome-dépendant, permet la dégradation des protéines ubiquitinylées en présence d'ATP dans le noyau et dans le cytoplasme (Coux et al., 1996 ; Voges et al., 1999). L'activité protéolytique est assurée par un complexe enzymatique le protéasome 26S suite à un marquage des protéines à dégrader par l'ubiquitine (Ub) (protéine de 76 acides aminés et de poids moléculaire 8,4 kDa). Certaines enzymes impliquées dans la phase d'ubiquitinylation comme les E3 ubiquitines ligases jouent un rôle remarquable et seront plus particulièrement détaillées.

2.4.1. L'ubiquitinylation des protéines

En présence d'ATP, l'ubiquitine se fixe sur les protéines à dégrader par une liaison covalente entre le groupement COOH de sa glycine C-terminale et le groupement NH_2 de la lysine de la protéine cible (pour revues Attaix et al., 1998 ; Mogk et al., 2007 ; Goll et al., 2008) (**Figure 8**). L'ubiquitinylation des protéines nécessite l'enzyme activant l'ubiquitine **E1,** formant ainsi une liaison thiolester entre un résidu cystéine de son site catalytique et une glycine C-terminale de l'ubiquitine. L'ubiquitine activée est transférée sur une enzyme de conjugaison **E2** ou **UBC** (Ubiquitin Carrier Protein), via la formation d'une nouvelle liaison thiolester. Enfin, l'ubiquitine est transférée sur une lysine du substrat par une ubiquitine ligase **E3** (Adams, 2004). Toutes les réactions impliquant des E3s conduisent à la formation de conjugués polyubiquitinylés. En fait, seules les protéines conjuguées à au moins 4 molécules d'ubiquitine sont spécifiquement reconnues et dégradées par le protéasome 26S (2000 kDa) (pour revue Attaix et al., 1998).

2.4.2. Dégradation des conjugués polyubiquitinylés

2.4.2.1. Le protéasome

Le protéasome 26S est composée de deux grandes unités : le protéasome 20S ('core' Cœur protéolytique d'environ 700 kDa) et les unités régulatrices PA700 (19S) (pour revues, Bochtler et al., 1999 ; Wolf & Hilt, 2004 ; Goll et al., 2008).

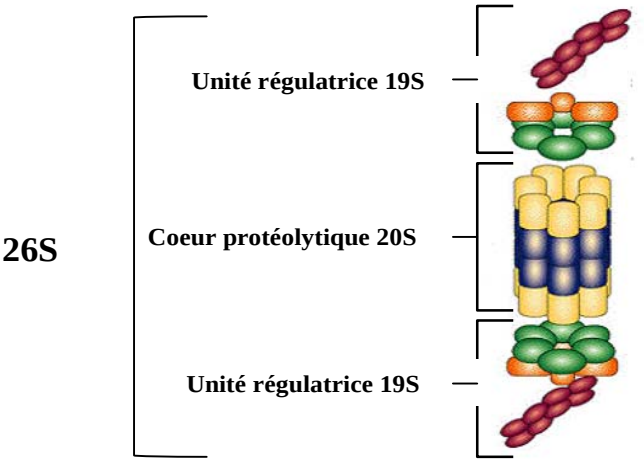


Figure 9. Assemblage du protéasome 26S (d'après Sullivan et al., 2003 ; Adams, 2004).

- Le coeur protéolytique du protéasome 26S est le protéasome 20S : il est pourvu de multiples activités peptidases et en constitue la machinerie catalytique.
- Le protéasome 20S est composé de 28 sous-unités arrangées en 4 anneaux heptamériques empilés (7 α, 7 β, 7 β, 7 α) et l'ensemble adopte une structure cylindrique.
- L'accès des protéines à dégrader au site actif de ce complexe est sous le contrôle des sous-unités α qui ne permettent l'accès qu'aux polypeptides qui ont été préalablement dépliés.

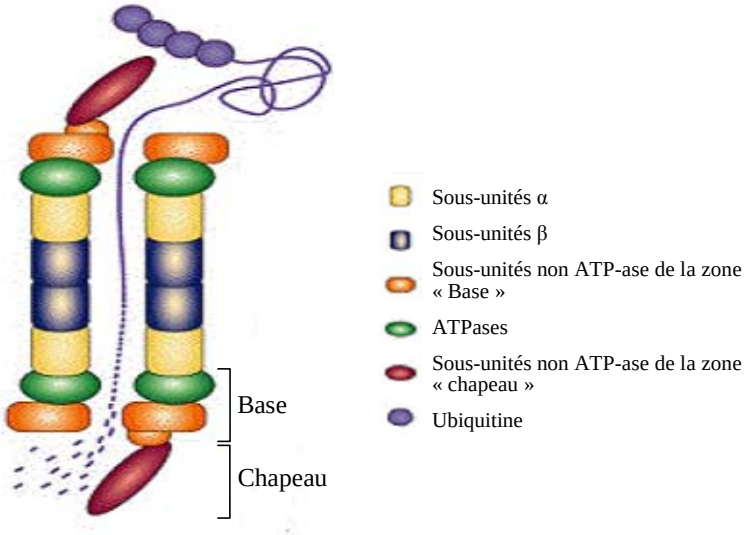


Figure 10. Organisation et rôles du protéasome 19S (d'après Sullivan et al., 2003).

Le complexe 19S est divisé en deux sous-complexes ou zones :

Base : comporte 6 sous-unités ATP-ase (vert) et 3 sous-unités non ATP-ase (orangé).
Chapeau : formé de 8 sous-unités non ATP-ase (rouge bordeaux). Voir le texte pour les détails.

En absence d'ATP, le protéasome 20S peut s'associer au complexe régulateur 11S, il ne fixe alors pas les protéines ubiquitinylées. Le protéasome 20S en forme de cylindre creux est composé de 4 anneaux de structure heptamérique. Les deux anneaux extérieurs formés par sept sous-unités régulatrices de type α régulent l'accès des protéines au cœur du protéasome, tandis que les sept sous-unités catalytiques β des deux anneaux internes sont responsables de l'activité protéolytique (pour revue Sullivan et al., 2003 ; Adams, 2004) (**Figure 9**).

Le protéasome 19S constitue une coiffe aux extrémités du protéasome 20S. C'est un complexe de 20 sous-unités (700 kDa) dont 6 sous-unités qui ont une activité ATPasique (hydrolyse de l'ATP) (**Figure 10**) (pour revue Sullivan et al., 2003). Ces rôles sont : (1) La reconnaissance et la fixation de la protéine qui doit être dégradée, (2) L'élimination des molécules d'ubiquitine (qui sont recyclées) par les sous-unités isopeptidases. Il existe deux classes d'isopeptidases : les UCH (Ubiquitin C-terminal Hydrolases) et les UBP (Ubiquitin-specific Proteases), (3) Le dépliement de la chaîne polypeptidique de la protéine qui doit être dégradée ; ceci est réalisé grâce aux 6 sous-unités ATPases du protéasome 19S qui catalysent le dépliement grâce à l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP. (4) L'activation du protéasome ; Les ATPases sont également responsables de l'ouverture de la « barrière » qui ferme l'entrée du protéasome 20S et de l'injection des protéines dépliées dans la cavité protéolytique.

2.4.2.2. Activités protéolytiques du protéasome

Le protéasome présente trois grands types d'activité peptidasique : 1) L'activité trypsine-like qui coupe après des résidus basiques (arginine ou lysine), 2) L'activité chymotrypsine-like qui coupe après des résidus hydrophobes (phénylalanine ou tyrosine) et 3) L'activité peptidylglutamyl peptide hydrolase qui coupe après des résidus acides (acide aspartique ou acide glutamique) (Attaix et al., 2005). Deux autres activités protéolytiques supplémentaires ont été mises en évidence ; BRAAP (Branched AA Peptidase) qui coupe après des acides aminés à chaîne latérale ramifiée par exemple l'isoleucine et SNAAP (Small Neutral AA Peptidase) qui coupe après des acides aminés neutres de petite taille tels que la glycine ou la valine (Orlowski et al., 1993).

La voie ubiquitine protéasome-dépendante intervient dans plusieurs processus biologiques tels que la régulation du cycle cellulaire, la régulation transcriptionnelle de certains gènes via l'hydrolyse de facteurs de transcription, la régulation du métabolisme

d'enzymes clés, le contrôle et la qualité des protéines néosynthétisées (Werner et al., 1996). 80 à 90% des protéines de la cellule, dont les protéines contractiles du muscle squelettique, sont dégradées via la voie ubiquitine protéasome-dépendante, ce qui montre l'implication essentielle de cette voie dans le turnover protéique musculaire (Goll et al., 2008).

Dans les états cataboliques au cours desquels la protéolyse est augmentée (le sepsis, le cancer, la dénervation…), il existe une surexpression de deux gènes spécifiques de l'atrophie musculaire, MuRF1 (Muscle Specific Ring Finger 1) et MAFbx/Atrogin-1 (Muscle Atrophy F-box /Atrophy gene-1) (Lecker et al., 2004 ; Sandri et al., 2004). Ces gènes codent pour des E3 ubiquitines ligases, qui se fixent aux protéines des myofibrilles et permettent leur ubiquitinylation et ensuite leur dégradation via la voie ubiquitine protéasome-dépendante (Clavel et al., 2006). Ces deux gènes seront présentés plus en détail.

2.4.3. E3 ubiquitines ligases

Les E3 ubiquitine ligases se répartissent en deux sous-familles : les E3 de la famille HECT (Homologous to E6-AP-Carboxy-Terminus) et les E3 possédant un motif RING-finger (Really Interesting New Gene) (pour revue Ardley & Robinson, 2005 ; de Palma et al., 2008). Le domaine HECT (40 kDa) situé dans la région C-terminale est le domaine catalytique de cette famille, tandis que, la région N-terminale assure la reconnaissance des substrats. La majorité des E3 contient le domaine RING-finger. Ces protéines avec un domaine RING-finger sont retrouvées au sein d'un complexe. Trois complexes présentant des similitudes fonctionnelles et structurelles sont distingués : SCF (Skp1-Cullin-F-box), CBC (Cullin2-elongine B-elongine C) et APC (Anaphase Promoting Complex). Par exemple, SCF est un complexe macromoléculaire contenant au moins quatre sous-unités : la protéine d'échafaudage Cullin-1 (Cul1 ou Cdc53), la protéine Roc1 à domaine RING qui permet la liaison avec l'enzyme de conjugaison E2, la protéine de liaison Skp1 (S phase Kinase-associated Protein 1) et un membre de la famille des protéines F-box (Tyers & Jorgensen, 2000 ; Bodine et al., 2001). Les protéines F-box sont des protéines adaptatrices qui reconnaissent différents substrats via des interactions protéine-protéine telles que des domaines répétés riches en leucine.

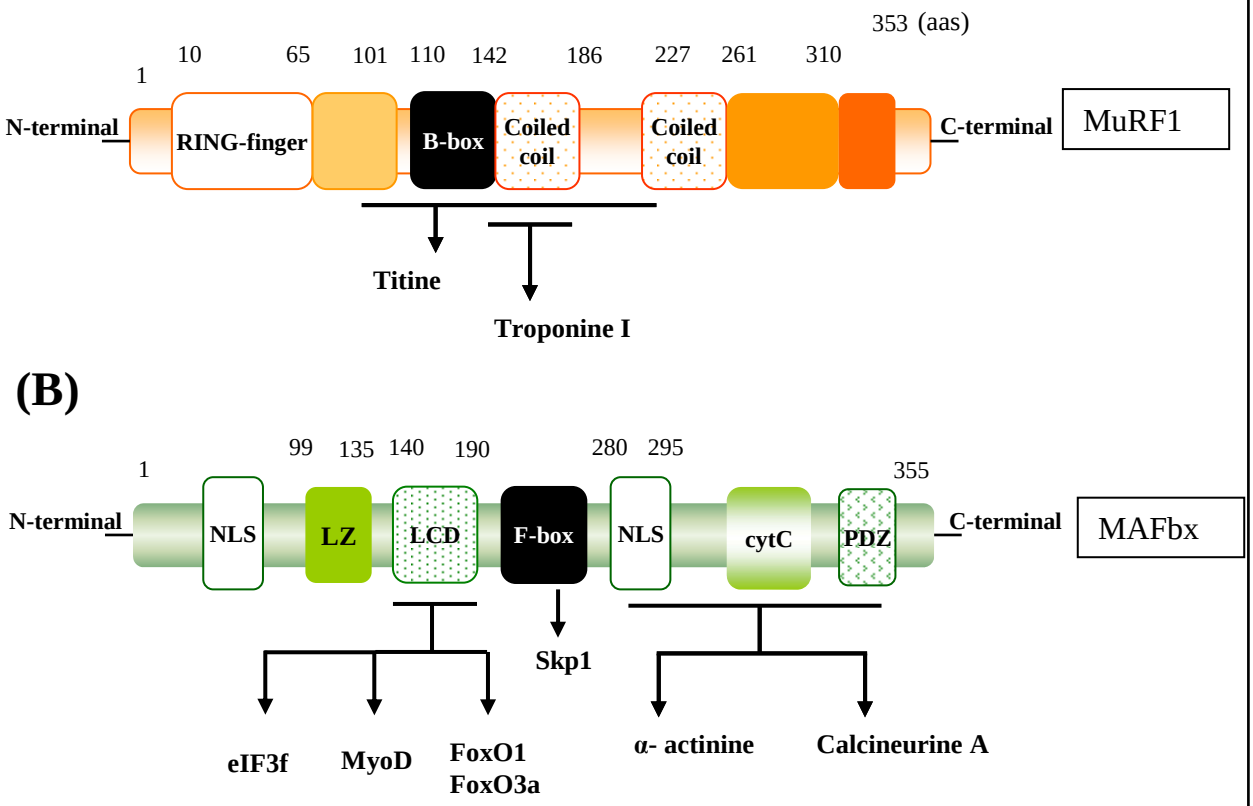


Figure 11. Représentation schématique des E3 ubiquitines ligases: (A) MuRF1 ; (B) MAFbx/Atrogin-1 (d'après Koyoma et al., 2008 ; Csibi et al., 2009).

2.4.3.1. MuRF1

MuRF1 (Muscle Specific Ring Finger 1) a été identifié comme étant un marqueur d'atrophie musculaire par des approches génomiques : l'expression de l'ARNm codant MuRF1 est fortement stimulée dans des conditions cataboliques telles que la mise à jeun, le cancer, le diabète, l'urémie, l'immobilisation et la dénervation (Lecker et al., 2004 ; Clavel et al., 2006 ; Sacheck et al., 2007). Des souris Knock-out pour MuRF1 ($MuRF1^{-/-}$) présentent une atténuation d'environ 36% de l'atrophie musculaire induite par dénervation (Bodine et al., 2001). MuRF1 est spécifiquement exprimée dans les muscles squelettiques et cardiaques. Dans le muscle strié, deux isoformes (MuRF2 et MuRF3) sont présents et semblent jouer un rôle important dans le maintien de la fonction contractile du muscle (Witt et al., 2008). Des souris double knock-out (dKO) pour MuRF1 et MuRF2 à la fois ($MuRF1^{-/-}$ et $MuRF2^{-/-}$) présentent une hypertrophie des muscles cardiaques et squelettiques (Witt et al., 2008). La protéine MuRF1 (environ 40 kDa) contient un domaine RING-finger dans son extrémité N-terminale ainsi que 2 coiled-coil et un domaine B-box en région centrale (**Figure 11A**) (Centner et al., 2001).

Le domaine RING-finger est nécessaire à son activité ubiquitine-ligase. Comme évoqué précédemment, MuRF1 est un « marqueur » de l'atrophie musculaire. Cette enzyme est impliquée en partie dans l'augmentation de protéolyse lors de la fonte musculaire et en particulier dans la dégradation spécifique de certaines protéines musculaires. Par exemple MuRF1 est responsable de l'ubiquitinylation de la troponine I (Kedar et al., 2004), de certaines myosines (Fielitz et al., 2007), et participe à la régulation du turnover de la titine (McElhinny et al., 2002, 2003).

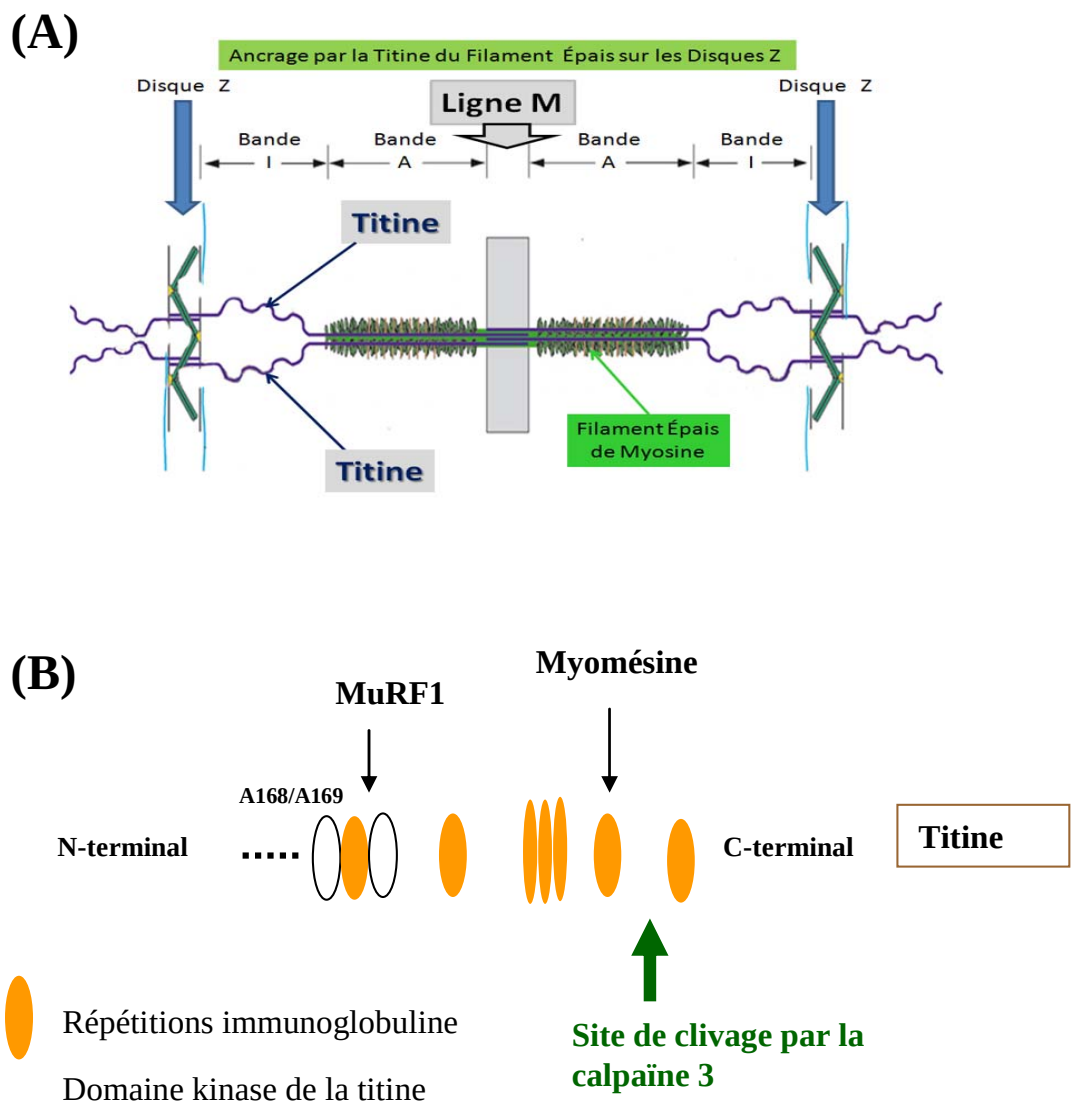


Figure 12. (A) : Schéma représentatif de l'organisation de la titine dans le sarcomère. (B) : Interaction de MuRF1 et la titine (d'après McElhinny et al., 2003 ; Mrosek et al., 2007).

Principaux éléments du sarcomère qui permettent de mieux montrer les rapports entre la Titine (en bleu sur ce schéma), et l'ancrage sur les lignes Z du filament épais dont le composant majeur est la myosine.

Dans les muscles squelettiques et cardiaques de vertébrés, chaque molécule de titine adhère à la myosine des filaments épais sur presque toute sa longueur, et participe à l'élasticité de chaque demi-sarcomère de la ligne M à la ligne Z (**Figure 12A**) (McElhinny et al., 2003). Plusieurs partenaires de la titine ont été identifiés tels que MuRF1 mais aussi la calpaïne 3. MuRF1 s'associe avec la titine au niveau du domaine A168/A169 (Mrosek et al., 2007) c'est-à-dire près du site de liaison de la calpaïne 3 (**Figure 12B**). Ceci serait en faveur d'une interaction entre les différentes voies protéolytiques. MuRF1 pourrait aussi contribuer à réguler la machinerie traductionnelle étant donné que cette protéine interagit avec le facteur d'initiation de la traduction eIF3e (INT6) (Eukaryotic Initiation Factor e) dans des cellules musculaires cardiaques (Witt et al., 2008) même si ces auteurs n'ont pas montré que cela se traduisait par l'ubiquitinylation de eIF3e. Par ailleurs, ces auteurs n'ont pas non plus identifié des interactions entre MuRF1 et d'autres eIFs.

2.4.3.2. MAFbx/Atrogin-1

L'expression de l'ARNm de MAFbx/Atrogin-1(Muscle Atrophy F-box /Atrophy gene-1) est fortement augmentée lors de l'induction de l'atrophie par la dénervation et l'immobilisation (Bodine et al., 2001), le jeûne (Gomes et al., 2001), le diabète (Dehoux et al., 2004), l'urémie (Lecker et al., 2004), le sepsis (Wray et al., 2003) et le traitement avec la dexaméthasone (Frost et al., 2007).

MAFbx est une protéine de 42 kDa à activité E3 ubiquitine ligase. MAFbx comprend un domaine F-box (**Figure 11B**) caractéristique des membres de la famille des protéines faisant partie du complexe SCF (avec pour partenaires Skp1, Cullin, F-box). L'extrémité C-terminale de MAFbx contient un domaine NLS (Nuclear Localization Signal) et des domaines conservés comme PDZ et cytochrome C (Gomes et al., 2001 ; Li et al., 2004). Un motif LZ (Leucine Zipper) et un domaine LCD (Leucine-Charged residue-rich Domain) à l'extrémité N-terminale de MAFbx ont été identifiés (**Figure 11B**) (Tintignac et al., 2005).

Plusieurs substrats de MAFbx ont été identifiés comme la α-actinine et la calcineurine (Li et al., 2004). Au niveau du muscle squelettique, MAFbx via son domaine LCD interagit avec le facteur de transcription myogénique MyoD et permet sa dégradation protéosomale, ce qui a été démontré dans différents modèles d'atrophie musculaire (Lagirand Cantaloube et al., 2009). MyoD jouant un rôle crucial dans la différenciation musculaire, sa dégradation médiée par MAFbx peut avoir des conséquences importantes en termes de plasticité et d'homéostasie musculaire.

Le facteur d'initiation eIF3f est un autre substrat de MAFbx. Des travaux ont montré une interaction physique entre MAFbx et eIF3f, via le domaine LCD de MAFbx et le domaine Mov34 de eIF3f (**Figure 13**) (Lagirand Cantaloube et al., 2008 ; Csibi et al., 2010). MAFbx permet ainsi la polyubiquitinylation de eIF3f et sa dégradation par le protéasome. La partie C-terminale de eIF3f contient 6 lysines, sites de polyubiquitinylation conservés du poulet à l'homme. Une mutation au niveau de ces 6 résidus lysine (mutant eIF3f $K_{5\text{-}10}R$) réduit fortement la polyubiquitinylation médiée par MAFbx (Csibi et al., 2009). Par ailleurs, des expériences réalisées sur des cultures primaires de myotubes ou des muscles *Tibialis anterior* de souris montrent que le mutant eIF3f $K_{5\text{-}10}R$ possède une certaine résistance à l'atrophie musculaire induite par le sevrage ou le jeûne, voire une augmentation de l'activité hypertrophique (Csibi et al., 2009). Ceci est associé à une augmentation de la phosphorylation de la voie mTOR/S6K1 (voir Partie B.II.3.3.) connue pour son rôle dans le contrôle de synthèse protéique.

Ainsi, même si MuRF1 et MAFbx sont deux E3 ubiquitines ligases muscle-spécifiques, toutes deux exprimées dans des conditions cataboliques, la spécificité de leurs substrats fait qu'elles jouent probablement des rôles différents dans le contrôle de la masse musculaire (pour revue Attaix & Baracos, 2010). MuRF1 est clairement impliqué dans la dégradation des protéines myofibrillaires alors que MAFbx agirait plutôt des processus en lien avec la différentiation et la synthèse protéique.

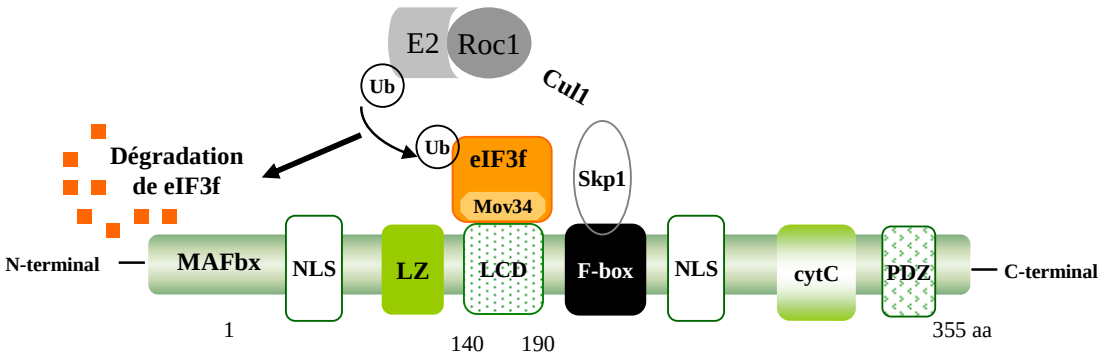


Figure 13. MAFbx interagit avec eIF3f (d'après Bodine et al., 2001 ; Csibi et al., 2010).

Complexe SCF : Roc1, Cul1, Skp1, MAFbx.

E2 : Enzyme de conjugaison.

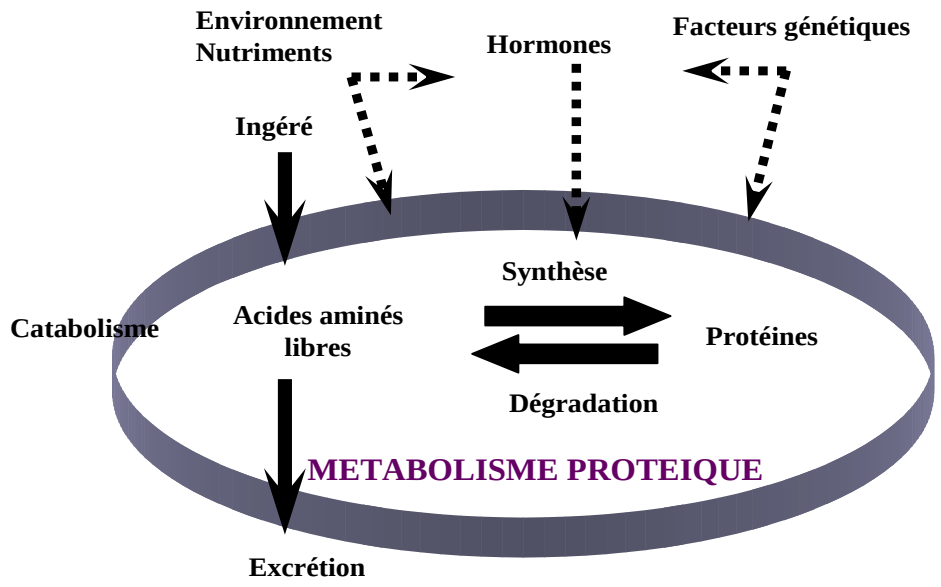


Figure 14. Représentation schématique du renouvellement protéique.

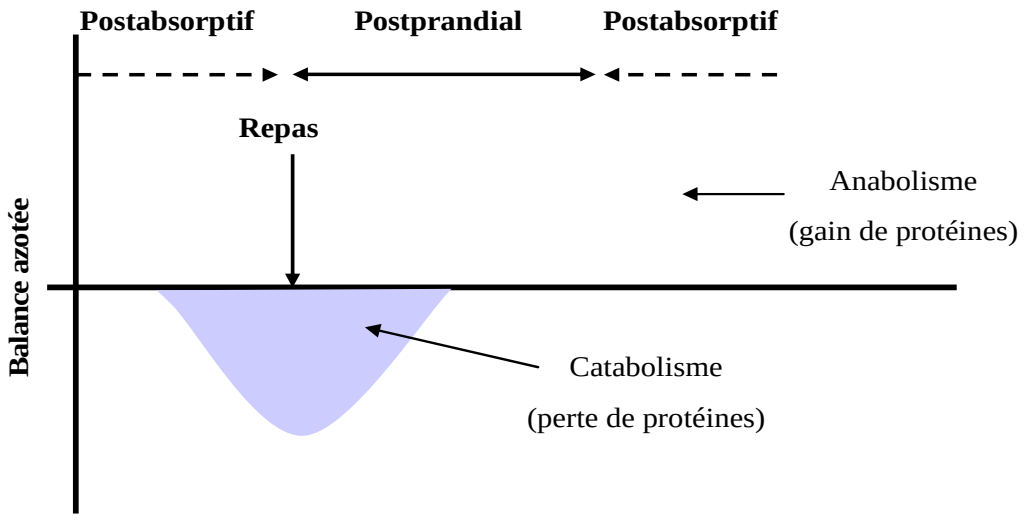


Figure 15. Effet du repas sur la balance azotée musculaire.

L'alternance des périodes postabsorptives et postprandiales conduisent à des pertes et des gains protéiques qui s'équilibrent pour donner une balance azotée de zéro.

Partie B. REGULATION HORMONALE ET NUTRITIONELLE DU METABOLISME PROTEIQUE

Le métabolisme protéique (protéosynthèse et protéolyse) est contrôlé par des facteurs génétiques, physiologiques, hormonaux et nutritionnels (**Figure 14**). Nous ne discuterons dans les paragraphes suivants que les grandes lignes de la régulation nutritionnelle et hormonale en insistant plus particulièrement sur les régulations par les acides aminés et l'insuline. Des facteurs environnementaux tels que la température ambiante (par exemple exposition à la chaleur) pourraient réguler aussi le métabolisme protéique. Ce paramètre sera traité dans la partie C de cette étude bibliographique.

I. Généralités

1. Contrôle nutritionnel

1.1. Effet du repas

En raison de la nature discontinue de l'apport alimentaire, le métabolisme protéique subit l'alternance de périodes postprandiales qui caractérisent les périodes d'absorption des repas, et de périodes postabsorptives qui s'étalent entre la fin de l'absorption d'un repas et le repas suivant (**Figure 15**). Une part réduite des protéines musculaires est perdue lors de la période postabsorptive, immédiatement retrouvée avec la prise du repas suivant, ce qui aboutit à un bilan azoté nul chez un adulte sain. Au niveau du corps entier, pendant la période postabsorptive (i.e. absence d'apports alimentaires), le bilan azoté est négatif car il existe des pertes liées aux besoins métaboliques (Millward, 1998). Les acides aminés sont alors fournis par la dégradation des protéines de l'organisme (Scornik et al., 1997). Pendant la période postprandiale, les apports alimentaires permettent de compenser ces pertes protéiques postabsorptives par le dépôt protéique (Millward, 1998). Signalons que la période postprandiale se caractérise par une stimulation de la sécrétion d'insuline qui va permettre d'orienter l'excès de substrats énergétiques vers le stockage.

Il est important de souligner que le rythme d'ingestion chez les volailles est différent de celui de l'homme. Chez le poulet, l'apport de nutriments est relativement continu avec un état pseudo-stationnaire du turnover protéique (Muramatsu, 1999). En effet, les prises alimentaires ont généralement une durée moyenne très courte de l'ordre de quelques minutes et sont

entrecoupées de périodes plus longues, variant de 15 à 30 minutes selon l'âge des animaux (Weeks et al., 2000 ; Howie et al., 2008). Le rythme d'ingestion des volailles dépend en particulier fortement des conditions d'élevage. Le programme lumineux conditionne l'activité des animaux avec un pic d'ingestion en début et en fin de période éclairée (Buyse et al., 1993 ; Richard et al., 1997) et une consommation faible durant la phase d'obscurité.

1.2. Effet du jeûne

Le jeûne peut se diviser en 3 phases (jeûne court, jeûne prolongé et phase terminale) au cours desquelles la consommation en glucose de l'organisme va diminuer du fait d'une baisse de la dépense énergétique et de la synthèse des corps cétoniques par le foie qui pourront être utilisés par le cerveau. Lors du jeûne court, le bilan azoté est négatif avec des pertes azotées importantes dues à une augmentation de la protéolyse musculaire afin de mobiliser les acides aminés nécessaires à la néoglucogenèse hépatique. Lors d'un jeûne prolongé, l'utilisation des acides aminés comme substrat de la néoglucogenèse est réduite avec une nette réduction de la protéolyse musculaire chez l'homme et chez le rat (Kettelhut et al., 1988). Cette adaptation de l'organisme permet la protection des fonctions cellulaires et une préservation de la masse maigre, le bilan azoté étant « moins négatif ». La phase terminale du jeûne, qui précède la mort, est marquée par une chute de la synthèse protéique et une stimulation de la protéolyse.

1.3. Effet des apports alimentaires

La régulation nutritionnelle du métabolisme protéique dépend également du niveau des apports alimentaires et de leur nature, que ce soit chez les mammifères ou les poulets. Des études déjà anciennes rapportées par Reeds & Fuller (1983) soulignaient l'effet des quantités ingérées sur le dépôt protéique en notant que la vitesse de synthèse paraissait alors être le déterminant majeur contrôlant la masse des protéines corporelles. Concrètement, l'augmentation des quantités ingérées au dessus du niveau permettant l'équilibre du bilan énergétique se traduit par une croissance de la masse protéique corporelle qui correspond à une augmentation simultanée des vitesses de protéosynthèse et de protéolyse (des premières variant de manière plus marquée que les secondes). Au-dessous de l'équilibre énergétique, la perte de protéines est due à une vitesse de synthèse inférieure à celle de la protéolyse. L'augmentation du taux protéique de la ration produit également une augmentation des vitesses de synthèse et de dégradation des protéines corporelles (Reeds et al., 1981 ; Muramatsu et al. 1987 ; Tesseraud, 1995). De manière similaire, au niveau musculaire, des

augmentations des quantités ingérées ou des apports protéiques augmentent aussi la synthèse et la dégradation protéique (Lobley, 1998). L'évolution du dépôt et de la synthèse des protéines peut dépendre des niveaux d'apports protéiques réalisés puisqu'à partir d'une certaine valeur correspondant environ au besoin, aucune augmentation supplémentaire n'est observée (Muramatsu, 1990). Par ailleurs, dans certaines conditions ou plages de variation, il existe une additivité des effets de l'énergie et des protéines (Kita et al., 1993 ; Reeds et al., 1981). L'augmentation de l'énergie ingérée sous forme de glucides ou de lipides provoque une légère augmentation de la protéosynthèse et une diminution de l'oxydation des acides aminés (utilisation des acides aminés à des fins énergétiques), la protéolyse étant quant à elle réduite, surtout lors de supplémentations en lipides. Il est important de rappeler à ce propos que protéosynthèse et protéolyse sont deux processus coûteux en énergie et qu'un défaut d'apport énergétique au niveau du muscle peut *a priori* contribuer à freiner le turnover protéique. La composition en acides aminés des protéines alimentaires joue également un rôle important dans la régulation du métabolisme protéique. Le rôle des acides aminés sera plus spécifiquement détaillé dans la partie B.III.1.

2. Contrôle hormonal

De nombreuses hormones jouent un rôle dans le métabolisme protéique en particulier au niveau du muscle (pour revues Lobley et al., 1998 ; Grizard et al., 1995 ; Rooyackers & Nair, 1997). Ces hormones peuvent être anabolisantes favorisant le gain protéique ou catabolisantes favorisant la perte protéique. Des hormones anabolisantes telles que l'insuline, la GH (Growth Hormone), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1), stéroïdes sexuels, etc. agissent sur le turnover protéique en stimulant la protéosynthèse et/ou en inhibant la protéolyse. L'action anabolique de l'insuline sur le renouvellement protéique est détaillée dans les paragraphes suivants. En ce qui concerne les hormones cataboliques, le glucagon et les glucocorticoïdes favorisent la fonte musculaire en stimulant la protéolyse et/ou inhibant la protéosynthèse. L'effet des hormones thyroïdiennes est quand à lui plus complexe car il dépend de leur dose. A des concentrations modérées, ces hormones auraient un effet catabolique en favorisant la synthèse protéique. Elles sont d'ailleurs considérées comme des hormones essentielles à la croissance et au développement. En revanche en cas d'hyperthyroïdie, la fonte musculaire observée serait principalement due à une protéolyse accrue. Il existe des fortes interactions entre les systèmes endocriniens en terme de régulation du métabolisme protéique. Par exemple, l'hormone de croissance GH stimule la synthèse protéique musculaire en partie via IGF-1 (Millward, 1999).

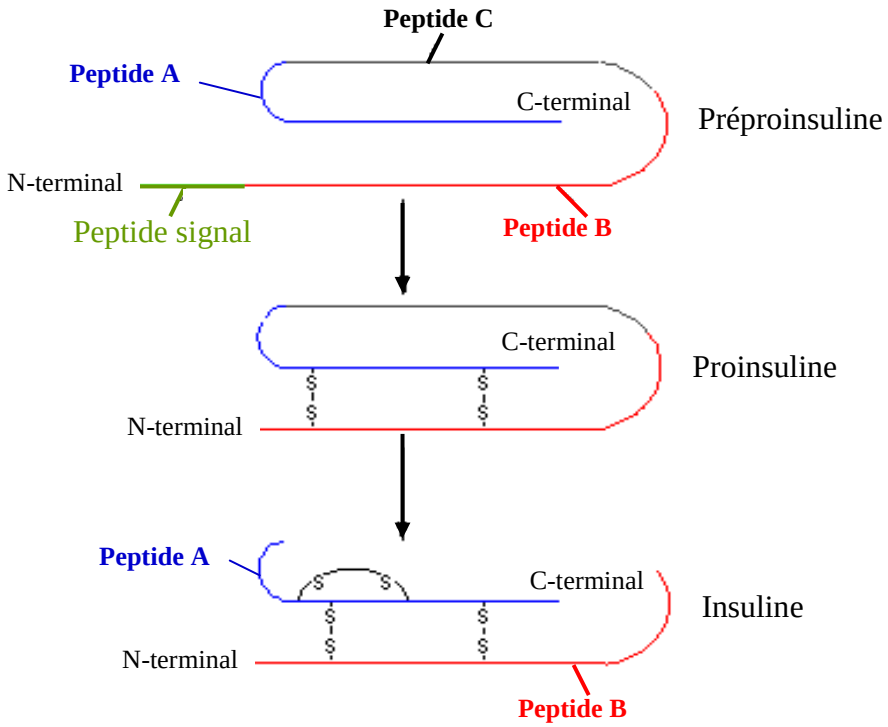


Figure 16. Schéma représentatif de la synthèse et la structure de l'insuline (Smith, 1966 ; De Meyts, 2004).

La structure primaire de l'insuline du poulet diffère de l'insuline humaine par 7 acides aminés figurés en violet.

- **Peptide A** (21 acides aminés) :

Gly- Ile- Val- Glu- Gln- Cys- Cys- His- Asp- Thr- Cys- Ser- Leu- Tyr- Gln- Leu- Glu- Asn- Tyr- Cys- Asn

- **Peptide B** (31 acides aminés) :

Ala- Ala- Asn- Gln- His- Leu- Cys- Gly- Ser- His- Leu- Val- Glu- Ala- Leu- Tyr- Leu- Val- Cys- Gly- Glu- Arg- Gly- Phe- Phe- Tyr- Ser- Pro- Lys- Ala-Thr

On peut également rapporter des modifications de l'effet de l'insuline en fonction du statut en glucocorticoïdes ou en hormones thyroïdiennes : effet moindre de l'insuline dû au glucocorticoïdes (Louard et al., 1994) ou au contraire supérieur dans le cas d'hyperthyroïdisme (Tauveron et al., 1995). Les mécanismes d'action de ces hormones sont parfois très bien décrits comme pour l'insuline (voir ci-dessous).

II. L'insuline

1. Structure et sécrétion

L'insuline de poulet, dont la séquence est connue depuis 1966 (Smith, 1966) présente comme l'insuline de mammifères 2 chaînes polypeptidiques : A (21 acides aminés) et B (31 acides aminés) reliées entre elles par 2 ponts disulfures. La séquence d'acides aminés de l'insuline du poulet est différente de l'insuline porcine ou bovine par 6 acides aminés localisés sur le peptide A en position 8, 9 et 10 et sur le peptide B en position 1, 2 et 27 (Smith, 1966) (**Figure 16**). Du fait de sa structure, l'insuline du poulet est peu reconnue par la plupart des anticorps préparés contre des insulines humaine, bovine et porcine. Chez le poulet adulte à jeun l'insulinémie est d'environ 3 à 4 ng/ml. Le poulet présente une glycémie à jeun d'environ 2 g/l et une relative résistance à l'insuline exogène malgré une insuline endogène plus active que l'insuline des mammifères *in vitro* et *in vivo* (Cramb & Langslow, 1984 ; Simon, 1989).

Lors de sa synthèse, l'insuline est sous forme de préproinsuline (**Figure 16**). Cette protéine présente une séquence hydrophobe (peptide signal) qui lui permet de traverser les membranes intracellulaires. Suite à son transport, l'insuline subit un clivage du peptide signal, formant la proinsuline. La proinsuline est stockée au niveau de vésicules liées à la membrane des cellules pancréatiques. Il se produit une excision du peptide C formant l'insuline mature.

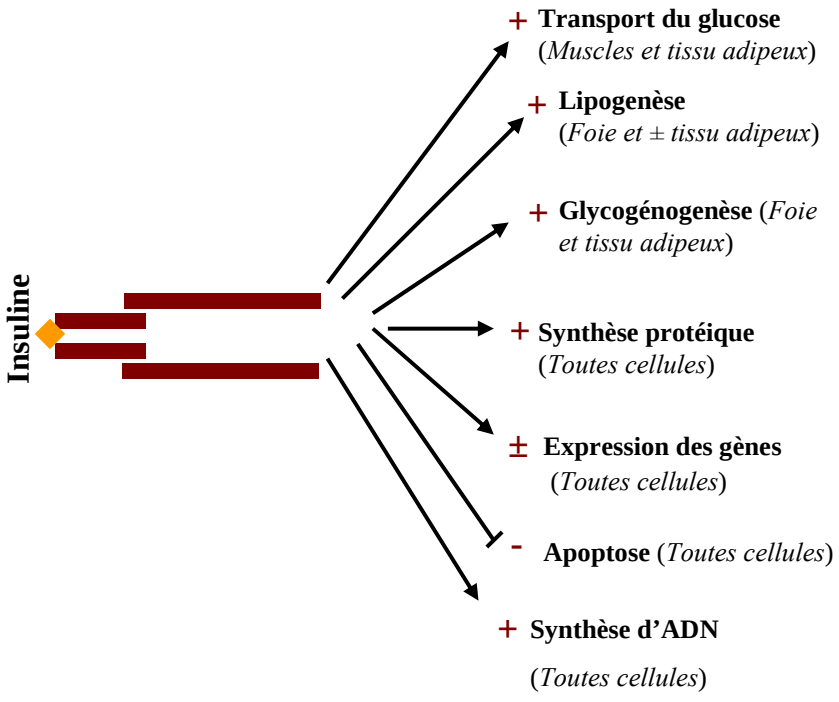


Figure 17. Effets pléïotropes de l'insuline (d'après Capeau, 2003).

En se fixant sur son récepteur spécifique, l'insuline exerce ses effets dans de nombreux tissus, ses trois principaux tissus cibles étant le foie, le tissu adipeux et les muscles.

2. Rôle de l'insuline

L'insuline exerce des effets pléiotropiques c'est-à-dire qu'elle exerce de nombreuses fonctions et intervient dans la régulation des métabolismes glucidique, lipidique et protéique (**Figure 17**). Elle joue un rôle anabolique majeur au niveau de l'organisme, dans la mise en réserve et l'utilisation des substrats énergétiques : transport du glucose, synthèse de glycogène et lipogenèse, inhibition de la glycogénolyse, de la néoglucogenèse et de la lipolyse (Capeau, 2003), et dans la régulation de l'accrétion protéique.

Il a été clairement montré que l'insuline stimule *in vitro* la synthèse protéique, y compris dans l'espèce aviaire dans des fibroblastes d'embryon, des cellules de coeur, des myoblastes et des myotubes de muscles squelettiques (pour revue Simon, 1989 ; Tesseraud et al., 2007b). La stimulation par l'insuline reste plus difficile à démontrer *in vivo* que *in vitro.* Par exemple, si l'insuline corrige la réduction de la synthèse protéique observée chez les rats diabétiques, elle est incapable de stimuler la synthèse protéique chez les témoins. Ceci revient à dire que le maximum de stimulation serait atteint pour des insulinémies physiologiques, et qu'une augmentation de l'insuline plasmatique n'aurait alors aucun effet. Signalons que l'effet positif de l'insuline sur la protéosynthèse est plus facile à monter sur animal en croissance. L'insuline stimule la protéosynthèse en agissant à plusieurs niveaux. Elle régule de façon spécifique la transcription d'un grand nombre de gènes. Elle contrôle la quantité de ribosomes en stimulant la traduction des protéines ribosomales et la transcription des ARNr. Elle active les étapes d'initiation et d'élongation de la traduction des ARNm en protéines (pour revue Tesseraud et al., 2007a).

Par ailleurs, l'insuline inhibe la protéolyse *in vitro* et au niveau du corps entier (Grizard et al., 1999 ; Tesseraud et al., 2007b). Même si les mécanismes responsables de l'effet anti-protéolytique de l'insuline ne sont pas encore clairement élucidés, l'insuline agirait sur différentes voies protéolytiques. De manière intéressante, il a été montré que l'insuline, comme l'hormone apparentée IGF-1, régule l'expression de 2 gènes importants dans le contrôle de la voie ubiquitine protéasome-dépendante, MuRF1 et Atrogin-1 (Sacheck et al., 2004 ; Tesseraud et al., 2007b).

3. Signalisation de l'insuline

L'insuline exerce ses effets en activant son récepteur, enclenchant ainsi une cascade de signalisations intracellulaires. Les deux principales voies de signalisation stimulées par

l’insuline sont : la voie PI3K/Akt (Phosphoinositol 3-Kinase/Protein Kinase B (PKB)) et la voie MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase). La voie PI3K/Akt conduit à des effets métaboliques de l’insuline, régulant en particulier l’utilisation du glucose et la synthèse protéique. La voie MAPK est plus impliquée dans la régulation de la croissance, de la différenciation et de la prolifération cellulaire. La voie des MAPK ne sera pas détaillée dans cette revue bibliographique.

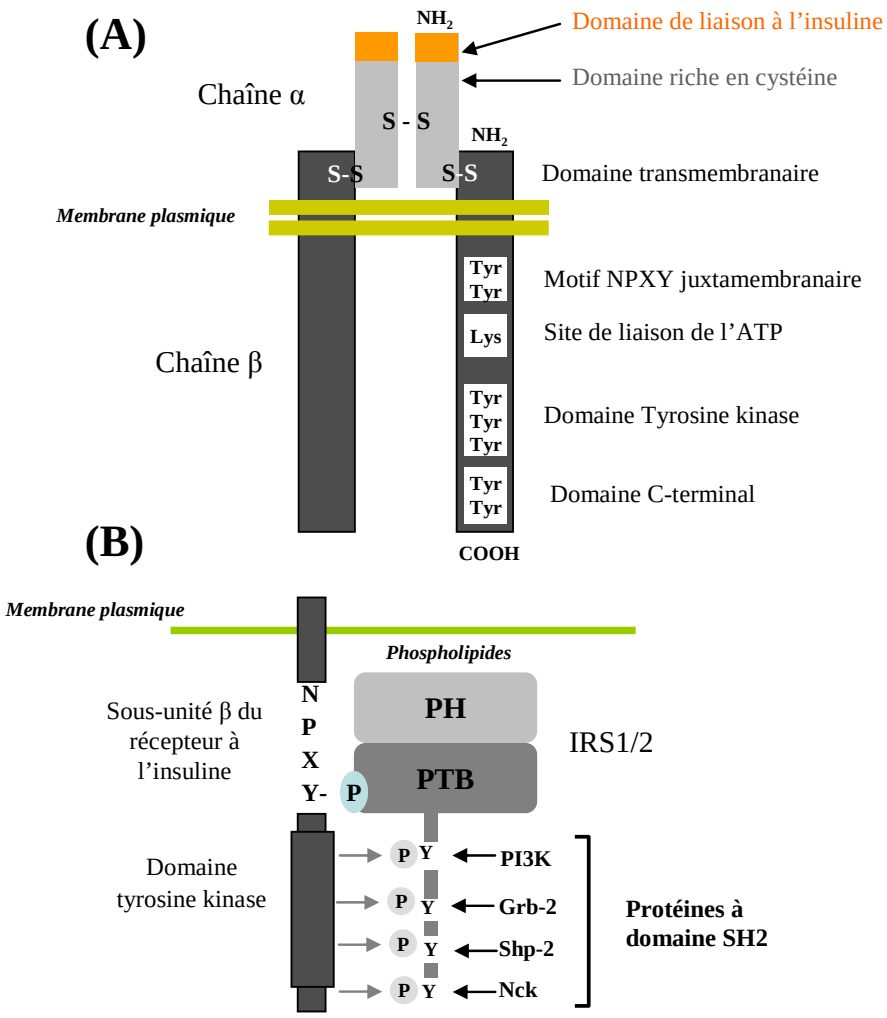


Figure 18. (A) : Structure du récepteur de l'insuline (B) : Interaction avec son substrat IRS1/2 (d'après Watson et al., 2004 ; Taniguchi et al., 2006).

(A) : L'insuline se lie à la sous-unité α qui elle active la sous-unité β transmembranaire. Les sous-unités sont reliées entre elles par des ponts disulfure (S-S).

Le récepteur de l'insuline est reconnu par les protéines IRS sur une Tyr-P et phosphoryle sur Tyr les protéines IRS.

(B) : La protéine IRS-1 interagit à son extrémité N-terminale avec la membrane (domaine PH) et avec le récepteur de l'insuline au niveau juxtamembranaire (domaine PTB).

Le domaine tyrosine kinase du récepteur phosphoryle des résidus Tyr de IRS-1 qui agissent comme des sites d'ancrage de plusieurs protéines à domaine SH2, par exemple la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K).

3.1. Récepteur à l'insuline

Le récepteur à l'insuline (RI) est constitué de 4 peptides glycosylés reliés par des ponts disulfures formant une glycoprotéine d'environ 400 kDa (**Figure 18A**) (Watson et al., 2004). Le récepteur à l'insuline du poulet a une structure très proche de celle des mammifères : Deux sous-unités extracellulaires α (d'environ 135 kDa) sont à la surface de la membrane cellulaire et assurent la fixation de l'hormone grâce à leur partie glucidique. Deux sous-unités transmembranaires β (d'environ 95 kDa) ont une activité enzymatique de type protéine kinase. L'ensemble des 4 sous-unités appartient à la famille des récepteurs qui possèdent une activité tyrosine kinase.

Chez le poulet, les récepteurs à l'insuline présentent également une activité de type tyrosine kinase. Ils possèdent une affinité similaire à celles des récepteurs humains (Simon, 1989 ; Kato et al., 2000). En revanche, les récepteurs à l'insuline sont moins nombreux dans le foie et le thymus de poulet que chez le rat (Simon et al., 1977).

3.2. Substrats du récepteur à l'insuline IRS

La transmission du signal insulinique dans la cellule met en jeu des modules protéiques de reconnaissance présents sur les protéines substrats et capables de les positionner à proximité du récepteur activé. Parmi les substrats protéiques identifiés, notons en particulier la famille des IRS (Insulin Receptor Substrate) et Shc (Src homology and collagen protein). Il existe 4 isoformes de IRS : IRS-1, IRS-2, IRS-3 et IRS-4. Les protéines IRS ont une structure primaire commune, présentant dans leur région N-terminale un domaine PH (Pleckstrin Homology) suivi d'un domaine PTB (Phosphotyrosine Binding domain) responsables de l'interaction de la protéine avec le résidu phosphotyrosine présent dans la partie juxtamembranaire de la sous-unité β du récepteur à l'insuline (**Figure 18B**) (Taniguchi et al., 2006). La région C-terminale de IRS contient de nombreux résidus tyrosines qui sont phosphorylés par le récepteur à l'insuline (**Figure 19**). IRS-1 semble avoir un rôle majeur dans le muscle et le tissu adipeux, alors que IRS-2 joue un rôle prépondérant dans le foie et le pancréas (pour revue White, 2002). L'activation de IRS-1/IRS-2 conduit à l'activation de voies de signalisation impliquant les kinases PI3K (Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase) et Akt (Protein Kinase B).

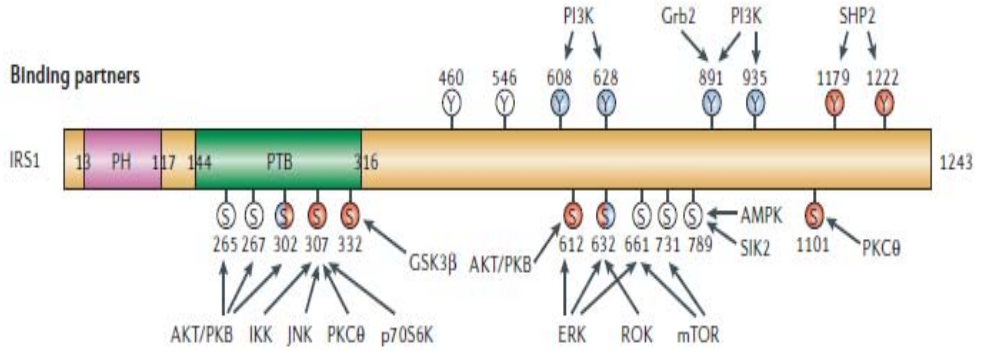


Figure 19. Structure de substrat du récepteur à l'insuline, IRS-1 et ses différents sites de phosphorylation (d'après Taniguchi et al., 2006).

Le domaine PH (Pleckstrin-Homology) permet la fixation à la membrane plasmique.

Le domaine PTB (Phosphotyrosine-Binding) participe à l'association avec le récepteur à l'insuline.

IRS1 est phosphorylé sur plusieurs résidus sérine, par exemple, sur Ser661 et Ser731 par mTOR et sur Ser1101 par PKC (Protein Kinase C).

IRS-1 du poulet présente une haute identité avec son homologue de rat, de souris et humain (Taouis et al., 1993). Il est présent dans le foie et le muscle du poulet et interagit avec le récepteur à l'insuline (Dupont et al., 1998a). De façon intéressante, la phosphorylation sur résidus tyrosines de IRS-1 est dépendante de l'état nutritionnel dans le foie mais pas dans le muscle, suggérant une relative résistance à l'insuline dans les muscles du poulet (Dupont et al., 1998b, 2004). Une étude plus récente Duchêne et al. (2008) a montré que l'insuline et la réalimentation régulent la phosphorylation de IRS-1 sur résidus sérines (Ser636/639) mais pas sur résidus tyrosines dans le muscle pectoral du poulet. Les muscles du poulet présentent donc une absence de phosphorylation sur résidus tyrosines de IRS-1. Chez les mammifères, la phosphorylation de IRS-1 sur résidus sérines peut limiter la capacité de l'insuline à stimuler la phosphorylation de cette protéine sur des résidus tyrosines. Chez l'homme, la phosphorylation sur des résidus sérine des protéines IRS favoriserait l'état d'insulino-résistance (Um et al., 2006 ; Gual et al., 2005 ; Tremblay et al., 2007).

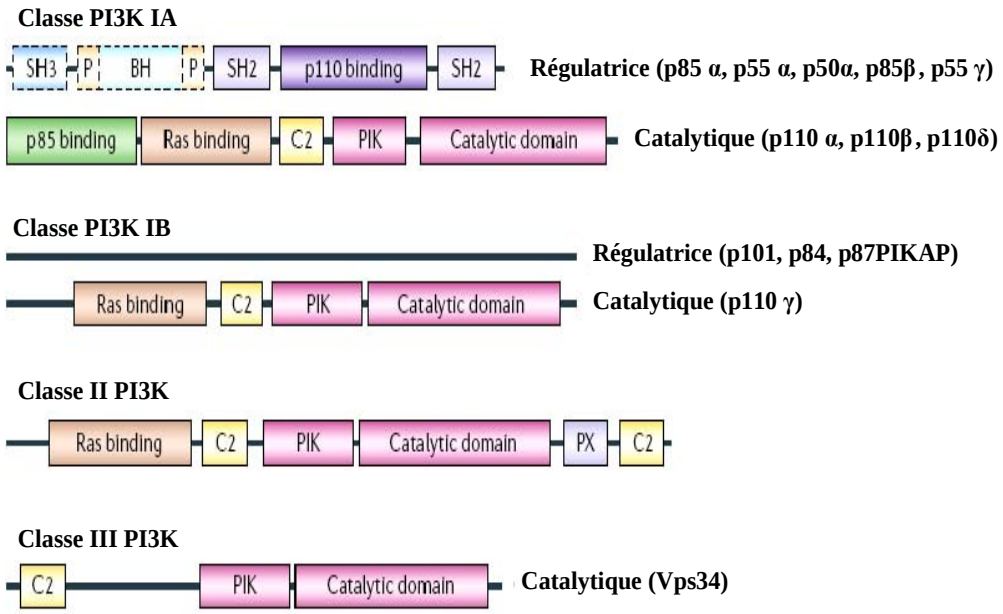


Figure 20. Classification des membres de la famille des phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) (d'après Engelman et al., 2006).

La figure représente de manière schématique la structure des domaines des sous-unités régulatrices et catalytiques des PI3K de classes I, II et III.

Les protéines Shc sont également des substrats du récepteur à l'insuline, qui comme les IRS possèdent un domaine PTB (Gustafson et al, 1995). Elles sont en amont de la voie ERK/MAPK, et ne seront donc pas détallées ici. Nous précisons juste quelques particularités existant chez le poulet. Dans la lignée cellulaire dérivée d'hépatome de poulet (ligné LMH), la répression de IRS-1 provoque une augmentation de l'expression de Shc (Taouis et al., 1998). Shc est phosphorylé sur résidus tyrosine et activé en réponse à l'insuline, et cela aussi bien dans le foie que dans le muscle de poulet (Dupont et al., 1998a, 2004). Shc semble être un substrat clé pour le récepteur à l'insuline chez le poulet.

3.3. Voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR

3.3.1.Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase (PI3K)

Les PI3K (Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase) représentent une famille de protéines kinases qui phosphorylent les phospholipides membranaires, les PI (phosphoinositides), sur la position 3 du groupement inositol. Les PIPs (Phosphatidylinositol Phosphates) sont impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques telles que la prolifération, la survie cellulaire et le métabolisme (Lindmo & Stenmark, 2006). Les PI3K ont été classifiées sur la base de leur structure et leur spécificité de substrat en trois classes I, II et III (Vanhaesebroeck et al., 1997) (**Figure 20**).

Dans cette revue bibliographique nous nous focaliserons sur les PI3K de classe I, principalement impliquées dans la signalisation de l'insuline. Les PI3K de classe II et III jouent un rôle moindre dans la régulation du métabolisme par l'insuline.

Les PI3K de classe I sont des enzymes hétérodimériques induisant la production de PI(3)P (Phosphatidylinositol 3-phosphate), $PI(3,4)P_2$ (Phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate) et $PI(3,4,5)P_3$ (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate). Les PI3K de classe I sont divisées en deux sous-classes : Les PI3K IA qui sont activés par des récepteurs de type RTK (Receptor Tyrosine Kinases) et les PI3K IB qui sont activées par des GPCR (G Proteine Coupled Receptors) (Leevers et al., 1999 ; Kok et al., 2009). Les PI3K IA forment un hétérodimère entre la sous-unité régulatrice p85 et la sous-unité catalytique p110. Il existe 5 isoformes de la sous-unité régulatrice p85α, p55α, p50α, p85 et p55γ et 3 isoformes de la sous-unité catalytique p110δ, p110α et p110β. Les PI3K IB sont constituées uniquement de la

sous-unité catalytique p110γ associée à l'une des trois protéines régulatrices p101, p84 et p87PIKAP.

Les PI3K de classe II sont des monomères qui existent sous la forme de 3 isoformes catalytiques PI3KC2α, PI3KC2β et PI3KC2γ mais pas de sous-unité régulatrice. Les PI3K II catalysent la production de PI(3)P et se caractérisent par la présence d'un domaine C2 en position C-terminale liant le Ca^{2+} (**Figure 20**) (pour revue Engelman et al., 2006 ; Falasca et al., 2007).

Les PI3K de classe III, comme les PIK3 de classe I, sont hétérodimériques. Elles possèdent une sous-unité catalytique Vps34 (Vacuolar protein-sorting-associated protein 34) et une sous-unité régulatrice p150. Elles produisent uniquement des PI(3)P à partir de PI (Leevers et al., 1999). Elles sont impliquées essentiellement dans le trafic vésiculaire et dans la transduction du signal par les acides aminés (Byfield et al., 2005) (voir partie B. III.2.1.).

Dans les paragraphes suivants, nous détaillerons la mode d'activation de la PI3K de classe I sous sa forme la plus connue p110 : p85 et en mettant l'accent sur les particularités du modèle poulet. L'activation du récepteur de l'insuline conduit à la phosphorylation d'IRS-1 qui est ensuite responsable de l'activation de PI3K. La PI3K est recruté au niveau de IRS-1 par une reconnaissance entre le domaine SH2 de sa sous-unité régulatrice p85 et le motif YMXM ou YXXM d'IRS-1 (Taniguchi et al., 2006).

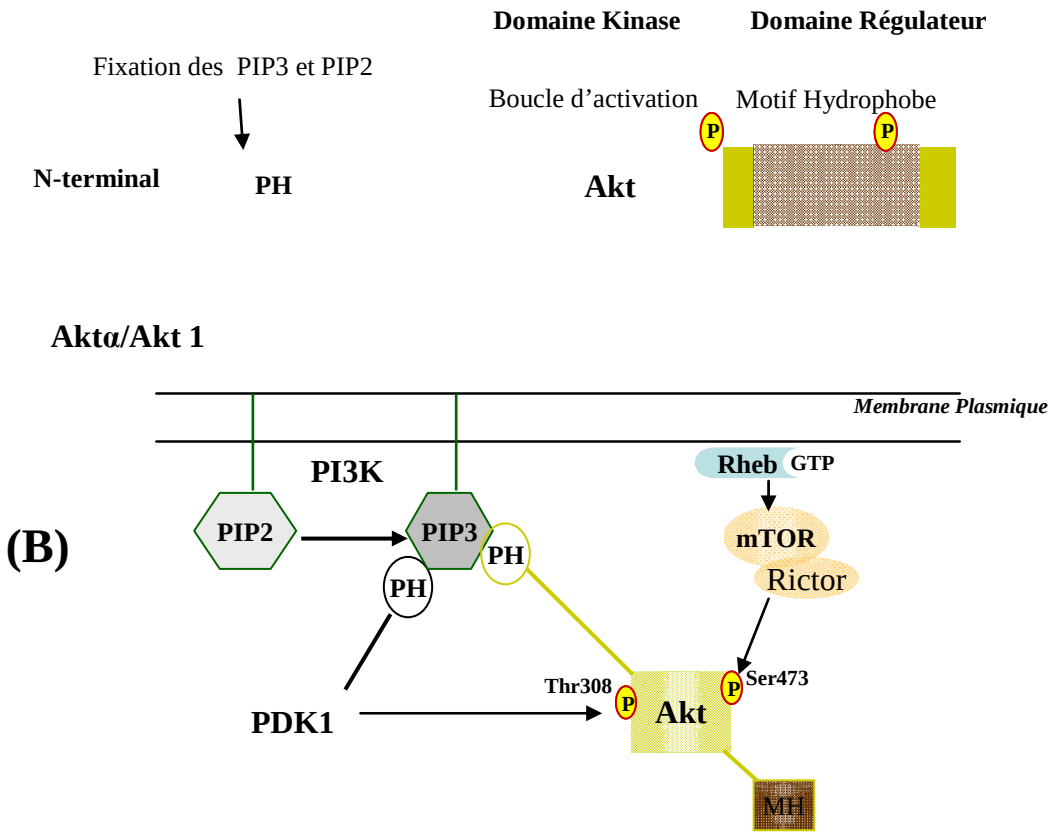


Figure 21. Représentation schématique de la structure (A) et de l'activation d'Akt (B) (d'après Franke et al., 1997 ; Sarbassov et al., 2005).

(A) : Les kinases Akt possèdent un domaine PH permettant la fixation à la membrane plasmique, un domaine kinase ou catalytique et un domaine régulateur.

(B) : La PI3K activée phosphoryle PIP2 en PIP3. Akt et PDK1 sont recrutés à la membrane par une interaction entre leur domaine PH et le PIP3.

Akt est activée par phosphorylation sur résidu Thr308 situé dans son domaine catalytique par l'intermédiaire de PDK1, et sur résidu Ser473 par le complexe mTOR/Rictor.

Cette liaison induit un changement de conformation de la sous-unité p85 puis de la sous-unité catalytique p110 et ainsi l'activation de PI3K (Taniguchi et al., 2006). La PI3K activée induit la formation de PIP3, permettant ainsi le recrutement au niveau de la membrane plasmique des protéines à domaine PH. L'effecteur le mieux caractérisé de la PI3K est la sérine/thréonine kinase Akt, qui joue un rôle dans les voies de transduction du signal de l'insuline.

Chez le poulet, la PI3K a été caractérisée *in vitro* dans la ligné cellulaire LMH (Taouis et al., 1998) et *in vivo* dans le muscle et le foie (Dupont et al., 1998a). Différentes études ont montré que l'activité de PI3K dans le foie du poulet dépend de l'état nutritionnel (jeûne *vs*. réalimentation) ou de l'insulinémie dans différents modèles expérimentaux (Dupont et al., 1998b, 1999a&b, 2004, 2008). Ceci est en accord avec les modifications des autres éléments de la cascade de signalisation de l'insuline (RI, IRS-1 et Shc), selon l'état nutritionnel. En revanche, l'activité de PI3K au niveau du muscle est non régulée dans différentes conditions expérimentales y compris celles modifiant la sensibilité à l'insuline telles que le traitement chronique à la corticostérone ou l'utilisation de lignés génétiquement maigres ou grasses (Dupont et al., 1999a&b). En plus, l'activité de PI3K dans le muscle de poulet est supérieure à celle du rat (Dupont et al., 2004). Cette hyperactivité de la PI3K observé dans le muscle du poulet pourrait stimuler une boucle de rétrocontrôle inhibitrice de la voie, par phosphorylation de IRS-1 sur résidus sérine (cf partie IRS-1) (Um et al., 2006).

3.3.2.La protéine kinase B (Akt)

L'Akt est une sérine/thréonine kinase de 60 kDa appartenant à la famille des kinases AGC (cAMP-dependent protein kinase (PKA)/protein kinaseG/protein kinase C (PKC)) (pour revue Parker & Parkinson, 2001). Les mammifères ont trois gènes Akt codant les isoformes Akt1, Akt2 et Akt3 ou PKBα, PKBβ et PKBγ (pour revue Vanhaesebroeck & Alessi, 2000). L'extrémité C-terminale d'Akt possède une forte homologie avec la PKA et la PKC. Son extrémité N-terminale possède un domaine PH (**Figure 21A**) qui est connu pour interagir avec les phosphoinositides et par lequel Akt lie le PIP3 qui l'active (pour revue Hanada et al., 2004). Cette interaction entre le domaine PH et les phosphoinositides permet un changement de la conformation d'Akt, démasquant ainsi le résidu Thr308, contenu dans la boucle d'activation du domaine kinase, la rendant apte à être phosphorylée par PDK1 (3-Phosphoinositide Dependent protein Kinase-1) (Song et al., 2005). Akt nécessite aussi la phosphorylation d'un autre résidu Ser473, situé dans l'extrémité régulatrice C-terminale

(**Figure 21B**) (Franke et al., 1997). Sarbassov et al. (2005) ont démontré un mécanisme de régulation d'Akt sur ce résidu par le complexe mTORC2.

Dans les espèces aviaires, Akt a été identifié *in vitro* (Igea et al., 2001 ; Johnson et al., 2001) et *in vivo* dans le muscle pectoral de poulet (Bigot et al., 2003). Chez le poulet comme chez le mammifère, l'activation de cette kinase par l'insuline est corrélée à sa phosphorylation sur les résidus Ser473 et Thr308 (Vivanco & Swayers, 2002 ; Tesseraud et al., 2007a ; Duchêne et al., 2008). Cette protéine est régulée par la réalimentation et l'insuline malgré une absence de stimulation des éléments précoces de la voie de signalisation de l'insuline dans le muscle du poulet (e.g. phosphorylation sur résidus tyrosine de IRS-1, activité PI3K…).

L'activation d'Akt induit la phosphorylation en aval de la cascade de plusieurs substrats (protéines kinases, protéines de signalisation et facteurs de transcription) impliqués dans la régulation du transport de glucose, de la synthèse de glycogène, de la prolifération et la survie cellulaire, la synthèse protéique, l'expression des gènes, etc. Ainsi Akt phosphoryle la protéine GSK-3 (Glycogen Synthase kinase-3) sur Ser21 pour la GSK3α et sur Ser9 pour la GSK-3β rendant ces dernières inaptes à phosphoryler et inactiver la GS (Glycogen Synthase) ce qui conduit à augmenter la synthèse de glycogène (pour revue Hajduch et al., 2001). GSK3 est surtout connue pour son rôle dans le métabolisme glucidique mais elle est aussi impliquée dans la régulation de la traduction en phosphorylant et inhibant eIF2B (Welsh et al., 1996). La déphosphorylation d'eIF2B induite par l'inhibition de GSK3 restaure son activité, ce qui permet d'augmenter le recyclage de eIF2/GDP en eIF2/GTP, à utiliser dans un nouveau cycle de traduction. Akt a comme autres substrats impliqués dans le contrôle de la synthèse protéique les protéines TSC1 et TSC2 (Tuberous Sclerosis Protein 1&2) (Inoki et al., 2002 ; pour revues Glass, 2003 ; Bolster et al., 2004), en amont de la voie mTOR (mammalian Target of Rapamycin).

Par ailleurs, en plus de son rôle majeur dans la régulation la croissance et la synthèse protéique, Akt est un médiateur contrôlant la dégradation des protéines. L'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt prévient l'induction de gènes médiateurs de l'atrophie musculaire (atrogènes : MuRF1 et Atrogin-1). Le mécanisme de cette inhibition implique en particulier l'inactivation médiée par Akt des facteurs de transcription de la famille FoxO.

3.3.3. Akt régule les facteurs de transcription FoxO

L'insuline régule la transcription en influençant notamment l'expression, la localisation et l'activité des facteurs de transcription. Les facteurs FoxO (Forkhead box Other class) sont caractérisés par un domaine de liaison à l'ADN appelé Forkhead. Chez les mammifères et chez l'homme, la famille des FoxO compte 4 membres : FoxO1 ou FKHR (Forkhead Homolog in Rhabdmyosarcoma), FoxO3 ou FKHRL1, FoxO4 ou AFX et FoxO6 dont l'expression est restreinte au système nerveux, au thymus et aux reins (pour revue Naïmi & Van Obberghen, 2008). Les facteurs FoxO participent à plusieurs processus cellulaires, comme la réponse au stress oxydatif, la croissance cellulaire, l'apoptose (Kops et al., 2002 ; Tran et al., 2003), mais aussi le contrôle des atrogènes.

En réponse à l'insuline ou aux facteurs de croissance (IGF-1), la protéine kinase Akt activée phosphoryle directement FoxO sur trois résidus (Thr32, Ser253 et Ser315 pour FoxO3), conduisant ainsi à la séquestration de ces facteurs de transcription dans le cytoplasme et l'inhibition de l'activité transcriptionelle (Arden, 2004 ; Greer & Brunet, 2008). D'après de récents travaux, les phosphorylations de Akt pourraient être indépendante, ce qui déterminerait la spécificité des substrats. Par exemple, Akt phosphorylé sur Thr308 entraînerait la phosphorylation de FoxO1 sur Ser256, alors que sa phosphorylation sur Ser473 serait responsable de la phosphorylation d'autres substrats dont la Thr24 de FoxO1 (pour revue Brunet, 2004). La déphosphorylation de FoxO permet son entrée dans le noyau où il agit comme activateur de la transcription, contrôle l'atrophie musculaire et l'apoptose (Ramaswamy et al., 2002) et comme montré récemment, l'autophagie (Mammucari et al., 2008). Chez le poulet, les FoxO sont régulés aussi par l'état nutritionnel (jeûne *vs*. réalimentation) (Nakashima et al., 2006). Par exemple, chez le jeune poulet, la réalimentation, en augmentant l'insulinémie stimule la phosphorylation de FoxO1.

L'activité transcriptionelle des facteurs FoxO est dépendante de la présence de co-régulateurs, tels que la PGC-1α (Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1 alpha) qui agit comme un co-activateur de FoxO1 (pour revue Puigserver, 2005).

3.3.4. TSC1/2 et Rheb

Akt inactive par phosphorylation le complexe TSC1/TSC2 (Tuberous Sclerosis Complexe 1/2). TSC1/2 est composé des protéines TSC1 ou hamartine (130 kDa) et TSC2 ou

tubérine (200 kDa), qui ont été identifiées dans la pathogenèse de la sclérose tubéreuse. La délétion d'une ou des deux protéines du complexe induit le développement de tumeurs bénignes (hamartomes) (Napolioni & Curatolo, 2008). TSC2 possède dans son extrémité C-terminale un domaine d'activation des protéines à activité GTPasique (GAP, GTPase Activating Protein) comme la petite GTPase Rheb (Ras Homolog Enriched in Brain) (pour revue Bai & Jiang, 2010). Lors d'une stimulation par l'insuline, Akt phosphoryle la protéine TSC2 sur résidus Ser939 et Thr1432, ce qui provoque la dissociation du complexe TSC1/2 et lève son effet inhibiteur sur mTOR (Inoki et al., 2002 ; Roux et al., 2004 ; Ballif et al., 2005 ; pour revue Kwiatkowski & Manning, 2005). TSC2 est donc un régulateur négatif de mTOR. L'inactivation du complexe TSC1/TSC2 augmente le rapport Rheb-GTP/Rheb-GDP ce qui augmente l'activité de Rheb et induit la phosphorylation de mTOR (Sancak et al., 2007). La protéine Rheb est donc un régulateur positif de mTOR, agissant en aval de TSC1/TSC2. Le mécanisme exact par lequel Rheb régule mTOR n'est pas clarifié. Il semblerait cependant que ce mécanisme implique la protéine FKBP38 (FK506 Binding Protein 38) et le PLD1 (Phospholipase D1) (pour revue Sun & Chen, 2008 ; Bai et al., 2007). FKBP38 est un inhibiteur de mTOR dont l'affinité est également forte pour Rheb-GTP. L'augmentation du taux relatif de Rheb/GTP permet sa dissociation de mTOR et son activation.

3.3.5. La protéine kinase mTOR

Dans les années 1970, la rapamycine a été identifiée chez *Streptomyces hygroscopicus.* Lors d'un screening de résistance à la rapamycine chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, deux gènes TOR1 et TOR2 (Target of Rapamycin 1/2) ont été identifiés (Helliwell et al., 1994). Très rapidement, l'homologue mammifère a été identifié et cloné : mTOR (mammalian Target of Rapamycin) (Brown et al., 1994). Un homologue aviaire de mTOR a été identifié et caractérisé chez les oiseaux (Tesseraud et al., 2003 ; Duchêne et al., 2008).

La protéine mTOR appelée également FRAP (FKBP-RAP Associated Protein), RAFT1 (RAP FKBP12 Target) ou RAPT1 (RAP Target) est une sérine/thréonine kinase d'environ 289 kDa de la famille des PIKK (Phosphatidylinositol 3-Kinase-related protein Kinase), dont le domaine kinase C-terminal présente une homologie avec les PI3K. Cependant, il n'existe aucune activité kinase sur les lipides à la différence des PI3K (Abraham, 2010). La protéine mTOR peut être phosphorylée sur de multiples résidus dont Ser2448, Ser2481, Thr2446 et Ser1261 (Bai et al., 2010).

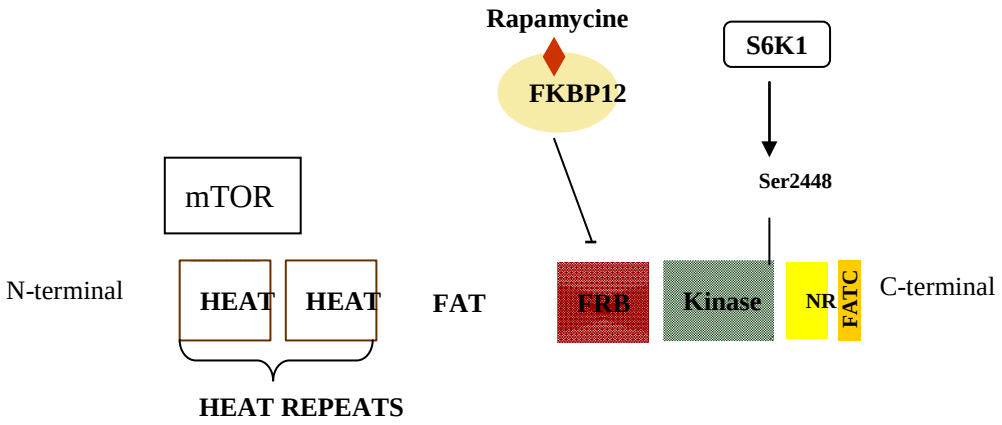


Figure 22. Représentation schématique de la structure de mTOR (d'après Bai & Jiang, 2010).

L'extrémité N-terminale de la protéine se compose de plusieurs répétitions du motif HEAT, suivies de domaine FAT, du domaine FRB, du domaine kinase et en C-terminal du domaine FATC.

Le complexe FKBP12-Rapamycine se lie directement à mTOR via le domaine FRB et inhibe la signalisation cellulaire qui se trouve en aval de mTOR.

Parmi ces résidus, la Ser2448 est connue depuis longtemps comme cible de la voie PI3K/Akt (Navé et al., 1999 ; Sekulic et al., 2000 ; Reynolds et al., 2002). La structure de mTOR comporte différents domaines très conservés.

Le domaine N-terminal, composé de plus de 20 motifs HEAT (Huntingtin Elongation factor3 A subunit of PP2A TOR) répétés en tandem et impliqués dans les interactions protéine-protéine, est suivi d'un domaine FAT (FRAP ATM TRRAP) (**Figure 22**). Le domaine FRB (FKBP12 Rapamycin Binding Domain) est nécessaire à l'interaction de mTOR avec le complexe Rapamycine-FKBP12 (FK506-Binding Protein 12). En effet, la rapamycine agit par la formation d'un complexe inhibiteur avec FKBP12, qui se fixe au niveau du domaine FRB de mTOR, conduisant à son inactivation (pour revue Bai & Jiang, 2010). La partie C-terminale de mTOR porte le domaine kinase. Le domaine NR ou RD (Repressor Domain), situé à l'extrémité C-terminale est un domaine auto-inhibiteur. Il est suivi du domaine FATC (FAT C terminus) nécessaire à l'activité kinase de mTOR.

mTOR se présente en association avec d'autres protéines partenaires sous la forme de deux complexes protéiques : mTORC1 (mTOR Complex 1) et mTORC2 (mTOR Complex 2). Parmi les partenaires, mTORC1 comprend la protéine Raptor (Regulatory-Associated Protein of TOR) alors que mTORC2 comprend Rictor (Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR).

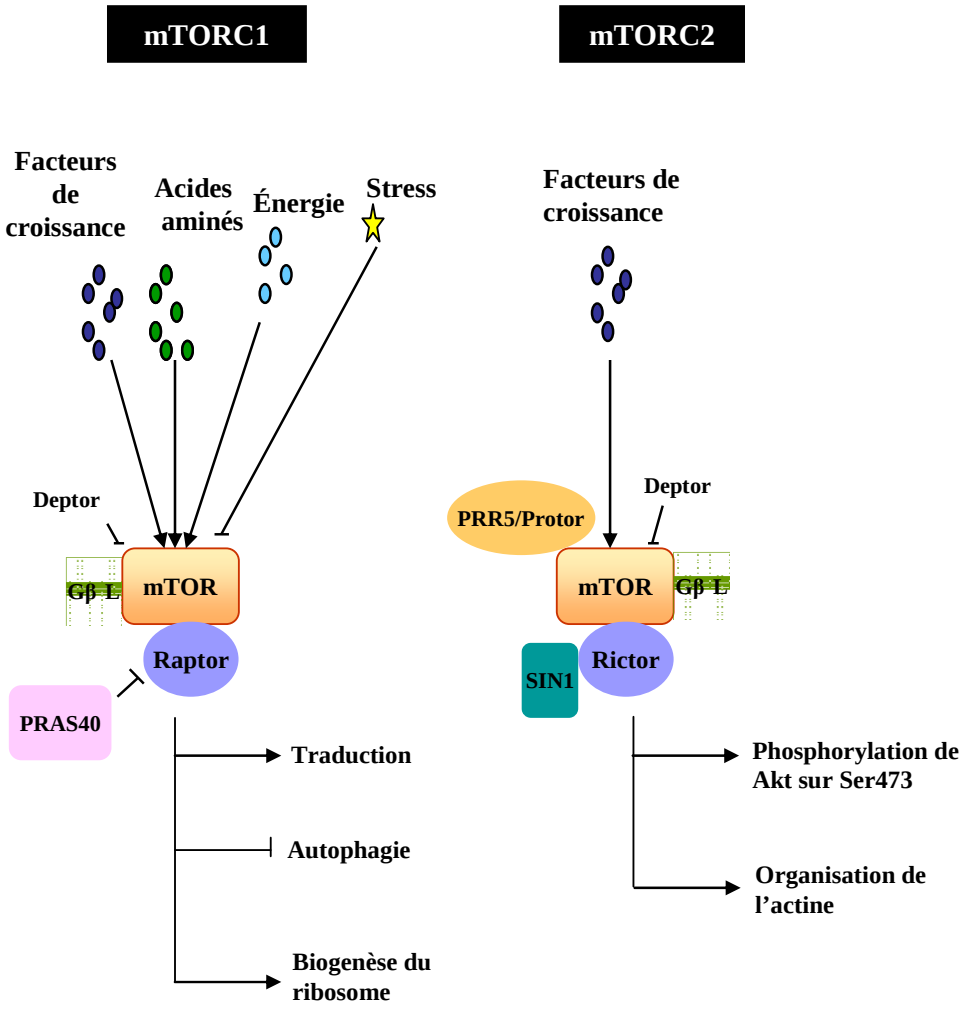


Figure 23. Représentation schématique de la structure des complexes mTORC1 et mTORC2 (d'après Foster & Finger, 2010 ; Bai & Jiang, 2010).

Le complexe mTORC1 est impliqué Le complexe mTORC1 est impliqué dans le contrôle de la biogenèse des ribosomes, dans la traduction et dans l'autophagie.

Le complexe mTORC2 est impliqué dans l'organisation de l'actine et permet la phosphorylation d'Akt sur Ser473.

3.3.5.1. Le complexe mTORC1

Le complexe mTORC1 (mTOR Complex 1) sensible à la rapamycine, est composé de mTOR qui correspond à la sous-unité catalytique du complexe, d'une protéine de régulation Raptor, d'une protéine apparentée à la sous-unité β du complexe protéine GβL (G protein β - Subunit-Like Protein) appelée aussi mLST8 (Mammalian Lethal with Sec 13 protein 8), de la protéine PRAS40 (Proline-Rich Akt Substrate 40) et de Deptor (DEP-Domain-Containing TOR-interacting Protein) (pour revues Dunlop & Tee, 2009 ; Bai & Jiang, 2010) (**Figure 23**).

• **Raptor** est une protéine de 150 kDa avec 7 domaines WD40 répétés, et dont le rôle est de recruter les substrats de mTOR qui possèdent des domaines TOS (TOR Signalling) tels que PRAS40, S6K1 et 4E-BP1 (Nojima et al., 2003). Selon Bhaskar & Hay (2007), cette protéine joue un rôle important dans la stabilisation de mTORC1. Par exemple, dans des conditions de privation en nutriments, Raptor se lie avec une haute affinité à mTOR, ce qui le maintient dans une conformation inactive, tandis qu'en milieu riche en nutriments, cette interaction est moins forte, ce qui permet à mTOR de phosphoryler ses cibles (Kim et al., 2002). Raptor peut être phosphorylé sur différents résidus (Foster et al., 2010). L'insuline induit la phosphorylation de Raptor sur résidu Ser863 via la voie PI3K/TSC/Rheb et peut être sur d'autres résidus (e.g. Ser877, Ser696 et Thr706). Cette phosphorylation impliquerait mTOR lui-même, Raptor étant alors un substrat de mTOR en plus d'un de ses partenaires. C'est également le cas de PRAS40, à la fois partenaire et cible de mTOR. Récemment, il a été identifié sur IRS un motif d'interaction avec Raptor (Tazatos, 2009). Ce motif SAIN (Shc and IRS-1 NPXY Binding) permet la phosphorylation mTOR-dépendante de IRS1 sur Ser636 et Ser639.

• **mLST8/GβL** est une protéine de 36 kDa sans activité catalytique, qui interagit notamment avec le domaine kinase de mTOR, via ses domaines WD40 répétés (Smith et al., 1999). La fonction de mLST8/GβL dans le complexe mTORC1 n'est pas bien définie. En particulier, si cette protéine semble nécessaire pour augmenter l'activité kinase de mTOR (Hara et al., 2002), *in vivo*, la perte de cette protéine n'affecte pas l'activité de mTORC1 (Guertin et al., 2006).

• **PRAS40 et Deptor** sont deux régulateurs négatifs de mTORC1 (Peterson et al., 2009). Notons que mTOR peut phosphoryler PRAS40, qui est donc une cible et un partenaire de mTOR. En réponse à une stimulation par l'insuline, Akt peut activer mTORC1 de façon

indépendante du complexe TSC1/TSC2, par la phosphorylation de la protéine PRAS40 en Thr246 (Kovacina et al., 2003 ; Von der Haar et al., 2007). PRAS40 régule négativement l'activité de mTORC1 en inhibant la liaison à ses substrats. Il a été décrit que la surexpression de PRAS40 inhibe les phosphorylations de 4E-BP1 et de S6K1, facteurs impliqués dans la régulation de la traduction. PRAS40 peut interagir directement avec Raptor mais aussi avec mTOR (Sancak et al., 2007).

- **Fonctions de mTORC1**

mTORC1 contrôle la synthèse protéique en phosphorylant directement la kinase S6K1 et le répresseur 4E-BP1 (Hay & Sonenberg, 2004 ; Ma & Blenis, 2009). En plus de son rôle dans la traduction protéique, le complexe mTORC1 est impliqué dans le contrôle de la biogenèse des ribosomes, de l'autophagie et du métabolisme glucidique et lipidique. mTORC1 intègre des signaux issus de facteurs très variés : les facteurs de croissance, les nutriments, le statut énergétique et le stress cellulaire (pour revue Bai & Jiang, 2010) (**Figure 23**). Il est à ce titre reconnu comme un « senseur métabolique ».

3.3.5.2. Le complexe mTORC2

Le complexe mTORC2 (mTOR Complex 2) ou (rapamycin-insensitive companion of mTOR) est composé de mTOR, de la protéine associée à mTOR qui est insensible à la rapamycine Rictor, de mLST8/GβL, de la protéine kinase activée par le stress mSIN1 (mammalian Stress-activated protein kinase [SAPK]-Interacting protein 1) et de PRR5 (appelée aussi protor) et Deptor (**Figure 23**) (pour revue Bai & Jiang, 2010). Certains de ces partenaires sont communs aux 2 complexes mTORC1 et mTORC2.

- **Rictor** (Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR) est une protéine de 200 kDa sans domaine catalytique. Contrairement aux autres protéines associées à mTOR, rictor n'est pas bien conservée parmi les eucaryotes. Sa déplétion résulte en une perte de la polymérisation de l'actine et de la mobilité cellulaire (Jacinto et al., 2004).

- **mLST8/GβL** a probablement un rôle beaucoup plus important dans mTORC2 que dans mTORC1. mLST8/GβL est crucial pour maintenir l'interaction et la signalisation de mTORC2 mais pas de mTORC1, dans les fibroblastes embryonnaires murins. Dans les cellules defécientes en mLST8/GβL, Rictor ne peut pas s'associer à mTOR (Guertin et al., 2006).

• **mSIN1** (SAPK Interacting protein 1), appelée aussi MIP1 (MEKK2 Interacting Protein 1), est une protéine de 70 kDa qui interagit directement avec Rictor mais pas avec Raptor. Chez l'homme, il existe 5 isoformes issues d'un épissage alternatif dont 3 (SIN1.1, SIN1.2 et SIN1.5) peuvent être retrouvées dans le complexe mTORC2 (Frias et al., 2006). En l'absence de SIN1, Rictor ne peut interagir avec mTOR et de la même façon, SIN1 ne peut pas interagir avec mTOR dans des cellules où Rictor n'est pas exprimé (Frias et al., 2006; Jacinto et al., 2006). Récemment, deux nouveaux composants de mTORC2 ont été découverts **PRR5** et son homologue **PRR5L** (PRR5-like). Ces deux protéines s'associent à Rictor ou mSIN1, mais ne semblent pas essentielles ni pour la stabilité du complexe ni pour son activité kinase (Thedieck et al., 2007). Comme pour mTORC1, Deptor inhibe l'activité de mTORC2 (Peterson et al., 2009). C'est actuellement le seul inhibiteur endogène connu de mTORC2.

• **Fonctions de mTORC2**

Le rôle biologique du complexe mTORC2 n'est pas aussi bien connu que celui de mTORC1. mTORC2 est un régulateur essentiel du cytosquelette en contrôlant l'assemblage et le désassemblage des filaments d'actine par un mécanisme impliquant les protéines de la famille de GTPases Rho (Rho, Rac et Cdc42) (Sarbassov et al., 2004). Comme mentionné dans le paragraphe sur Akt, mTORC2 phosphoryle Akt sur Ser473. Cette phosphorylation couplée à la phosphorylation d'Akt sur Thr308 par PDK1 conduit à l'activation d'Akt (Sarbassov et al., 2005). L'inactivation de composants de TORC2 comme Rictor et SIN1 bloque la phosphorylation d'Akt sur Ser473 et de certains substrats d'Akt (Guertin et al., 2006 ; Jacunto et al., 2006).

3.3.6. p70S6K et 4E-BP1 : Effecteurs de mTORC1

3.3.6.1. La protéine kinase p70S6K1 et sa cible la protéine ribosomale S6

La protéine kinase p70S6K, également appelé S6K est une sérine/thréonine kinase de la famille des S6 kinases incluant également $p90^{rsk}$ (90 kDa ribosomale S6 kinase). La forme activée de p70S6K est capable de phosphoryler la protéine ribosomale S6. La p70S6K, cible directe de mTOR est une enzyme clé dans la régulation de la traduction des ARNm en protéines.

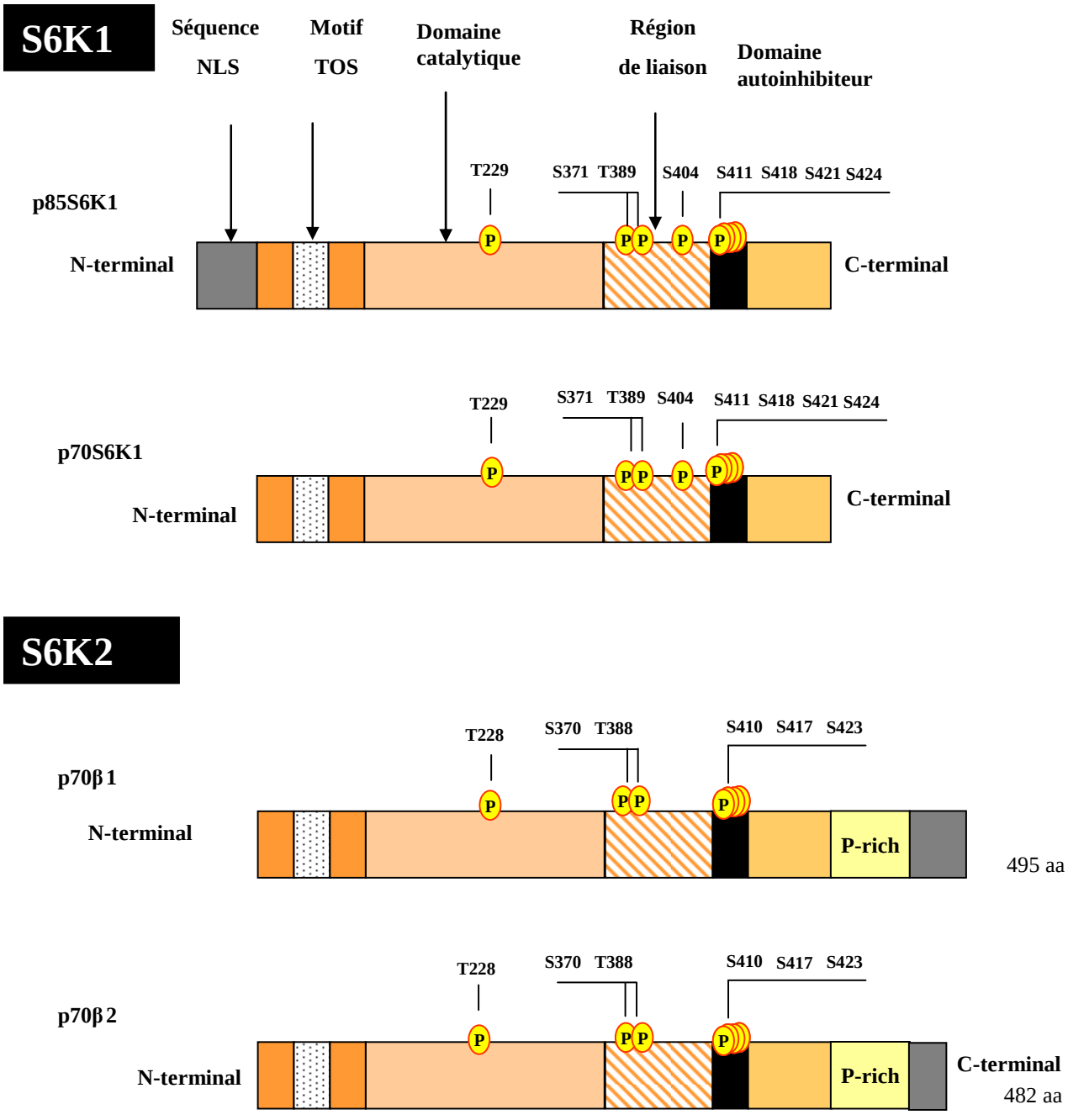


Figure 24. Domaines et sites de phosphorylation de S6K1 et S6K2

(D'après Phin et al., 2003).

Les deux kinases possèdent un motif TOS nécessaire au recrutement de mTOR en N-terminal, un domaine catalytique relié par un domaine de liaison à la région possédant le domaine autoinhibiteur, et des sites de phosphorylation équivalents.

Deux homologues de S6K ont été identifiés, S6K1 et S6K2 codés par deux gènes différents (**Figure 24**) (Ohanna et al., 2005). Le gène S6K1 code deux isoformes, de 70 kDa (p70S6K1) et de 85 kDa (p85S6K1), issues de 2 sites d'initiation de la traduction. S6K2 a été identifié plus récemment que S6K1 et a été moins étudié. S6K2 présente également deux isoformes. S6K1 comme S6K2 est constitué d'un domaine catalytique, d'un domaine de liaison et d'un domaine régulateur localisé en région C-terminale (pour revue Pullen & Thomas, 1997). Ce domaine possède la propriété d'autoinhibition de la kinase. L'extrémité N-terminale possède un motif TOS (TOR Signaling motif), ce qui permet le recrutement de mTOR (Schalm & Blenis, 2002). Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'isoforme p70S6K1 appelée S6K1 tout au long du manuscrit. La S6K1 possède 8 sites potentiels de phosphorylation. Les mécanismes d'activation de la kinase sont très complexes et un modèle communément admis est une phosphorylation séquentielle par mTOR et PDK1. Brièvement, la phosphorylation sur les résidus Thr421/Ser424 est nécessaire pour une modification conformationelle de la kinase, qui permet la phosphorylation de la Thr389 et la phosphorylation de la Thr229 située dans la boucle d'activation. Cependant des donnés récentes indiquent que la phosphorylation de Thr421/Ser424 n'est pas nécessairement concordante avec l'activation de S6K1 (Lecureuil et al., 2005 ; Musnier et al., 2009).

Dans les espèces aviaires, la S6K1 a été caractérisée dans la lignée cellulaire QM7 et dans le muscle squelettique du poulet (Tesseraud et al., 2003 ; Bigot et al., 2003). L'activité enzymatique de la S6K1 est régulée par la réalimentation et l'insuline (Bigot et al., 2003 ; Duchêne et al., 2008). Ces résultats sont surprenants quand on considère la relative résistance du muscle du poulet à l'insuline exogène (Dupont et al., 2004) et l'absence de régulation de la PI3K musculaire (Dupont et al., 1998a). Ceci suggère l'intervention chez le poulet de voies de signalisation ou mécanismes de régulation différents des mammifères.

La protéine ribosomale S6 (30 à 32 kDa) entre dans la composition de la sous-unité ribosomale 40S. La phosphorylation de S6 a été associée à une induction sélective de la traduction des ARNm 5'TOP, famille d'ARNm qui possède une région terminale riche en pyrimidine. Ceci permettrait d'augmenter la capacité à synthétiser des protéines. En effet, les ARNm 5'TOP codent les composants de la machinerie traductionnelle comme les facteurs d'élongation et les protéines ribosomales. Les données plus récentes ne semblent pas conforter le rôle de S6 dans le contrôle de la traduction des ARNm 5'TOP et sont sources d'interrogations sur la fonction de S6. La protéine ribosomale S6 possède plusieurs sites de

phosphorylation dont les principaux sont : Ser235/Ser236, Ser240 et Ser244 en position C-terminale. Chez le poulet comme chez les mammifères, la protéine ribosomale S6 est phosphorylée suite à une réalimentation ou une injection d'insuline (Duchêne et al., 2008).

3.3.6.2. La protéine 4E-BP1

Chez les mammifères, la protéine de liaison 4E-BP (Eukaryotic translation initiation factor 4E-Binding Protein) ou PHAS-1 (Protein Heat and Acid Stable-1) compte 3 protéines 4E-BP1, 4E-BP2 et 4E-BP3 (25 kDa) capables de se lier à eIF4E et d'inhiber la traduction. Le niveau de phosphorylation des 4E-BP contrôle leur association à eIF4E (Yoshizawa, 2004). Par exemple, 4E-BP1 hypophosphorylée interagit avec eIF4E et l'empêche de se combiner avec eIF4G pour former le complexe eIF4F important dans l'initiation de la traduction. A l'inverse, l'augmentation de phosphorylation induite par mTOR suite à un stimulus hormonal comme la stimulation par l'insuline, provoque sa dissociation d'eIF4E.

Chez le poulet, 4E-BP1 est relativement moins bien conservé, comparé aux mammifères, que les kinases ou protéines impliquées dans la voie de la signalisation de l'insuline contrôlant la protéosynthèse (60 à 65% *vs*. 85 à 95% d'identité de séquence en acides aminés pour Akt, TOR, S6K1 et S6) (Duchêne et al., 2008). Cependant, il existe bien une augmentation de phosphorylation de 4E-BP1 en réponse à la réalimentation ou à l'injection d'insuline dans le muscle de poulet.

3.3.7. MuRF1 et Atrogin-1 : cibles de FoxO et/ou mTOR

La voie de signalisation PI3K est impliquée dans l'inhibition induite par l'insuline de la protéolyse, en plus de son effet sur la synthèse protéique (Dardevet et al., 1996). Plus récemment, il a été montré que Akt peut réguler l'expression des E3 ubiquitine ligases MuRF1 et Atrogin-1, qui rappelons-le, sont impliqués dans le contrôle de la voie protéolytique ubiquitine proteasome-dépendante (Nader, 2005 ; Glass, 2005 ; Franch & Price, 2005 ; Szewczyk & Jacobson, 2005). Ces deux ligases muscle-spécifiques sont régulées par l'insuline ou encore IGF-1 via des mécanismes impliquant les facteurs de transcription FoxO et/ou la kinase mTOR (Sandri et al., 2004 ; Sacheck et al., 2004 ; Latres et al., 2005). L'implication potentielle de ces voies dans la régulation de MuRF1 et Atrogin-1 a été également montrée chez les espèces aviaires (Nakashima et al., 2006 ; Tesseraud et al., 2007b, 2009a).

III. Régulation du métabolisme protéique par les acides aminés

1. Rôles des acides aminés

Les acides aminés sont des molécules qui entrent dans la composition des protéines grâce à leur assemblage par des liaisons peptidiques. Leur nom provient du fait qu'ils possèdent une fonction amine (NH_2) et une fonction acide carboxylique (COOH). Ils se distinguent par leur chaîne latérale, qui peut être un simple atome d'hydrogène (glycine), ou bien plus complexe. Les acides aminés sont des régulateurs majeurs de la croissance et du métabolisme protéique (pour revue Hocquette et al., 2007). Rappelons que certains acides aminés sont dits essentiels car ils ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Chez l'homme, l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, le tryptophane et la valine sont toujours essentiels. Cependant, la nature des acides aminés peut varier selon les espèces. Chez le poulet, en plus des 8 acides aminés précédemment cités (i.e. méthionine, lysine, thréonine, tryptophane, leucine, isoleucine, valine et phénylalanine), l'arginine et l'histidine sont considérés comme des acides aminés essentiels.

Les effets des apports en acides aminés sur le renouvellement protéique ont été largement étudiés en utilisant des régimes carencés ou supplémentés en acides aminés ou via des administrations intraveineuses d'acides aminés. Par exemple, les régimes carencés en protéines inhibent la synthèse protéique (Dardevet et al., 2002 ; Tesseraud et al., 1996a, 2009a). L'hyperaminoacidémie induite par une perfusion d'acides aminés augmente à l'inverse la synthèse protéique (Bennet et al., 1989 ; Watt et al., 1992 ; Tesseraud et al., 1993).

Le rôle des acides aminés dans la régulation du métabolisme protéique a aussi été étudié dans des conditions de réalimentation, c'est-à-dire en situation postprandiale. Volpi et al. (1996) ont montré chez des hommes adultes que les acides aminés contribuent pour 90% à l'augmentation de la synthèse protéique suite à un repas avec des niveaux équilibrés de lipides, glucides et protéines. Le fait que les acides aminés soient essentiels à la stimulation postprandiale de la synthèse protéique a aussi été démontré chez le rat (Yoshizawa et al., 1997, 1998) et le poulet (Yaman et al., 2000). La stimulation de la synthèse protéique par les acides aminés est alors associée à une augmentation de l'efficacité de la traduction. Le turnover protéique dépend aussi de l'apport en acides aminés spécifiques, particulièrement en acides aminés limitants. Parmi ces derniers, la méthionine est par exemple le premier facteur

limitant dans des régimes classiques utilisés pour des poulets en croissance à cause d'un besoin élevé en acides aminés soufrés pour la synthèse des plumes alors que les régimes à base de maïs-soja, sans supplémentation, sont déficients en acides aminés soufrés (Baker, 2006).

Chez le poulet, l'effet de la déficience en méthionine et cystéine (précurseur de la méthionine) sur la diminution de gain de poids corporel et d'accrétion protéique est plus prononcé que celui de la déficience en lysine et histidine (Kino & Okumura, 1986). De manière intéressante, la carence en lysine, si elle diminue les performances de croissance et l'accrétion protéique, exerce un effet encore beaucoup plus marqué sur le développement du muscle pectoral (Tesseraud et al., 1996a, 1999). La carence en un des acides aminés essentiels entraîne une diminution des quantités de protéines synthétisées, l'effet étant inversé avec la supplémentation en cet acide aminé déficient. Ainsi, l'addition de méthionine à un régime déficient en méthionine mais bien équilibré pour les autres acides aminés, augmente la synthèse de protéines dans les muscles *Gastrocnemius* (muscle de la patte) et *Pectoralis major* (muscle du filet) chez le poulet (Barnes et al., 1995). La disponibilité en acide aminé affecte non seulement les taux de synthèse protéique, mais peut aussi changer la protéolyse : par exemple, les intensités de protéolyse dans le muscle *Pectoralis major* de poulet sont toujours supérieures chez les animaux carencés en lysine comparé aux témoins, quel que soit l'âge ou le génotype (Tesseraud et al., 1996b, 2001). Par ailleurs, des données récentes ont montré que des variations journalières des apports en lysine modifient l'expression des deux gènes importants contrôlant la voie protéolytique ubiquitine protéasome-dépendante, les E3 ligases Muscle Atrophy F box (MAFbx ou Atrogin-1) et Muscle Ring Finger-1 (MuRF1) (Tesseraud et al., 2009a).

2. Rôle signal des acides aminés

En plus de leur rôle de substrats pour la synthèse protéique, les acides aminés sont des médiateurs ou « molécules signal » agissant sur des kinases intracellulaires impliquées dans les régulations de voies métaboliques dont la phase d'initiation de la traduction des ARNm (pour revue, Jefferson & Kimball, 2003). Le rôle signal des acides aminés a été principalement étudié avec la leucine (acide aminé à chaîne ramifiée) qui est probablement le plus efficace pour stimuler la traduction dans le muscle (Kimball & Jefferson, 2004 ; Yoshizawa, 2004 ; Metayer et al., 2008). La signalisation induite par les acides aminés fait intervenir 2 voies principales impliquant respectivement mTOR et GCN2.

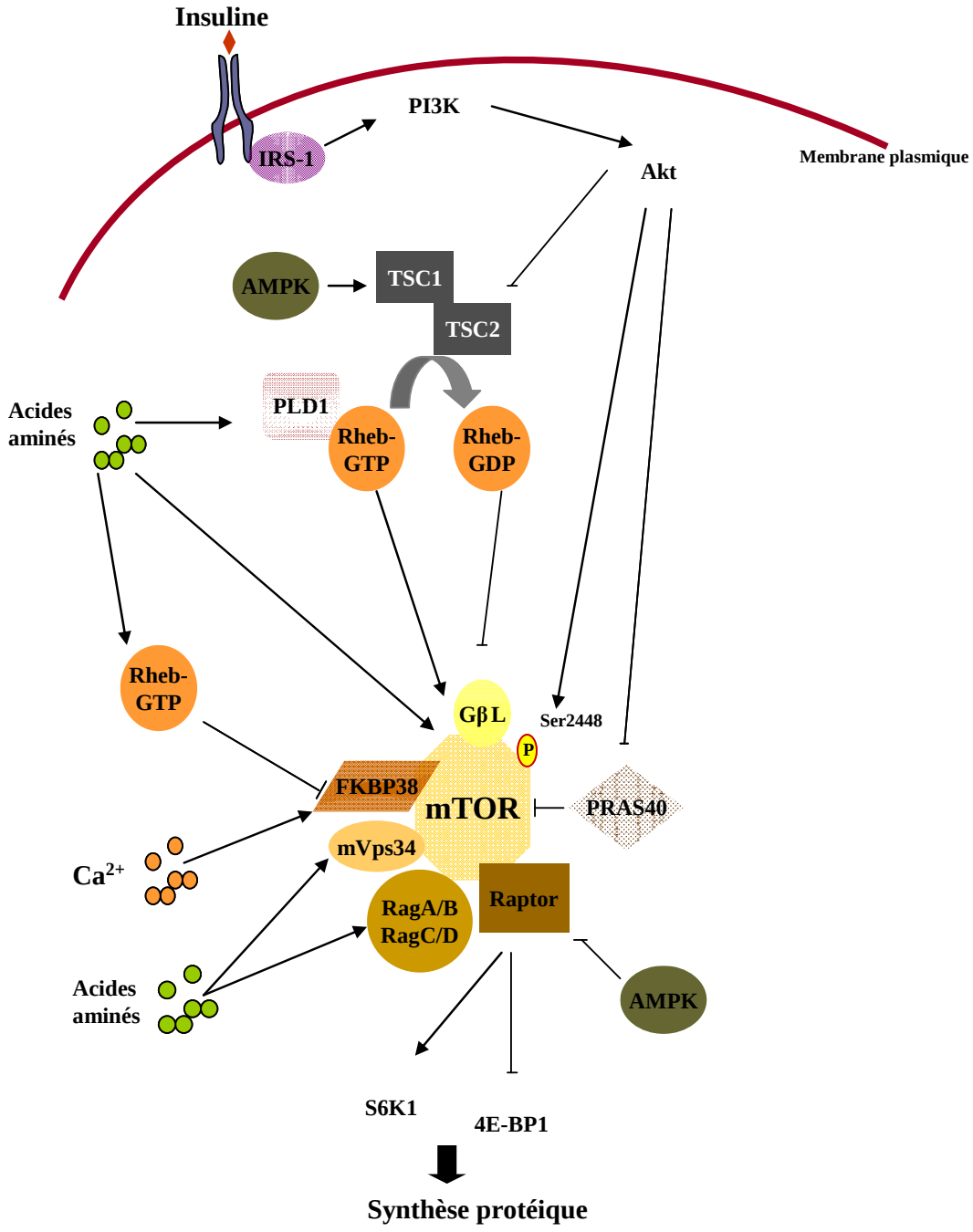


Figure 25. Représentation schématique de la voie de régulation de mTORC1 (mTOR, Raptor, GβL et PRAS40) (d'après Suryawan & Davis, 2010).

2.1. Voie de signalisation impliquant mTOR

De nombreuses études ont clairement montré l'implication de mTORC1 dans la régulation de la synthèse protéique par les acides aminés (**Figure 25**). L'activation de mTORC1 par les acides aminés, à la différence de l'insuline, est indépendante de TSC1/TSC2. Il était ainsi important d'élucider le mécanisme par lequel les acides aminés activent la voie mTOR ainsi que les kinases ou protéines intracellulaires en amont de la cascade. Ce n'est que tout récemment qu'il a été montré l'implication de différentes protéines telles que la PI3K de classe III (Vps34), MAP4K3 et Rag GTPase (Suryawan & Davis, 2010).

- **Vps34**

Des études récentes indiquent que la réponse mTORC1 dépendante aux acides aminés est médiée par la PI3K de classe III Vps34 (Nobukuni et al., 2005 ; Byfield et al., 2005). La protéine Vps34 (Vacuolar Protein Sorting 34), identifiée pour la première fois dans *Saccharomyces cerevisiae* l, est une PI3K de classe III dont la structure a été décrite dans le paragraphe 3.3.1. Les PI3K de classe III existent en tant que hétérodimères avec une sous-unité catalytique (Vps34) et une sous-unité Vps15 (ou p150).

L'hypothèse de l'implication des PI3K dans la régulation de mTORC1 par les acides aminés a été proposée puisque les traitements à la wortmanine (inhibiteur de PI3K) empêchent la stimulation de mTORC1 par les acides aminés (Nobukuni et al., 2005). Cependant, une altération de la régulation de la PI3K de classe I induite par ARNsi bloque l'activation de mTORC1 insulino-dépendante, sans aucun effet sur l'activation de mTORC1 par les acides aminés. Cette observation suggère que l'effet de la wortmanine sur l'activation mTORC1 par les acides aminés est médiée par d'autres PI3K. Les ARNi dirigés contre Vps34 bloquent complètement la phosphorylation de S6K1 en réponse aux acides aminés, suggérant un rôle positif des Vps34 sur mTORC1 (Byfield et al., 2005). Il a été proposé que les acides aminés ne régulent pas directement l'activité de Vps34. Gulati et al. (2008) ont mis en avant un rôle possible du calcium intracellulaire en montrant que l'activation de mTORC1 par les acides aminés est accompagnée d'une augmentation rapide de la concentration intracellulaire de Ca^{2+}. De plus, le traitement des cellules avec le thapsigargine, un inhibiteur de Ca^{2+}-GTPase au niveau du réticulum endoplasmique, qui augmente la concentration en Ca^{2+} dans le cytosol, est capable d'activer mTORC1 en absence des acides aminés. L'hypothèse de mécanisme avancée reposant sur un rôle de Ca^{2+}/CaM (calmoduline) dans la régulation de

l'activité de Vps34 dépendante des acides aminés, a été infirmé dans une étude plus récente qui montre que la régulation de hVps34 exige hVps15 mais pas Ca^{2+}/CaM (Yan et al., 2009).

- **MAP4K3**

Findlay et ses collaborateurs (2007), ont identifié la protéine kinase MAP4K3 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase Kinase 3) comme étant une protéine intracellulaire importante dans la voie de signalisation mTORC1 sensible aux acides aminés. En effet, l'inactivation de la MAP4K3 par ARNsi amoindrit l'activation de la voie mTORC1 par les acides aminés alors que sa sur-expression augmente la phosphorylation de S6K1 et 4E-BP1 de façon PI3K-dépendante et sensible à la rapamycine (Findlay et al., 2007). L'activité de MAP4K3 est insensible à l'insuline et à la rapamycine, suggérant des voies distinctes entre acides aminés et insuline. Le site de phosphorylation Ser170 de MAP4K3 serait impliqué dans l'activation de mTORC1 (Yan et al., 2010).

- **Rag-GTPase**

Il a été démontré récemment que les Rag-GTPases jouaient un rôle important dans le contrôle de mTORC1 par les acides aminés. Les Rag-GTPases (Ras-related GTPase) sont des protéines à activité GTPase. Les protéines se présentent sous deux formes, la forme inactive Ras-GDP et la forme active Ras-GTP. Les GTPases sont une classe importante d'enzymes qui lient et hydrolysent la GTP (Guanosine Triphosphate), pour donner une GDP (Guanosine Diphosphate) et un ion phosphate. Cette hydrolyse est couplée à la transduction du signal dans la cellule.

Chez les mammifères, 4 protéines de Rag ont été identifiées (RagA, RagB, RagC et RagD) (pour revue Sancak & Sabatini, 2009). Les Rag-GTPases fonctionnent comme des hétérodimères composés d'une sous-unité formée de RagA ou RagB et d'une sous-unité formée de RagC ou RagD (Sancak et al., 2008). Kim et al. (2008) ont trouvé que les protéines Rag jouent un rôle important dans l'activation par les acides aminés de mTORC1 dans des cellules de drosophile. Sanack et al. (2008) ont identifié par spectrométrie de masse que RagC se lie à Raptor. Le knock-down des protéines Rag altère la voie de signalisation mTORC1 qui devient insensible à la déplétion en acides aminés (Sancak et al., 2008).

Bien que le mécanisme par lequel les protéines Rag régulent mTORC1 ne soit pas complètement élucidé, des études ont montré que les acides aminés favorisent la translocation de mTORC1 de manière Rag-dépendante, à la surface d'un compartiment endomembranaire où mTORC1 devient accessible à son activateur Rheb (pou revue Laplante & Sabatini, 2009) (**Figure 26**). Dans les cellules mammifères, en l'absence d'acides aminés, mTORC1 est localisé dans le cytoplasme (Sancak et al., 2008). En présence d'acides aminés RagB s'associe avec GTP. Ensuite, l'hétérodimère RagB/GTP interagit avec mTORC1 qui sera localisé au niveau du compartiment où existe Rheb.

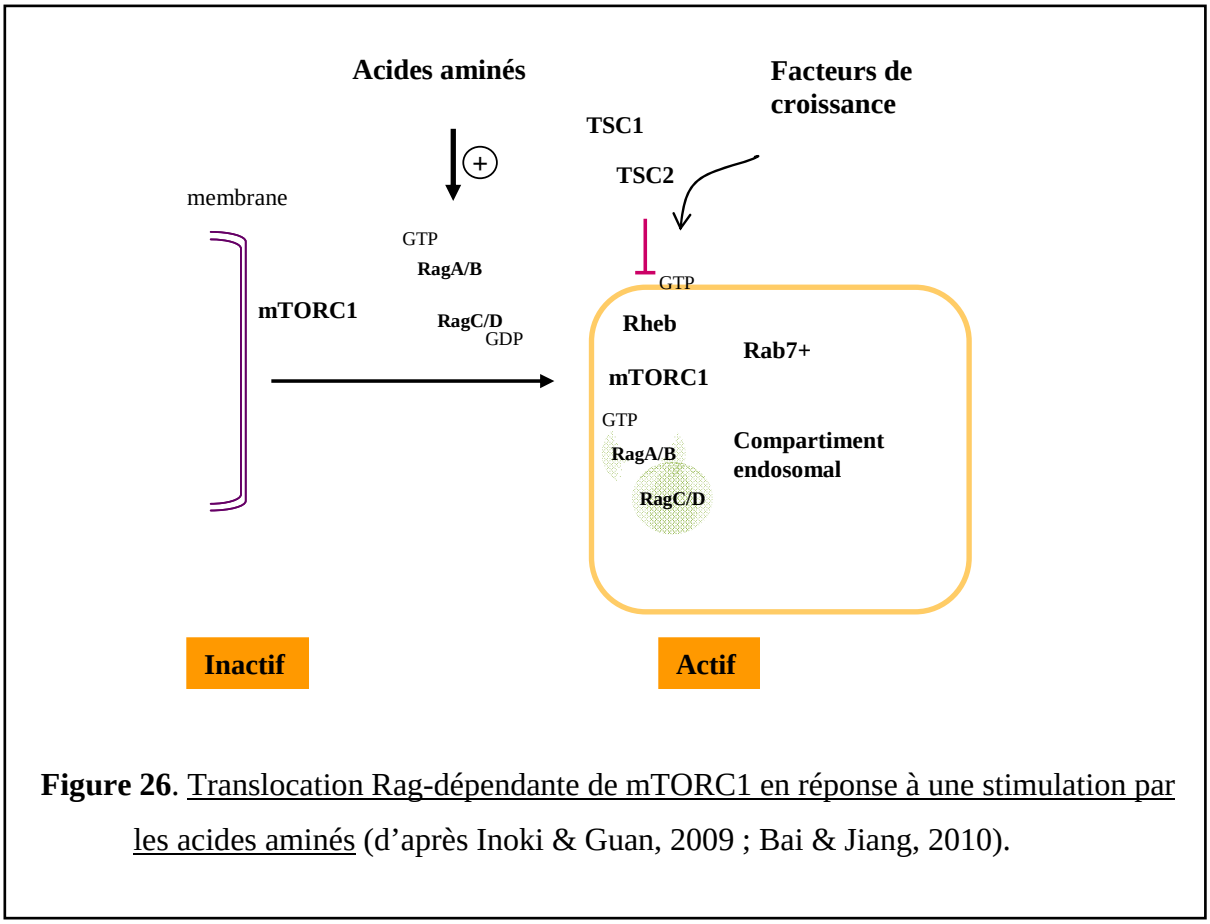


Figure 26. Translocation Rag-dépendante de mTORC1 en réponse à une stimulation par les acides aminés (d'après Inoki & Guan, 2009 ; Bai & Jiang, 2010).

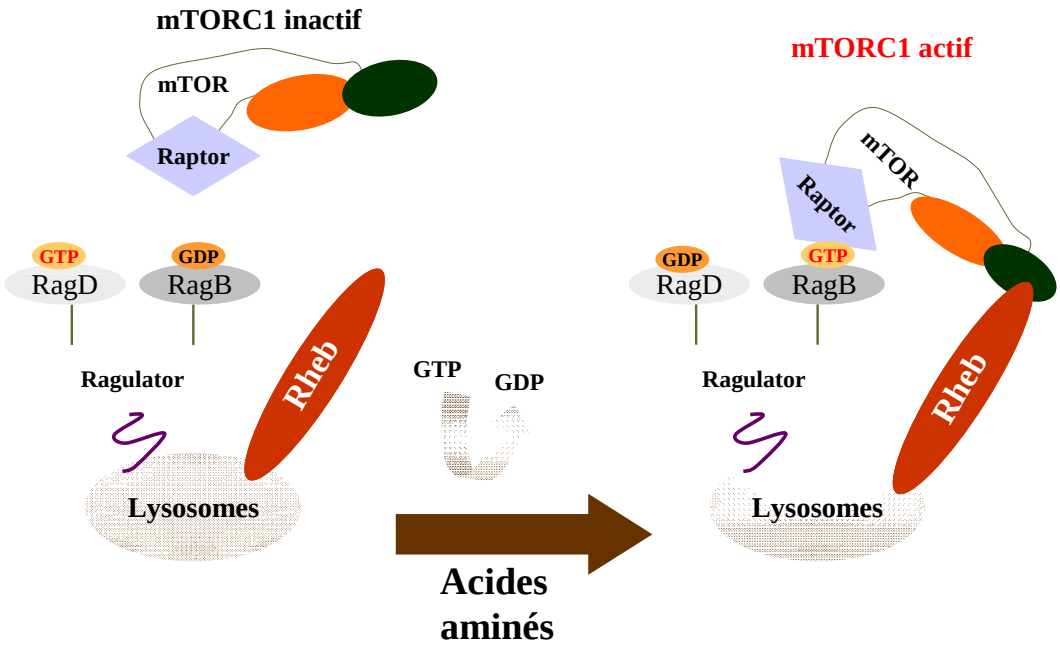


Figure 27. Rôle du complexe Ragulator-Rag dans l'activation de mTORC1 par les acides aminés (d'après Sancak et al., 2010 ; Robert & Abraham, 2010).

- Le complexe Ragulator est composé des protéines MP1, p14 et p18.
- En absence d'acides aminés, mTORC1 ne peut pas s'associer avec le système endomembranaire lysosomal et n'a pas accès à son activateur Rheb.
- En présence d'acides aminés, le complexe Ragulator-Rag, attaché à la surface lysosomale interagit avec Raptor. Ceci permet la fixation de mTORC1 à la surface lysosomal et son activation par Rheb.

Ce recrutement de mTORC1 au niveau des membranes lysosomales semble être une étape essentielle qui est permise grâce à un complexe nommé « Ragulator » et formé de 3 protéines régulatrices MP1, p14 et p18 codées par les gènes MAPKSP1, ROBLD3 et c11 ou f59. Ragulator sert d'échafaudage pour les Rag/GTPases (**Figure 27**). En présence d'acides aminés, le complexe formé interagit avec Raptor. Ceci permet la fixation de mTORC1 à la surface lysosmale où le complexe Rag/GTPase/mTORC1 devient accessible à Rheb.

2.2. La voie de signalisation impliquant GCN2

La protéine sérine/thréonine kinase GCN2 (General Control Nonrepressed 2) est définie comme le senseur du déficit en acides aminés (Qiu et al., 2001 ; Maurin et al., 2005). En effet, GCN2 possède un domaine homologue à ARNt synthétase lui permettant de lier les ARNt non chargés, dont la concentration augmente à l'intérieur de la cellule lors d'une carence en acide aminé. Il résulte de cette liaison un changement conformationnel permissif conduisant à l'autoactivation de GCN2 (pour revue Fafournoux et al., 2009).

GCN2 est exprimée dans de très nombreux tissus, mais avec des niveaux d'expression très variables (Berlanga et al., 1999). Le seul substrat connu de GCN2 est la sous-unité alpha (α) du facteur d'initiation de la traduction eIF2 (Zhang et al., 2002). Chez les mammifères GCN2 n'est pas la seule kinase capable de phosphoryler eIF2α sur Ser51 (**Figure 28**). Trois autres kinases sont capables de phosphoryler eIF2α : HRI (Heme-Regulated Inhibitor) activée lors de carence en hème et pendant le stress oxydatif, PERK (PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase) activée par la présence des protéines incorrectement repliées dans le réticulum endoplasmique et PKR (Protein kinase R) activée par les ARNs double brin. La phosphorylation de eIF2α sur Ser51 va avoir pour conséquence une inhibition de la formation du complexe d'initiation de la traduction, entraînant une forte inhibition de la synthèse protéique. Paradoxalement, cela entraîne également la traduction spécifique de certaines protéines, comme ATF4 (Activating Transcription Factor 4). ATF4, dont la traduction est dépendante des uORFs (upstream Open Reading Frame), peut induire la transcription de gènes cibles possédant dans leur promoteur des éléments de réponse aux acides aminés AARE (Amino Acid Response Element) et qui permettent la protection contre le stress oxydant (Harding et al., 2003 ; Bruhat et al., 2009). Ce mécanisme de régulation spécifique de la traduction permet à la cellule une adaptation rapide de son métabolisme pour contrecarrer les effets de la carence en acides aminés. Peu de données sont actuellement publiées sur les rôles physiologiques de GCN2 chez les mammifères.

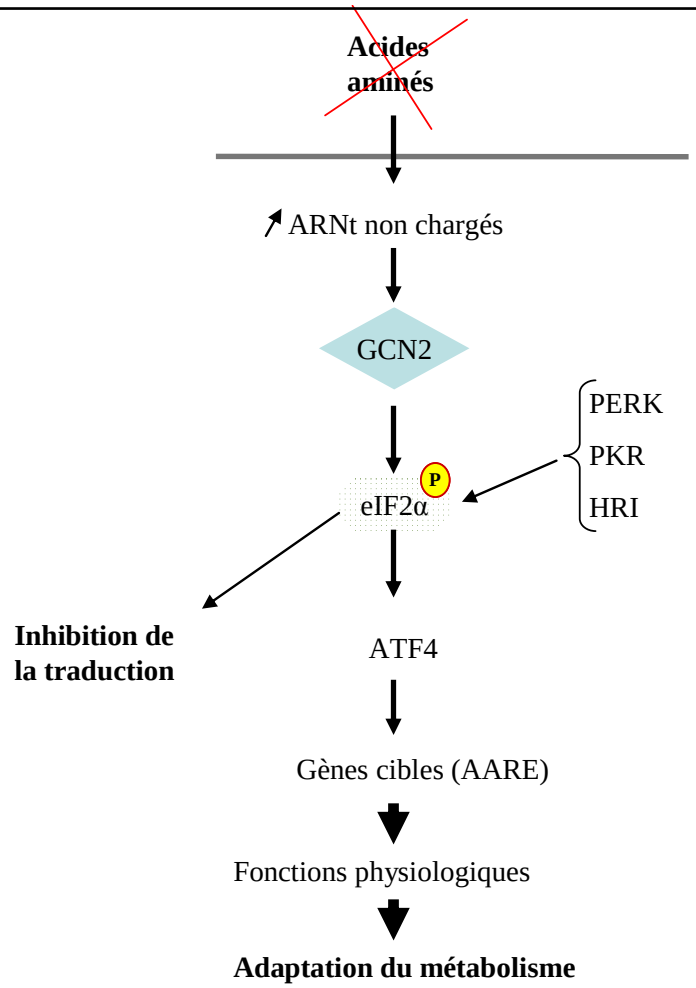


Figure 28. Voie de réponse au stress et aux déficits en acides aminés impliquant la protéine kinase GCN2 (d'après Maurin et al., 2009).

Récemment sont apparues quelques perspectives qui laissent suggérer un rôle très large de GCN2 dans la régulation du métabolisme. En effet, un travail récent met en évidence le rôle de GCN2 dans la régulation du métabolisme lipidique suite à une carence en leucine, qui induit une répression de l'expression et de l'activité de certaines enzymes de la lipogenèse au niveau hépatique de façon dépendante de GCN2 (Guo & Cavener, 2007). Un exemple remarquable reste celui d'un mécanisme induisant les phénomènes d'aversion alimentaire suite à la consommation de régimes dépourvus en un acide aminé essentiel (Peel et al., 2001 ; Yan et al., 2002 ; Berlanga et al., 2010).

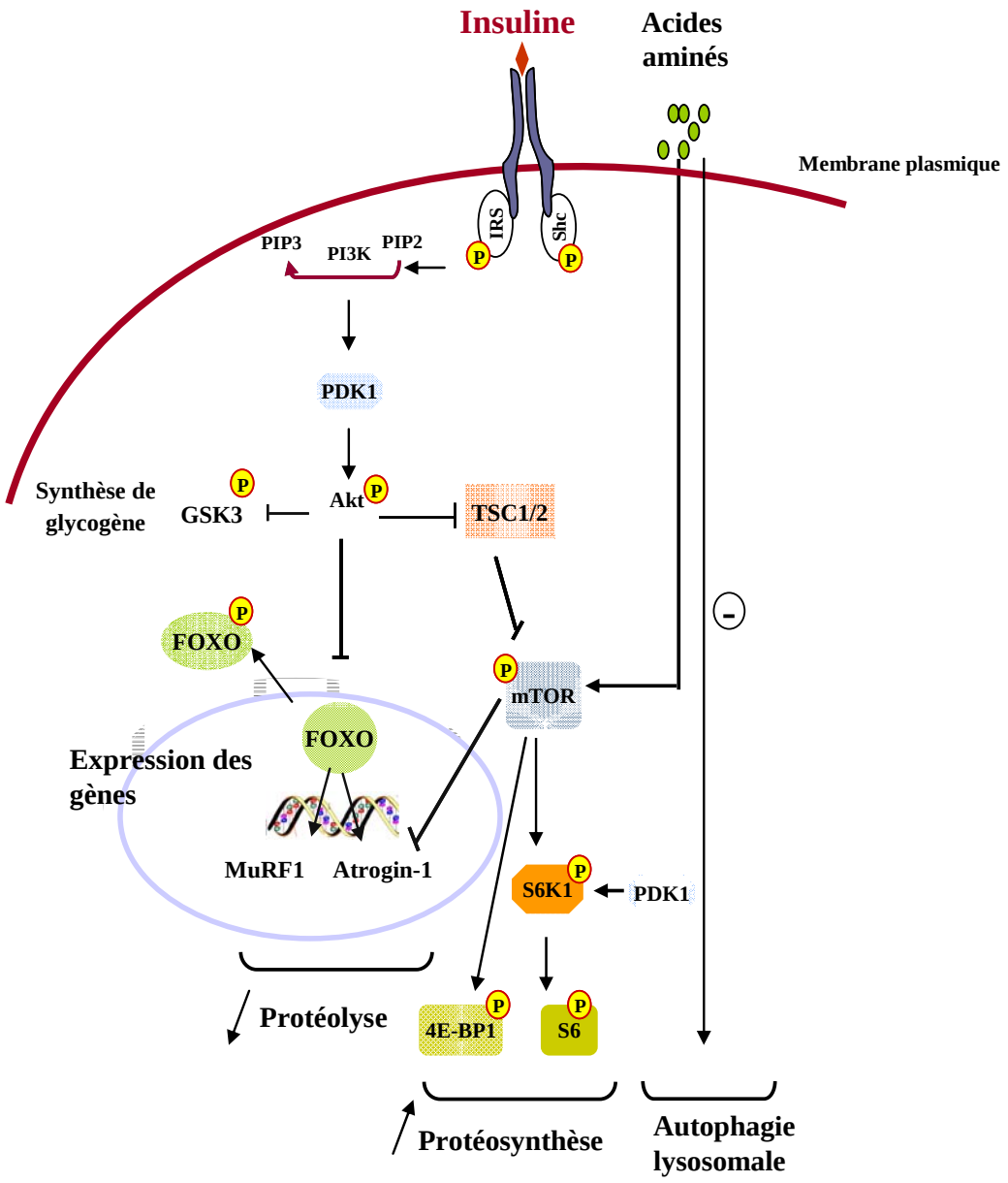


Figure 29. Voies de signalisation du contrôle de la synthèse et la dégradation des protéines par les acides aminés et l'insuline.

3. Interaction entre les acides aminés et l'insuline au niveau des voies de signalisation cellulaires

Les acides aminés et l'insuline sont des facteurs anaboliques pouvant agir sur les même voies métaboliques (e.g. protéosynthèse et protéolyse) et des voies de signalisation communes (e.g. mTOR/S6K1) (**Figure 29**). Ainsi, il est connu depuis longtemps que l'effet de l'insuline sur la protéosynthèse est plus marqué en présence des acides aminés (Garlick & Grant, 1988). Un niveau minimum d'insuline serait par ailleurs exigé pour la stimulation de la synthèse protéique par la réalimentation ou les acides aminés (pour revue, Kimball et al., 2002). Signalons qu'il est parfois difficile de distinguer les effets respectifs de l'insuline et des acides aminés *in vivo* : l'insuline agit sur les concentrations plasmatiques en acides aminés et inversement les acides aminés peuvent influencer la sécrétion d'insuline (rôle sécrétagogue de la leucine par exemple).

Il semble que les acides aminés soient aussi capables de moduler l'action de l'insuline en agissant sur la voie de signalisation IRS-1/PI3K/Akt (Tremblay et al., 2007). En effet, il a été montré que la sur-activation de la voie de signalisation mTOR/S6K1 liée à un excès en acides aminés peut perturber la sensibilité à l'insuline dans le muscle humain (Tremblay et al., 2005) et dans des fibroblastes de souris (Shan et al., 2006). De ce fait, mTOR et S6K1 exerceraient un rétrocontrôle négatif sur la voie de signalisation de l'insuline, phénomène associé à la phosphorylation de IRS-1 sur résidus sérine (**Figure 30**) (Tremblay et al., 2001 ; Tremblay et al., 2005 ; Shan et al., 2006 ; pour revue Foster & Fingar, 2010).

Les régulations impliquées sont certainement complexes et probablement tissu-dépendantes. En effet, des travaux récents montrent chez le rat que la supplémentation chronique en leucine induit un délai dans la stimulation postprandiale des étapes précoces de la signalisation de l'insuline. Ce délai, ne se traduit pas par une résistance à l'insuline en ce qui concerne le transport de glucose au niveau du muscle (Balage et al., 2011). Cependant, il est observé une altération de la tolérance au glucose associée à une augmentation de l'adiposité périrénale chez les rats supplémentés en leucine.

Deshmukh et al. (2009) ont montré, en utilisant des approches de ARNsi, que la leucine est capable de moduler l'action de l'insuline via un rétrocontrôle négatif impliquant la kinase S6K1. En effet, la leucine diminue à la fois le transport de glucose et la synthèse de glycogène que ce soit au niveau basal ou après stimulation insulinique. Cet effet de la leucine est prévenu par la déplétion par silencing de la S6K1.

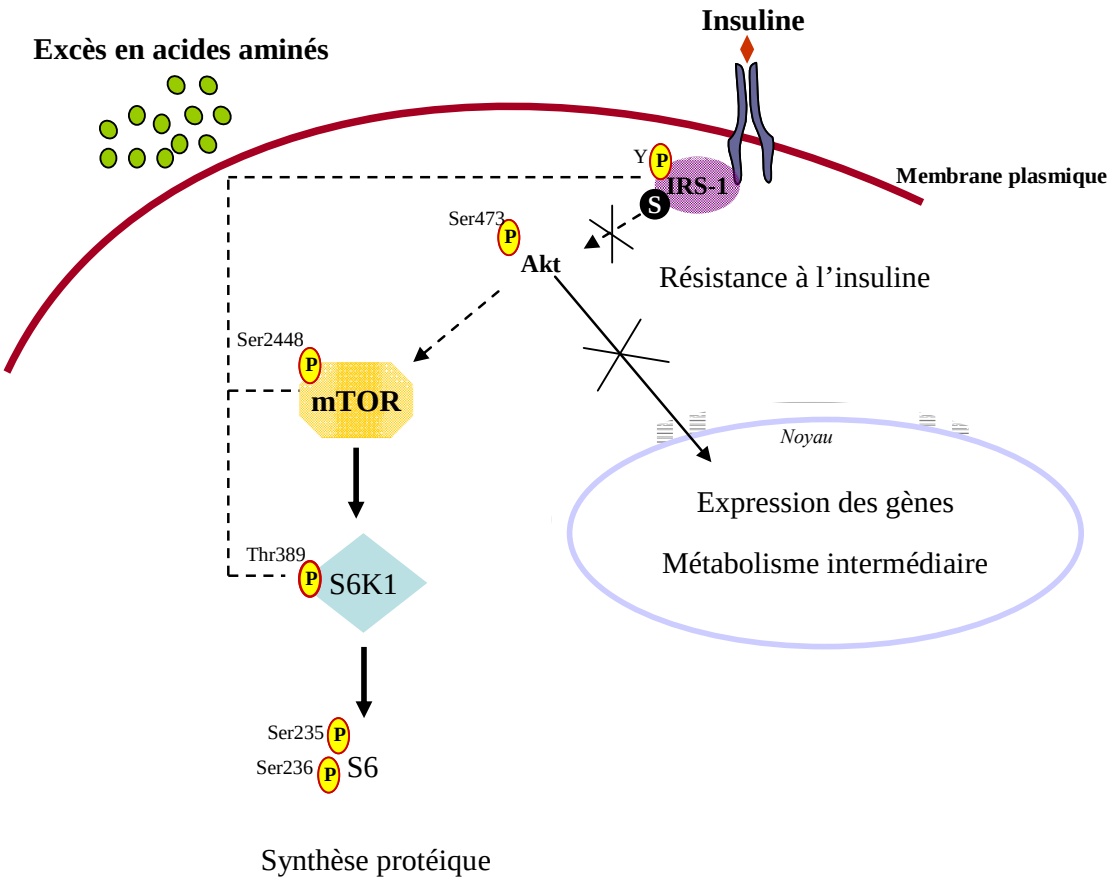


Figure 30. Rétrocontrôle négatif des acides aminés sur la voie de signalisation de l'insuline : phosphorylation d'IRS1 sur résidus sérine par les kinases mTOR et S6K1 (d'après Tremblay et al., 2001b ; Tremblay et al., 2005b).

Partie C. ADAPTATION CHEZ LE POULET : EXPOSITION A LA CHALEUR ET MODELE D'ALIMENTATION SEQUENTIELLE

Comprendre les effets des facteurs environnementaux sur l'animal et son métabolisme suppose d'intégrer la notion complexe d'adaptation. Nous traiterons ici des mécanismes d'adaptation à deux types de perturbations : la modification de la température ambiante et la variation dans le temps de l'apport alimentaire (i.e. concept de chrononutrition). Cette partie sera principalement centrée sur notre espèce modèle, le poulet en croissance.

I. Exposition à la chaleur

La chaleur ambiante est une des contraintes majeures en élevage avicole en raison des pertes économiques considérables qu'elle engendre en termes de mortalité et de baisse de productivité. Selon la durée et l'intensité de la chaleur, on distingue d'une part la **chaleur chronique**, qui dure quelques mois en Europe mais toute l'année dans les pays tropicaux avec des températures ambiantes supérieures à 30°C dans les bâtiments et d'autre part le **coup de chaleur.** Celui-ci, correspond à une augmentation relativement brutale de la température ambiante de quelques degrés pendant quelques jours, fréquemment pendant la saison sèche dans les pays tropicaux ou encore sous l'effet d'un vent chaud (Afrique du Nord) (De Basilio & Picard, 2002).

La chaleur est responsable de certaines réponses comportementales et physiologiques qu'il faut comprendre pour pouvoir améliorer la résistance à la chaleur des poulets. Cette étude bibliographique fait le point sur les travaux réalisés pour comprendre les effets de la chaleur sur les performances des poulets de chair et les modifications métaboliques.

I. Performances, modifications physiologiques et métaboliques au chaud

1. Diminution des performances au chaud

La sélection génétique des poulets de chair à croissance rapide s'est accompagnée d'un développement insuffisant de leurs organes internes, qui limite leur capacité à résister à la chaleur (Deeb & Cahaner, 2002 ; Havenstein et al., 2003). Ce choix pour la croissance rapide,

associé à une perte de chaleur limitée par le plumage et le défaut de glandes sudoripares, s'est traduit par une diminution des performances au chaud (Géraert, 1991 ; Altan et al., 2003).

La première conséquence de l'exposition à la chaleur est la diminution de la consommation d'aliment. Cette baisse de l'ingestion se manifeste par une baisse de la croissance des poulets associée à une altération de leur indice de consommation. En somme, la chaleur exerce son effet délétère sur la prise alimentaire, l'indice de consommation, le gain de poids corporel, le rendement de carcasse et le taux de mortalité (Yahav et al., 1995 ; Géraert et al., 1996a ; Lin et al., 2006).

Plusieurs travaux ont mesuré l'effet de l'élévation de la température ambiante (Ta constante ou cyclique) sur les performances. Celles obtenues à des températures ambiantes élevées cycliques sont moins affectées que celles enregistrées après des expositions constantes (Stilborn, 1988 ; Yahav et al., 1995 ; Padilha, 1995). Dans des conditions de températures ambiantes élevées constantes, les détériorations du gain de poids et de l'indice de consommation sont d'autant plus accentuées que la Ta dépasse 30°C (Aïn Baziz, 1996). De plus, les effets négatifs de la chaleur sont d'autant plus importants que l'animal est âgé (Géraert et al., 1996a). Par ailleurs, les facteurs d'élevage interagissent avec la température ambiante pour diminuer les performances du poulet. Ainsi, l'effet de la température ambiante sur les performances zootechniques des poulets de chair dépend de l'humidité relative et de la ventilation (vitesse de l'air). Yahav et al. (1995) rapportent ainsi que, au delà de 65% d'humidité relative, les baisses de performances observées à 35°C chez le poulet de 4 à 6 semaines d'âge sont accentuées.

Enfin, Cooper & Washburn (1998) montrent chez des poulets de chair à croissance rapide une corrélation négative significative entre la vitesse de croissance, la consommation et l'efficacité alimentaire d'une part, et la température corporelle mesurée à partir de 35 jours d'âge d'autre part, chez les poulets exposés à la chaleur, mais pas chez les poulets élevés à 21°C (Cooper & Washburn, 1998). La diminution des performances observée au chaud est ainsi engendrée par des modifications physiologiques et métaboliques qui visent à maintenir la température interne de l'animal dans des limites viables.

2. Notion d'homéothermie et d'hyperthermie

L'homéothermie est la faculté de maintenir théoriquement constante sa température corporelle (Guibert, 2005). En réalité, la température corporelle « normale » d'un animal homéotherme varie dans des limites restreintes, chez le poulet entre 41,2 et 42,2°C (Aïn Baziz, 1996). Le maintien de cette température corporelle est nécessaire pour un fonctionnement optimal des organes vitaux de l'oiseau (Valancony & Amand, 1999). Chez le poulet, l'homéothermie ne serait établie qu'après la première semaine de vie des poussins, quand le taux d'hormones thyroïdiennes augmente (Freeman, 1987). Ces hormones régulent la production de chaleur chez les oiseaux comme chez les mammifères (Decuypere et al., 1981).

La zone de neutralité thermique de l'animal est, pour un âge donné, définie par les températures critiques inférieures et supérieures. Entre ces températures, les transferts de chaleur qui s'établissent correspondent à des dépenses énergétiques faibles, et peu influencées par l'environnement. Le maintien de la température interne est alors lié à un équilibre entre la production de chaleur (thermogenèse) et les pertes de chaleur (thermolyse). La température ambiante au dessus de laquelle il y a une rupture de cet équilibre, qui entraîne une augmentation significative de la température rectale du poulet (hyperthermie), semble se situer autour de 32°C (Géraert, 1991). Il est à noter que la température ressentie par l'animal diffère de la température ambiante, ce qui peut s'expliquer par l'effet de facteurs climatiques tels que la vitesse de l'air, l'hygrométrie, la densité d'élevage, etc…

3. Modifications de la dépense énergétique au chaud

En climat chaud, l'animal met en œuvre des mécanismes qui visent à augmenter les pertes de chaleur et à diminuer la production de chaleur pour éviter une trop forte augmentation de sa température corporelle.

3.1. Augmentation de la thermolyse

Quand la température ambiante s'élève, les oiseaux limitent l'augmentation de leur température corporelle par élimination de chaleur par voie sensible, principalement par conduction et convection (Guibert, 2005). Toutefois, à de fortes températures, ces moyens deviennent insuffisants, car l'écart entre la température corporelle et la température ambiante, dont dépendent les pertes de chaleurs par voie sensible, diminue.

Tableau 5 : Concentrations plasmatiques d'insuline, triiodothyronine (T_3), thyroxine (T_4) et corticostérone chez des poulets mâles exposés à la chaleur et nourris *ad libitum* (32 AL), à la thermoneutralité et nourris *ad lib itum* (22AL) ou à la thermoneutralité et rationnés selon l'ingéré des poulets à 32°C (22R). 14 poulets par traitement (d'après Padilha, 1995).

Traitements	***22 AL***	***22 R***	***32 AL***	***Stat***
Insuline (µU/ml)				
A jeun	9,10 ^{a} ± 2,30	22,10^{b} ± 4,28	14,44^{a} ± 3,58	0,04
Nourri	45,44 ± 4,35	55,60 ± 5,10	44,10 ± 8,02	0,357
T_3 (mmol/ml)				
A jeun	1,60 ± 0,10	1,43 ± 0,08	1,44 ± 0,10	0,387
Nourri	3,51^{a} ± 0,27	3,59^{a} ± 0,22	1,47^{b} ± 0,12	<0,001
T_4 (mmol/ml)				
A jeun	21,61^{a} ± 0,82	18,38^{b} ± 0,86	18,56^{b} ± 0,86	0,016
Nourri	13,23^{a} ± 0,50	13,08^{a} ± 0,53	9,64^{b} ± 0,50	<0,001
Corticostérone (ng/ml)				
A jeun	1,46^{a} ± 0,19	2,16^{b} ± 0,35	2,32^{b} ± 0,37	<0,001
Nourri	0,45^{a} ± 0,07	0,47^{a} ± 0,07	1,86^{b} ± 0,33	<0,001

Les pertes de chaleur par voie latente, par évaporation d'eau au niveau pulmonaire et cutané, se substituent alors progressivement aux pertes de chaleur sensible (Guibert, 2005). Ce mécanisme est d'autant plus efficace que l'hygrométrie de l'air inspiré par les oiseaux est faible (De Basilio & Picard, 2002). Les études de Wolfenson (1983) ont montré que l'augmentation de la perte de chaleur au niveau des zones les moins bien isolées de l'organisme est un phénomène adaptatif qui permet au poulet de réguler sa température en ambiance chaude. Les échanges thermiques sont en effet favorisés par un accroissement du flux sanguin accompagné d'une vasodilatation de la crête, du dessous des ailes et des pattes. A l'inverse, le flux sanguin vers la peau emplumée et les organes internes diminue (Wolfenson, 1983).

Cependant, les mécanismes favorisant la thermolyse ont une efficacité limitée chez le poulet de chair. L'hyperventilation accroît l'évaporation au niveau des voies respiratoires (De Basilio & Picard, 2002). Le rythme respiratoire passe de 25 mouvements par minute dans un environnement thermoneutre à 200 à 250 mouvements par minute lorsque le poulet doit dissiper de la chaleur dans un environnement chaud (Zhou & Yamamoto, 1997). L'hyperventilation pulmonaire provoque des perturbations de l'équilibre acido-basique.

En effet, le halètement induit par l'hyperthermie s'accompagne d'une réduction de la pression partielle de CO_2 et de la concentration en ions H^+ aboutissant à une alcalose respiratoire (Géraert, 1991 ; Bogin et al., 1996). L'alcalose respiratoire entraîne des perturbations de l'homéostasie de différents électrolytes sanguins et les déséquilibres induits peuvent entraîner une déshydratation (Bogin et al., 1996).

3.2. Diminution de la thermogenèse

La production de chaleur de l'animal peut être séparée en différentes composantes: le métabolisme basal, qui est déterminé par la production de chaleur à jeun (Géraert et al., 1996a), l'activité physique, la thermogenèse due au froid et la thermogenèse alimentaire (ou extra-chaleur). Les trois premières composantes semblent réduites lors de l'exposition au chaud avec une diminution d'environ 16% de la production de chaleur totale à 32°C par rapport à 22°C (Géraert, 1991). Cette diminution est associée à des baisses des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes, triiodothyronine (T3) et thyroxine (T4) (**Tableau 5**) (Padilha, 1995 ; Géraert et al., 1996b ; Yahav et al., 1996 ; Yunianto et al. 1997 ; Tao et al., 2006).

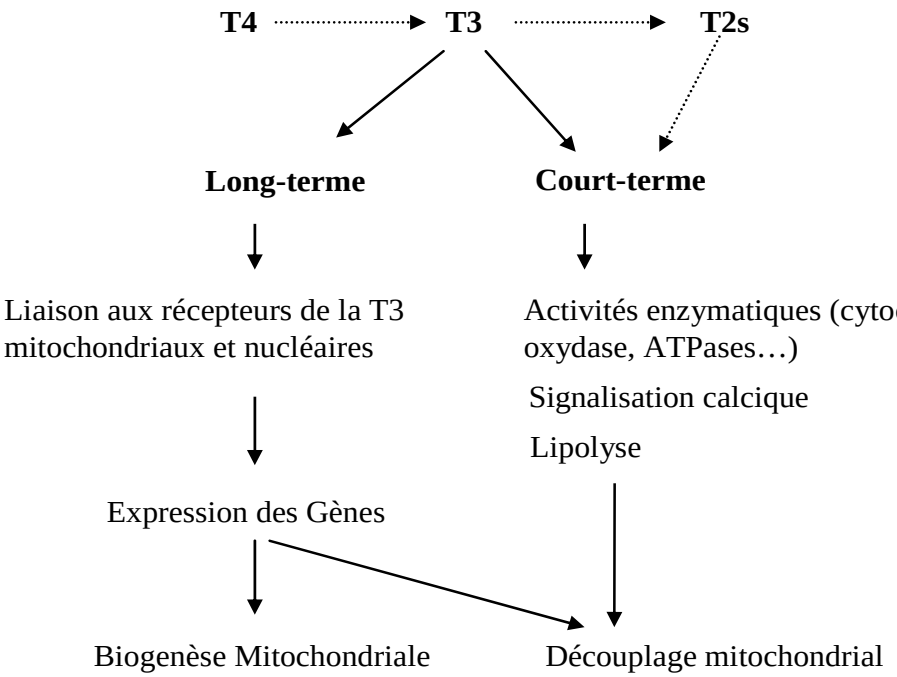


Figure 31. Effets des hormones thyroïdiennes (T2, T3 et T4) (d'après Goglia et al., 2002 ; Collin et al., 2005).

T3 : triiodothyronine

T4 : thyroxine

T2s : diiodothyronines

Ces hormones sont connues depuis longtemps pour leur rôle dans le contrôle de la thermorégulation chez les oiseaux et les mammifères, notamment via la régulation de la lipolyse et de l'activité de composants de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Figure 31**) (Goglia et al., 2001 ; Collin et al., 2005 ; Collin et al., 2009).

Tesseraud & Temim (1999) rapportent que la diminution du métabolisme basal pourrait être liée à la réduction d'activités métaboliques et aux caractéristiques physiologiques du tube digestif habitué à une consommation d'aliment limitée au chaud. Les données concernant la réduction de la production de chaleur liée à l'activité physique sont peu nombreuses ; les animaux sont certes prostrés et moins actifs, notamment du fait de leur moindre consommation d'aliment, mais la production de chaleur liée au travail des muscles respiratoires (hyperventilation) pourrait compenser en partie, cette réduction par rapport à des animaux à le thermoneutralité, comme cela semble être le cas chez le porc (Collin et al., 2001). Enfin, la réduction de l'ingéré alimentaire n'a que peu d'effet sur la thermogenèse alimentaire (Géraert et al., 1996a).

3.3. Dépense énergétique et composition corporelle

Plusieurs études indiquent que la quantité d'énergie retenue par le poulet est réduite sous l'effet de la chaleur : Géraert et al. (1996a) mettent en évidence une baisse de 27% entre 32 et 22°C. En effet, la composition corporelle apparaît globalement affectée au chaud (Aïn Baziz, 1996).

La répartition de l'énergie retenue sous forme de lipides et sous forme de protéines montre que la rétention protéique est plus faible chez les poulets à 32°C qu'à 22°C (-40%), la rétention de lipides étant plus importante (+20%). L'accroissement de la part d'énergie retenue sous forme de lipides pourrait s'expliquer par le fait que le poulet élevé au chaud ingère un excès d'énergie par rapport à ses besoins et que, compte tenu de ses faibles capacités à perdre de la chaleur, cet excès est pour une grande part stocké sous forme de lipides (Tesseraud & Temim, 1999). La chaleur augmente en effet la proportion corporelle de tissus adipeux (Aïn Baziz et al., 1996). L'importance de cette augmentation varie selon le tissu. Le gras abdominal paraît en particulier moins modifié que le gras sous-cutané à 32°C. La détermination de la taille et du nombre d'adipocytes montre que l'augmentation de l'engraissement se fait par hypertrophie pour le gras abdominal mais aussi par hyperplasie pour le gras sous-cutané. L'exposition prolongée au chaud modifie également la composition en acides gras des tissus adipeux en augmentant la proportion d'acides gras saturés. Tesseraud

& Temin (1999) suggèrent que la dégradation de la qualité des carcasses s'expliquerait par une augmentation de l'engraissement, particulièrement au niveau sous-cutané.

Au chaud, le gain de protéines corporelles est réduit de 54% en comparant des poulets nourris à volonté élevés au chaud (32AL) et à la thermoneutralité (22AL), et de 38% en comparant les animaux élevés à 32°C et 22°C à même ingéré (32AL *vs.* 22R ; Géraert et al, 1996a). Ainsi il existe un effet de la température sur l'accrétion protéique indépendamment de la diminution de consommation d'aliment. De plus, chez les poulets exposés à la chaleur, l'efficacité de rétention protéique est significativement diminuée (Tesseraud & Temim, 1999), ainsi que la digestibilité de certains acides aminés essentiels (Wallis & Balnave, 1984).

En conclusion, l'exposition chronique à la chaleur a un effet sur la croissance, la composition corporelle, la dépense énergétique et la partition de l'énergie retenue. Ceci suggère des modifications métaboliques et endocriniennes importantes induites par la chaleur ambiante.

4. Modifications métaboliques en climat chaud

4.1. Métabolisme glucidique

La diminution de croissance et l'engraissement observés au chaud suggèrent des modifications de l'utilisation du glucose et de son contrôle par l'insuline. Les résultats de Géraert et al. (1996b) montrent que, à jeun, la chaleur n'affecte pas la glycémie (environ 1,9 g/l). L'administration d'insuline provoque une diminution de la glycémie de 0,97, 1,10 et 0,77 g/l (soit -52%, -57% et -42%) chez les poulets des lots 22AL, 22R et 32AL, respectivement (voir signification des lots dans le paragraphe précedent). Le poulet exposé au chaud pourrait donc présenter, à jeun, une diminution de la réponse à l'insuline sans modification de la glycémie et de l'insulinémie basales. A l'état nourri, la glycémie plus élevée sans modification de l'insulinémie chez les poulets élevés au chaud comparés aux témoins (**Tableau 5**) suggère également un état d'insulinorésistance qui pourrait être expliqué par des modifications la sensibilité des tissus à l'insuline (Géraert et al., 1996b). L'apport énergétique sous forme de glucose au muscle pourrait donc être réduit avec probablement des répercussions sur le métabolisme protéique musculaire (Temim, 2000).

A l'heure actuelle, il n'existe pas d'argument direct en faveur d'une modification de l'utilisation du glucose au chaud chez le poulet. Notons cependant une régulation de PGC-1α, co-activateur du facteur de transcription PPARγ (Peroxisome Proliferator-Activated

Receptor), par la température d'élevage : une surexpression est induite suite à l'exposition au froid des poulets (Ueda et al., 2005 ; Ijiri et al., 2009) et une réduction d'expression est observée lors d'un réchauffement suite à une exposition au froid (Ijiri et al., 2009). PGC-1α est un acteur clé des métabolismes énergétique et glucidique, contrôlant en particulier l'utilisation du glucose au niveau du muscle squelettique (Handschin & Spiegelman, 2006). De manière intéressante, PGC-1α est aussi connu pour coordonner la signalisation de l'insuline au moins chez les mammifères. En effet, la réduction d'expression de PGC-1α atténue la transduction du signal insulinique *in vitro* (Pagel-Langenickel et al., 2008). PGC-1α jouerait ainsi un rôle central dans la physiopathologie de l'insulino-résistance (Patti et al., 2003 ; Pagel-Langenickel et al., 2008).

4.2. Métabolisme lipidique

Chez les oiseaux, la lipogenèse *de novo* a lieu principalement dans le foie. A 32°C, cependant, les activités des enzymes de la lipogenèse dans le foie ne sont pas augmentées ; elles seraient même diminuées (Aïn Baziz, 1996). La lipogenèse *de novo* à partir des glucides du régime est réduite. Tesseraud & Temim (1999) rapportent que les poulets élevés au chaud déposent plus les lipides alimentaires en lipides corporels notamment avec les régimes très énergétiques. Selon ces auteurs, l'engraissement des poulets exposés au chaud proviendrait donc plus d'un dépôt des acides gras d'origine alimentaire que d'une lipogenèse *de novo*.

Par ailleurs, les capacités de transport des lipides ne sont pas modifiées au chaud. En effet, les flux de sécrétion des triglycérides et des lipoprotéines de la classe VLDL (Very Low Density Lipoprotein) ne sont pas significativement augmentés au chaud (Leclercq et al., 1990). Il est cependant possible d'expliquer l'engraissement au chaud par une augmentation des taux circulants de phospholipides plasmatiques (Géraert et al., 1996b). Mais les différentes mesures réalisées ne révèlent pas d'augmentation de la captation au chaud ; de plus, l'activité lipoprotéine-lipasique est diminuée au chaud dans le gras abdominal et sous-cutané (Aïn Baziz, 1996).

La diminution des taux circulants d'acides gras libres et du glycérol (Géraert et al., 1996b), la réduction de la concentration plasmatique de ß-hydroxybutyrate et la plus faible activité des enzymes de la dégradation des acides gras mesurées au niveau musculaire, telle que la ß-hydroxyacyl déshydrogénase (Aïn Baziz, 1996), suggèrent une utilisation plus faible des réserves lipidiques pour la couverture des besoins énergétiques.

En définitive, la lipogenèse n'est pas augmentée, il n'existe pas non plus d'augmentation des capacités d'exportation des lipides ou de leur captation périphérique. En revanche, les indicateurs de la lipolyse sont réduits au chaud. L'engraissement plus important en ambiance chaude pourrait donc s'expliquer par une moindre utilisation des réserves déposées (Aïn Baziz, 1996).

Une exposition prolongée à la chaleur augmente la corticostéronémie et réduit les concentrations plasmatiques de triiodothyronine (T3) chez le poulet en croissance (**Tableau 5**) (Géraert et al., 1996b). Ces modifications pourraient favoriser le dépôt de lipides (Leclercq et al., 1988 ; Taouis et al., 1993), mais également limiter la rétention protéique, notamment en freinant la protéosynthèse (Grizard et al., 1995).

4.3. Métabolisme protéique

4.3.1. Protéosynthèse et protéolyse

Le dépôt protéique et son efficacité sont diminués au chaud, suggérant des modifications du métabolisme protéique (Tesseraud & Temim, 1999). L'effet de la chaleur (32 *vs.* 22 °C) sur le renouvellement protéique a été étudié dans différents muscles squelettiques (*Pectoralis major, Gastrocnemius* et *Sartorius*) de poulets âgés de 5 à 6 semaines. Quel que soit le muscle étudié, la chaleur réduit significativement la protéosynthèse (Temim, 2000). Par ailleurs, l'effet de la chaleur dépend du type de muscle, vraisemblablement en relation avec ses caractéristiques énergétiques. La chaleur pourrait également diminuer la protéolyse, au moins dans le *Pectoralis major* (muscle glycolytique) et le muscle *Sartorius* (muscle de la cuisse) (Temim, 2000). Les modifications induites par la chaleur des voies de régulation de la protéosynthèse, notamment par l'insuline et les acides aminés et de la protéolyse, restent à mettre en évidence.

4.3.2. Protéines de choc thermique

Les protéines de choc thermique (Heat Shock Proteins, HSP) jouent un rôle dans l'acquisition d'une thermotolérance chez les Mammifères (Berger & Woodward, 1983 ; Rollet et al., 1992). Ces protéines sont classées en trois grandes familles définies selon leur poids moléculaire 27 kDa, 70 kDa et 90 kDa (Feder & Hofmann, 1999). Selon Fink (1999), *in vitro*, HSP27 de mammifère possède la capacité de se lier aux protéines mal repliées et ainsi prévenir leur agrégation en conditions de stress. Elle pourrait limiter l'inhibition de la synthèse

protéique qui résulte de l'augmentation de la température (Arrigo & Landry, 1994). Chez le poulet, Wang & Edens (1993) ont montré que l'exposition quotidienne à une température ambiante élevée pendant 1 heure induit l'expression de l'ARNm de HSP70. Cette HSP pourrait ainsi être impliquée dans le mécanisme d'acquisition de la thermotolérance chez le poulet.

5. Stress oxydant

Les radicaux libres (ROS) sont des composés caractérisés par une structure électronique déséquilibrée qui leur confère une grande réactivité sur les constituants organiques et sur les structures cellulaires (Mujahid et al., 2006). Les mitochondries sont la source principale de radicaux libres dans la cellule (Chance et al., 1979). Le stress oxydant semble être favorisé par l'exposition de l'animal à la chaleur (Bernabucci et al., 2002 ; Lin et al., 2006). Mujahid et al. (2006) ont observé une augmentation des ROS dans des mitochondries isolées de muscles squelettiques du poulet de chair exposés à 34°C pendant 18h. Cette augmentation est associée à une diminution de 28% des ARNm codant pour la protéine découplante aviaire avUCP par rapport à son expression chez les poulets élevés à 25°C. Cette protéine est suspectée d'être impliquée dans la dissipation partielle du gradient de proton électrochimique mitochondrial qui découplerait la phosphorylation des oxydations (Collin et al., 2005 ; Mozo et al., 2005), mais également dans la limitation de la production mitochondriale de ROS (Criscuolo et al., 2005). Mujahid et al. (2006) suggèrent que la chaleur aiguë stimule la production mitochondriale des espèces radicalaires au niveau du muscle squelettique via une diminution de l'expression d'avUCP.

Enfin, l'exposition au chaud induit une augmentation de la corticostéronémie, au moins de façon transitoire. Cette réponse hormonale pourrait favoriser le stress oxydant observé durant l'exposition aiguë au chaud. En effet, l'administration de corticostérone favorise la peroxydation des lipides chez des poulets exposés à la chaleur (Lin et al., 2004).

II. Alimentation séquentielle

Pendant des millions d'années, les volailles ont évolué dans un environnement complexe où aucun des aliments disponibles n'était équilibré nutritionnellement. Elles ont su s'adapter à différentes situations grâce à leurs capacités d'apprentissage et sensorielles (Emmans, 1991). L'alimentation des animaux en utilisant un régime complet équilibré est en comparaison relativement récente. Cette technique permet d'exploiter les potentialités

génétiques des animaux en termes de performances de croissance, mais offre peu de possibilités pour valoriser l'adaptabilité métabolique des volailles. Dans le cadre du développement de systèmes de production innovants, se développent des stratégies d'alimentation utilisant le concept de la chrononutrition. C'est le cas de l'alimentation séquentielle (AS), qui consiste à distribuer cycliquement deux aliments de composition différente.

1. Objectif de l'alimentation séquentielle

L'alimentation séquentielle est une idée simple relativement ancienne et couramment pratiquée, chez la vache laitière par exemple, et qui consiste à donner des aliments de composition différente alternativement au cours de la journée. Cette vieille technique de « complémentation » a été peu testée chez le poulet à croissance rapide. Néanmoins, les travaux de Rys & Koreleski (1980) et de Forbes & Shariatmadari (1996) suggèrent que l'on peut faire varier la teneur en protéines du régime au cours de la journée sans perte marquée d'efficacité. La distribution séquentielle de blé graine entière, distribué alternativement à un aliment complémentaire riche en protéines (Rose et al., 1995 ; Noirot et al., 1999) est une technique efficace. L'alimentation en libre choix a également été testée, sans jamais donner toutefois de résultats satisfaisants du fait d'un engraissement excessif des animaux. L'avantage de l'alimentation séquentielle est de laisser à l'éleveur un moyen de moduler les tendances de consommation naturelles du poulet, tout en recréant partiellement les conditions d'une alimentation plus variée. La mise en œuvre est aisée : chaque bâtiment doit disposer de deux silos, l'éleveur effectue alors le changement d'aliment le soir, par simple bascule.

L'alimentation séquentielle offre de nombreuses perspectives de recherche en offrant un modèle facilement manipulable pour étudier les régulations métaboliques chez les monogastriques. D'un point de vue appliqué, elle permet d'ouvrir de nouvelles voies en alimentation des volailles en abolissant les contraintes imposées par un aliment complet unique (utilisation de céréales entières, de protéagineux, etc) et en fournissant une méthode susceptible d'améliorer le bien-être de l'animal. En plus de proposer des conditions d'élevage diversifiées, cette technique pourrait aussi permettre d'optimiser le contrôle de la croissance et de moduler les stocks de glycogène intramusculaire et donc la qualité de la viande. Si cette technique se révèlait économiquement viable, elle apporterait un outil nouveau pour la gestion des élevages de poulets.

2. Optimisation de la technique d'alimentation séquentielle

Les premiers travaux d'alimentation séquentielle ont été réalisés avec l'alternance de deux aliments de teneurs différentes en acides aminés (Gous & Du Preez, 1975) ou en protéines (Rosebrough et al., 1989). Des cycles d'AS de 12 h, 24 h ou 48 h ont été testés et comparés à un aliment témoin distribué en continu. Avec des cycles de 12h les poulets ont été capables d'ajuster leur ingestion en assurant un niveau équilibré en acides aminés et ont eu une croissance identique à celle des poulets témoins, alors qu'avec des cycles plus longs de 48h, l'ingestion et la croissance étaient réduits. Paradoxalement, chez des poulets âgés, la teneur en protéines des aliments pouvait varier pendant des périodes de 1 à 3 jours sans réduction significative de l'utilisation protéique comparée à un régime complet (Rys & Koreleski, 1980). Quand un régime déséquilibré est distribué et qu'un choix est offert, les poulets compensent en mangeant un aliment complémentaire. La distribution en alternance de régimes riches ou pauvres en protéines confirme que les animaux sont capables de compenser un aliment déséquilibré si on leur laisse évaluer les propriétés des aliments consommés (Forbes & Shariatmadari, 1996). Après apprentissage, les poulets sont capables d'évaluer l'équilibre protéique de leur aliment et consomment par anticipation des quantités qui dépendent de l'effet de cet aliment (Picard et al., 1994). La consommation de chaque aliment est la clef essentielle à prendre en compte pour atteindre un équilibre alimentaire global avec l'alimentation séquentielle.

Plus récemment, Bouvarel et al. (2004, 2008) ont étudié sur du poulet à croissance rapide les effets de l'alimentation séquentielle à différentes échelles de temps. De manière générale, les poulets modifient d'un jour à l'autre leur ingestion avec un risque de déséquilibre, en surconsommant l'aliment riche en énergie et pauvre en protéine, et inversement. Un programme d'AS de 24 h, avec des différences extrêmes de composition entre deux aliments variant en protéines et en énergie (+26% d'énergie et -70% de protéines), a des effets délétères sur l'ingestion et sur la croissance avec une moindre consommation des protéines. Avec des différences de composition plus modérées (+12% d'énergie et -38% de protéines), l'ingestion a été comparable avec l'aliment complet mais avec une faible consommation des protéines. Un cycle de 48h favorise la consommation de l'aliment riche en protéines et pauvre en énergie et permet d'égaliser les performances obtenues avec une alimentation complète (Bouvarel et al., 2004, 2008). Le poulet nourri en AS adapte son ingestion en fonction du temps et des caractéristiques énergétique et protéique des aliments. A

court (h) et moyen termes (jour), le choix est guidé par les caractéristiques sensorielles des aliments énergétiques, et ceci après un processus d'apprentissage de quelques cycles. Ceci aboutit tout de même à un équilibre énergétique, mais seulement à l'échelle du cycle de distribution (48h). Les poulets n'adaptent pas à court-terme leur ingestion en fonction de la teneur en protéine de l'aliment mais à moyen terme après une longue période (semaine), la durée d'apprentissage étant certainement plus longue que pour la teneur énergétique. Les poulets n'expriment d'ailleurs pas de préférence alimentaire vis à vis de la teneur en protéine de l'aliment. Par ailleurs, les animaux élevés en groupe expriment de manière beaucoup plus marquée des réactions de consommation.

3. Adaptation métabolique

Comme nous venons de le voir, le poulet de chair est capable d'accepter des distributions successives d'un aliment riche en protéines et d'un aliment riche en énergie sur 48h sans altération de ses performances de croissance (Bouvarel et al., 2008). Aucun des aliments ne serait utilisé efficacement s'il était donné seul. C'est donc au niveau métabolique que la compensation s'effectue.

La régulation nutritionnelle du métabolisme inclut l'effet des quantités ingérées, de la composition du régime (voir Partie II), mais dépend aussi du rythme d'apport des nutriments (Walrand & Boirie, 2005 ; Hocquette et al., 2007). Par exemple, la synchronisation ou non des apports en nutriments (en particulier glucose et acides aminés) au sein de la journée peut modifier le métabolisme énergétique de l'animal (Van den Borne et al., 2006). La répartition des apports protéiques sur la journée peut quant à elle influer le métabolisme protéique. L'ingestion de 80% des besoins protéiques au cours d'un seul repas en comparaison à un apport étalé sur la journée augmente l'efficacité de la rétention azotée chez la femme âgée (qui présente un défaut d'anabolisme postprandial), notamment en stimulant la synthèse protéique en relation avec une forte élévation de l'aminoacidémie postprandiale (Arnal et al., 1999, 2000). Cette amélioration de l'anabolisme protéique avec un régime « de charge » n'est en revanche pas retrouvée chez le sujet plus jeune. La cinétique de digestion des protéines et vitesse d'absorption intestinale des acides aminés qui en résulte ont également un effet majeur sur l'anabolisme protéique. Il existe ainsi des protéines dites rapides (e.g. protéines du lactosérum) car rapidement libérées par l'estomac, puis hydrolysées dans le duodénum, et à l'inverse des protéines dites lentes (e.g. protéines des caséines) car elles précipitent dans l'estomac, sont libérées lentement dans l'intestin grêle et sont absorbées de manière prolongée

sur plusieurs heures. La vitesse de digestion des protéines, en influençant le débit d'apparition des acides aminés dans la circulation sanguine, peut modifier l'anabolisme protéique postprandial (Boirie et al., 1997). Par exemple, les caséines sont plus efficaces que les protéines du lactosérum sur l'anabolisme protéique postprandial quelle que soit la composition en acides aminés de la protéine considérée. Ceci serait expliqué par une plus faible protéolyse. Chez la personne âgée, pour laquelle il est important d'avoir une disponibilité en acides aminés élevée, les protéines à vitesse de digestion rapide sont elles plus efficaces pour améliorer la rétention protéique après l'ingestion d'un repas (Dangin et al., 2003).

Chez le poulet, Tesseraud et al. (2009) ont suggéré une régulation à court-terme du métabolisme protéique dans un modèle d'alternance des apports en un seul acide aminé, la lysine, avec des aliments iso-énergétiques et iso-protéiques. Ces travaux montrent une régulation temps-dépendante de la protéolyse musculaire en fonction de l'apport alimentaire et une forte capacité des poulets à s'adapter aux changements d'apport en acides aminés. En particulier, la déficience transitoire du régime en lysine entraîne une sur-expression de l'expression des E3-ubiquitines ligases MuRF1 et Atrogin-1 (atrogènes impliqués dans la régulation de la protéolyse, cf partie I), au niveau du muscle *Pectoralis major* du poulet.

Conclusion & Objectifs de la thèse

Le développement musculaire et le métabolisme protéique sont régulés par de nombreux facteurs qu'ils soient liés à l'animal (facteurs physiologiques et génétiques) ou environnementaux (incluant la nutrition ou les conditions d'élevage). Pour comprendre les modifications de la masse musculaire résultant des changements environnementaux, il est essentiel d'explorer les mécanismes d'adaptation métabolique de ce tissu, ce que nous avons fait en examinant la régulation du renouvellement protéique ainsi que les voies de signalisation intracellulaire sous-jacentes.

La régulation de la protéosynthèse implique entre autres des voies de signalisation intracellulaire intégrant des protéines kinases telles que la protéine mammalian Target of Rapamycin (mTOR) et la p70S6 kinase (S6K1), qui contrôlent la phase d'initiation de la traduction. La voie mTOR/S6K1 est régulée en fonction de l'état nutritionnel et est activée par la prise alimentaire chez le poulet comme chez les mammifères. Par ailleurs, de récentes études ont démontré l'importance de l'expression de gènes spécifiquement induits lors d'atrophie (atrogènes) dans le contrôle de la protéolyse musculaire. Ces gènes codent des E3-ubiquitine ligases impliquées dans l'ubiquitinylation des protéines "destinées" à la dégradation protéasomale, mais leur régulation est encore peu connue. Des travaux réalisés en utilisant deux modèles d'étude, la truite et l'oiseau, ont montré que l'expression de l'atrogène atrogin-1 est induite en situation catabolique et réprimée par la réalimentation et par l'insuline et les acides aminés, via les voies de signalisation Protein kinase B (PKB/Akt) et/ou mTOR. Dans le cadre de cette thèse, nous avons porté une attention toute particulière sur la régulation des atrogènes.

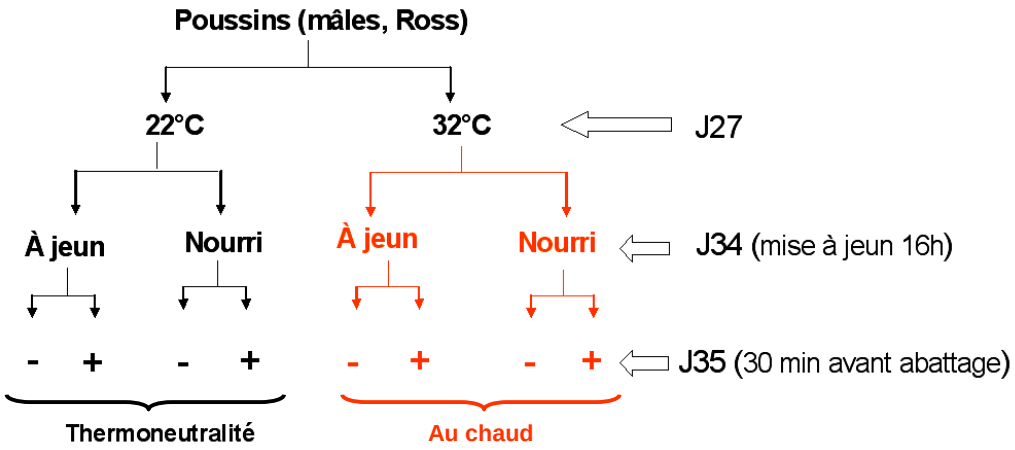
Nous avons étudié les mécanismes d'adaptation environnementale au travers de deux modèles, l'adaptation chronique à la chaleur et la distribution séquentielle de deux aliments. Nous avons utilisé en premier lieu, un modèle d'adaptation à long-terme du métabolisme suite à une exposition prolongée à une température ambiante élevée du poulet de chair. En effet, ce modèle d'étude a montré des modifications physiologiques et hormonales suggérant des altérations métaboliques importantes. Les poulets exposés à la chaleur (32°C *vs.* 22°C) montrent par exemple un engraissement accru et une forte diminution de la protéosynthèse musculaire. L'exposition à des températures élevées semble aussi modifier la sensibilité à l'insuline, hormone anabolique connue pour réguler la protéosynthèse. Nous avons utilisé en second lieu, un modèle d'adaptation à court-terme du métabolisme musculaire du jeune poulet

suite à une distribution de manière séquentielle de régimes alimentaires variant par leur teneur en protéines et/ou en énergie. En effet, les animaux soumis à une alimentation séquentielle sont capables de conserver une vitesse de croissance identique aux animaux contrôles nourris avec un régime témoin équilibré. Des mécanismes d'adaptation nutritionnelle permettent donc certainement au poulet de chair de valoriser des régimes déséquilibrés (aucun des aliments testés ne serait utilisé efficacement s'il était donné seul) et de satisfaire les besoins nutritionnels nécessaires à sa croissance sur le long terme.

Nous présenterons plus en détail ces modèles ainsi que les principales mesures réalisées avant de détailler les principaux résultats obtenus.

MATERIELS & METHODES

Présentation des modèles expérimentaux et des principales mesures effectuées



- : Témoin : Sans glucose et arginine.

+ : Intubation avec 2 g/kg PV de glucose et 0,21 g/kg PV d'arginine.

Figure 32. Représentation schématique du modèle expérimental d'exposition d'une semaine à la chaleur.

Expérience 1. Exposition chronique à la chaleur

1. Animaux et dispositif expérimental

Des poussins mâles de souche Ross sont reçus à l'âge d'un jour. Ils sont bagués, placés en cage et élevés dans des conditions d'élevage standard jusqu'à l'âge de 4 semaines. Ils reçoivent à volonté un aliment démarrage complet contenant 3100 kcal/kg d'énergie métabolisable et 22% de protéines brutes. Pendant toute l'expérience (35 jours), l'eau est fournie à volonté et la température de la cellule expérimentale est contrôlée. Les aliments sont distribués sous forme de granulés de 2,5 mm de diamètre. Le programme lumineux est de 23 heures de lumière pour une heure d'obscurité.

La période expérimentale débute à l'âge de 4 semaines et dure une semaine (**Figure 32**). Un jour avant le début de la période expérimentale (au jour J27), les poulets sont pesés, quarante huit d'entre eux sont sélectionnés et répartis en 2 lots de poulets de poids homogènes (1349 ± 17 g), et placés respectivement dans des cellules à une température constante de 22°C (température correspondant à la thermoneutralité, prise comme température témoin) ou 32°C (exposés à la chaleur de manière chronique). La nuit précédant le jour J35 (fin de l'expérience), la moitié de l'effectif de chaque lot est laissée à l'état nourri et l'autre moitié est mise à jeun pendant au moins 16 heures (jeûne d'une nuit) pour étudier les effets de l'exposition à la chaleur dans les deux états nutritionnels. Le jour J35, pour explorer les éventuels changements de l'équilibre glucose/insuline ou de signalisation induits par la chaleur, la moitié de chaque lot reçoit une administration intra-jabot d'une solution de glucose 30% et d'arginine 6,25% (correspondant à 2 g/kg PV de glucose et 0,21 g/kg PV d'arginine) 30 minutes avant abattage, et l'autre moitié est laissée sans traitement. Cette quantité de glucose est capable d'augmenter transitoirement l'insulinémie chez le poulet (Simon & Rosselin, 1978). La sécrétion d'insuline pouvant être réduite en ambiance chaude (voir hypothèses proposées par Geraert et al., 1996b), nous avons apporté également de l'arginine qui stimule au moins *in vitro* la sécrétion de l'insuline dans les espèces aviaires (Rideau et al., 1986).

2. Choix expérimentaux

▪ Nous avons réalisé l'expérience en période de finition, c'est-à-dire à partir de 4 semaines d'âge, période pendant laquelle les poulets sont plus sensibles à la chaleur que

lorsqu'ils sont plus jeunes (Geraert et al., 1996a). De plus, nous avons utilisé uniquement des mâles puisque leurs performances de croissance sont plus affectées que celles des femelles dans ces conditions (Howlider & Rose, 1987). Nous avons préféré travailler sur le muscle *Pectoralis major* dans la présente expérience, puisque il avait déjà été montré que le muscle *Pectoralis major* est plus affecté par des températures élevées que les deux muscles de la patte (de type mixte) *Sartorius* et *Gastrocnemius* (Temim et al., 1999, 2000).

- Pour remédier à une diminution potentielle de la sécrétion d'insuline au chaud, les poulets ont reçu une administration dans le jabot d'une solution de glucose additionnée d'arginine en fin d'expérience (J35). L'apport d'arginine choisi augmente significativement et de façon transitoire la concentration plasmatique et tissulaire en cet acide aminé dans différentes espèces (Obled, 1988 ; Tesseraud, 1991). Son action stimulatrice de la sécrétion d'insuline est reportée à la fois chez les mammifères (Cochard et al., 1998 ; Frank et al., 2007) et les espèces aviaires (Rideau et al., 1986).

Pour cerner au mieux l'impact de l'exposition pendant une semaine à la chaleur en termes de régulations métaboliques, nous avons soumis des poulets à deux situations nutritionnelles (à jeun ou nourri). Étant donné la complexité de ce modèle, nous n'avons pas utilisé de lots traités soit avec le glucose soit avec l'arginine seul pour dégager l'effet propre de chaque traitement. Ceci pouvait se justifier sachant que les acides aminés, en particulier la leucine dans le muscle squelettique, sont capables de modifier directement l'état de phosphorylation de la kinase S6K1 et de son substrat la protéine ribosomale S6. Un tel effet signal démontré chez les mammifères a été également trouvé chez les oiseaux, au moins *in vitro* (Tesseraud et al., 2003 ; Métayer-Coustard et al., 2010). En ce qui concerne un potentiel effet signal de l'arginine, les rares études *in vitro* réalisées sur des cellules musculaires de mammifères ont montré un effet sur l'activation de la S6K1 beaucoup moins prononcé avec l'arginine, comparé à la leucine et/ou à l'insuline (Herningtyas et al., 2008 ; Shigemitsu et al., 1999). Etudiée *in vivo* , l'activation de la cascade de signalisation mTOR dans le muscle squelettique dûe à une supplémentation du régime en arginine peut être indirecte en raison de changements concomitants du statut hormonal, avec par exemple une insulinémie augmentée (Yao et al., 2008). A notre connaissance, il n'y a pas d'évidence d'effet direct de l'arginine sur l'activation de la S6K1 ou de la S6 dans le muscle, quelle que soit l'espèce animale. Néanmoins, nous considérons que nous ne sommes pas en mesure de conclure définitivement à une absence d'action directe de l'arginine. C'est la raison pour laquelle, par mesure de prudence, nous avons précisé dans le manuscrit que nous étudions la signalisation Akt/S6K1

et non pas la signalisation de l'insuline, et que nous avons présenté comme facteurs de régulation les signaux anaboliques incluant les acides aminés, ne nous limitant donc pas à l'insuline.

- Le premier effet de l'exposition des animaux à la chaleur est une baisse de leur ingestion. L'effet propre de la chaleur sur les performances de croissance a été mis en évidence en utilisant la technique de pair-feeding avec des poulets élevés à thermoneutralité et qui reçoivent la même quantité d'aliment que celle consommée au chaud (Geraert et al., 1996a). Dans les études métaboliques, le choix d'un témoin approprié est difficile. Nous avons préféré ne pas avoir recours à la technique de pair-feeding qui induit des cycles avec des phases d'alimentation et des périodes de jeûne entre les repas influençant le métabolisme des animaux élevés à thermoneutralité (alternance de phases avec des états postprandiaux et post-absorptifs). Par conséquent, nous avons utilisé comme témoins des poulets nourris *ad libitum* présentant un apport nutritionnel régulier et continu au cours de la journée.

Les prélèvements de muscles pectoraux étant réalisés à un moment précis de la journée, ce témoin nous semble plus adéquat que le pair-feeding. Nous sommes cependant conscients que ce choix nous oblige à confondre les effets chaleur et baisse d'ingéré dans la présente étude.

3. Mesures effectuées

Les différentes mesures et les techniques employées au cours de cette étude étant détaillées dans la publication n°1, nous nous limiterons ici à les présenter brièvement en indiquant les objectifs recherchés.

Les mesures réalisées concernent la consommation quotidienne, la croissance corporelle, et plus généralement les performances de croissance mesurées entre 28 et 34 jours d'âge pour quantifier l'impact de l'exposition à la chaleur pendant une semaine et donc connaître précisément nos conditions expérimentales. En fin d'expérience (au jour J35), les abattages sont effectués exactement 30 minutes après l'administration orale de glucose et arginine. Du sang et le muscle *Pectoralis major* sont prélevés.

Les concentrations de glucose et d'insuline plasmatiques ont été déterminées pour tester l'hypothèse d'une modification de régulation par l'insuline du métabolisme du glucose au chaud chez le poulet, au travers de l'équilibre glucose/insuline. Nous avons aussi mesuré le stock de glycogène musculaire au moment de l'abattage (potentiel glycolytique). La protéosynthèse musculaire est fortement réduite au chaud et ceci est principalement lié à un

plus faible potentiel de synthèse des protéines musculaires (Temim et al., 2000b). Dans la présente étude, la capacité de synthèse a été appréciée par la mesure de la capacité ribosomale (Cs) (i.e. rapport ARN/protéines).

Par ailleurs, des données préliminaires suggéraient que la chaleur exerçait un effet significatif sur des éléments clés de la voie protéolytique ubiquitine protéasome-dépendante, voie qui joue un rôle prépondérant dans la dégradation des protéines musculaires (travaux de thèse Temim, 2000). Nous avons donc examiné la potentielle modification de la protéolyse en nous intéressant aux trois systèmes protéolytiques majeurs, calcium-dépendent, lysosomal et ubiquitine protéasome-dépendant : mesures d'expression par PCR en temps réel des protéases ou co-facteurs impliqués dans ces systèmes protéolytiques. Parallèlement, nous avons étudié l'expression des ARNm codant des gènes impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique par PCR en temps réel (par exemple le facteur de transcription PGC1α…).

La quantité et/ou la phosphorylation des kinases impliquées dans la voie de signalisation régulant les métabolismes protéique et glucidique, i.e. protéine kinase B (PKB) appelée aussi Akt, p70S6 kinase (S6K1) et protéine ribosomale S6 ont enfin été déterminées sur des lysats musculaires par Western-blotting avec des anticorps phosphospécifiques.

4. Limites de l'étude réalisée

4.1 Sensibilité à l'insuline au chaud ?

Afin de mieux analyser la sensibilité à l'insuline au chaud, il serait pertinent de cibler des paramètres tels que le nombre de récepteurs à l'insuline, la liaison de l'hormone à son récepteur ou encore des évènements post-récepteurs en amont de la cascade de l'insuline, non explorés dans la présente étude. Cependant, le poulet présente une absence de régulation des éléments précoces de la signalisation de l'insuline dans le muscle (e.g. apparente absence d'augmentation de phosphorylation sur tyrosine du récepteur à l'insuline et du substrat du récepteur à l'insuline IRS1, ou d'activation de la kinase PI3K), ce qui rendrait discutables les résultats. Nous n'avons donc pas approfondi ces éléments dans la présente étude.

4.2 Transporteurs du glucose chez le poulet ?

L'anabolisme dans le muscle *Pectoralis major* (muscle glycolytique) est très dépendant de la fourniture en glucose. Une des hypothèses que nous aurions aimé tester est la suivante : il est possible qu'au chaud, il y ait un défaut d'apport énergétique sous forme de glucose au

niveau du muscle, ce qui pourrait alors limiter la protéosynthèse. Dans le muscle de mammifères, l'entrée de glucose est régulée par un transporteur spécifique insulino-sensible (GLUT4) qui en réponse à l'insuline migre depuis des vésicules intracellulaires vers la membrane plasmique. Néanmoins, nous n'avons pas pu aborder cette question dans la présente étude puisque GLUT4 n'est pas encore caractérisé chez le poulet. Des résultats récents de notre laboratoire indiquent que le transporteur de glucose GLUT8, décrit comme insulino-sensible chez les mammifères, pourrait jouer le rôle de GLUT4. Il est exprimé dans différents tissus chez le poulet. Des études sont encore nécessaires pour valider l'identité de ces transporteurs du glucose sensibles à l'insuline chez le poulet, et surtout pour démontrer leur fonctionnalité.

Expérience 2. Alimentation séquentielle

1. Animaux et dispositif expérimental (Figure 33).

Des poussins mâles de souche Ross PM3 sont reçus à l'âge d'un jour. Ils sont bagués, placés en parquets (élevage au sol) dans un bâtiment d'ambiance contrôlée. Ils reçoivent à volonté un aliment démarrage complet contenant 2900 kcal/kg d'énergie métabolisable et 21% de protéines brutes (**Tableau 6**).

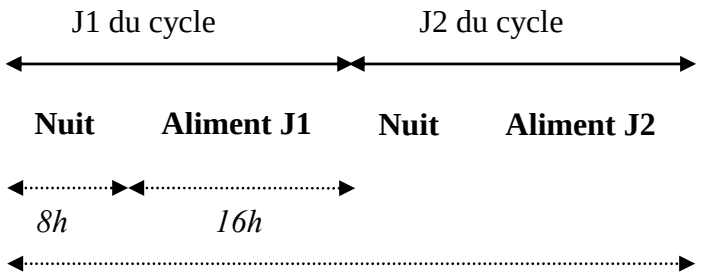
Tableau 6 : Composition et caractéristiques théoriques des aliments expérimentaux.

Programme d'AS	Démarrage J0 – J10	C	S_p		S_E		S_{EP}	
		Témoin	P+	P-	E-	E+	E-P+	E+P-
Composition %								
Maïs	36,5	20,1	31,0	30,5	20,6	45,2	12,4	50,4
Torteau de Soja	33,4	18,4	31,5	12,0	24,8	17,9	27,1	9,0
Blé	23,2	50,0	24,8	50,0	50,0	21,0	50,0	27,6
Gluten maïs		4,7	5,0	1,5	0,2	7,0	6,0	5,0
Huile de colza	3,0	2,9	4,0	2,1	0,8	5,0	0,8	4,0
Caractéristiques nutritionelles								
EM Kcal/Kg	2900	3000	3000	3000	2800	3200	2800	3200
MAT%	21	19	23	15	19	19	23	15
Lysine%	1,18	1,07	1,29	0,84	1,07	1,07	1,29	0,84
MG ajoutées %	3,00	2,91	4,00	2,14	0,80	5,00	0,77	4,00
MG totales %	5,68	5,06	6,53	4,56	3,00	7,90	2,80	7,01

EM : Enèrgie métabolisable.

MAT : Matière azotée totale.

MG : Matière grasse.



Cycle de 48h

Programme	**Témoin**	**S_p**	**S_E**	**S_{EP}**
J1 du cycle	**C1**	**P+**	**E-**	**E-P+**
J2 du cycle	**C2**	**P-**	**E+**	**E+P-**

Figure 33. Protocole d'alimentation séquentielle (AS).

- L'AS utilisée est basée sur des cycles de 48h, au cours desquels les aliments sont présentés pendant des durées égales.
- Le changement d'aliment est effectué au moment de l'allumage, après une nuit de 8h.
- Quatre traitements ont été utilisés à partir de 10 jours d'âge :

C : Aliment contrôle

SP : P+ suivi de P-

SE : E- suivi de E+

SEP : E-P+ suivi de E+P-

- Les caractéristiques des régimes sont présentées dans le tableau 6.

Pendant toute l'expérience (15 jours), l'eau est fournie à volonté et la température ambiante est enregistrée. Les aliments sont distribués sous forme de granulés de 2,5 mm de diamètre. L'éclairage est réduit de 24 heures de lumière pour 0 heure d'obscurité le premier jour à 14 heures de lumière pour 10 heures d'obscurité après deux jours d'âge, puis augmente à partir du jour 7 avec 16 heures de lumière pour 8 heures d'obscurité. A partir de 10 jours d'âge, les poussins reçoivent un aliment témoin ou sont soumis à un programme d'alimentation séquentielle.

Sept aliments sont utilisés pendant la période de l'alimentation séquentielle (**Tableau 6**). L'aliment contrôle (C) [3000 kcal/kg d'énergie métabolisable ; 19,5% de protéines brutes, valeur mesurée]. Deux aliments sont isoénergétiques mais diffèrent par leurs teneurs en protéines et en acides aminés essentiels : aliment riche en protéines (P+ = 23,4% de protéines brutes) et aliment pauvre en protéines (P- = 15,6% de protéines brutes). Deux aliments sont isoprotéiques mais possèdent des teneurs en énergie métabolisable (EM) différentes : aliment riche en énergie (E+ = 3200 kcal/kg EM) et aliment pauvre en énergie (E- = 2800 kcal/kg EM). Deux aliments diffèrent à la fois par leurs teneurs en protéines et en énergie : riche en protéines et pauvre en énergie (P+E- = 23,4% de protéines brutes et 2800 kcal/kg EM), pauvre en protéines et riche en énergie (P-E+= 15,6% de protéines brutes et 3200 kcal/kg EM).

Quatre traitements ont été comparés pendant la période de l'alimentation séquentielle. 1) aliment contrôle (C), 2) alternance des aliments variant en protéines S_P (P+ suivi de P-), 3) alternance des aliments variant en énergie S_E (E- suivi de E+), 4) alternance des aliments variant à la fois en protéines et en énergie S_{EP} (E-P+ suivi de P+E-). Le changement de l'aliment est effectué au moment de l'éclairage, après une nuit de 8 heures.

2. Choix expérimentaux

- Des résultats précédemment obtenus au laboratoire (Tesseraud et al., 2009) suggèrent une régulation temps-dépendante de la protéolyse musculaire en fonction du traitement alimentaire (utilisation du modèle d'alimentation séquentielle avec des variations journalières des apports en un seul acide aminé, la lysine, avec des aliments iso-énergétiques et iso-protéiques) et une forte capacité métabolique des poulets à compenser les changements d'apports en acides aminés. En particulier, la déficience transitoire du régime en lysine entraîne une sur-expression des E3-ubiquitines ligases MuRF1 et atrogin-1, atrogènes

impliqués dans la régulation de la protéolyse, au niveau du muscle *Pectoralis M ajor* du poulet. Dans le cadre de la thèse, nous avons étudié un modèle plus complexe, avec alternance des apports en protéines et/ou en énergie, en enrichissant nos recherches par un volet sur la protéosynthèse (qui détermine avec la protéolyse le dépôt protéique). Le protocole a été choisi pour nous permettre de dissocier les effets respectifs des teneurs en protéines et en énergie sur le métabolisme.

- Nous avons choisi un protocole d'alimentation séquentielle avec des cycles de 48 heures car cette technique permet d'obtenir des performances de croissance comparables à celles obtenues avec un régime standard distribué en continu (Bouvarel et al., 2008). Notons que l'ingestion est alors similaire avec l'alimentation complète et séquentielle au moins en raisonnant sur le cycle dans son entier. Précisons également que pour éviter tout risque de perturbation de la croissance, il faut maîtriser dans une certaine mesure l'ingestion des animaux : il est important en particulier de limiter une consommation par trop excessive de l'aliment riche en énergie, ce qui peut se produire si l'on commence la procédure d'aliment séquentielle par cet aliment.

3. Mesures effectuées

Les différentes mesures et les techniques employées au cours de cette étude sont également détaillées dans la publication n°2. Nous ne les présenterons donc que brièvement ici tout en indiquant les objectifs recherchés.

Les mesures réalisées concernent les performances de croissance mesurées entre 9 et 14-15 jours d'âge pour connaître l'impact des programmes d'alimentation séquentielle utilisés. À 14-15 jours d'âge, les poulets sont abattus 5 heures après le changement d'aliment. Du sang et le muscle *Pectoralis major* sont prélevés.

Les concentrations de glucose et d'insuline plasmatiques ont été déterminées pour tester l'hypothèse d'une implication de l'insuline dans les modifications du métabolisme protéique. Nous avons aussi mesuré les teneurs en acides aminés plasmatiques. En ce qui concerne les caractéristiques musculaires, nous avons déterminé le potentiel de synthèse par la mesure de la capacité ribosomale (i.e. rapport ARN/protéines) dans le muscle *Pectoralis major*.

Pour examiner les répercussions éventuelles des modifications de l'aliment consommé sur la protéolyse musculaire, nous avons quantifié l'expression des ARNm des atrogènes MuRF1 et Atrogin-1 par qRT-PCR et mesuré l'activité enzymatique du protéasome (mesure

des activités protéasomales trypsin-like et chymotrysin-like réalisées en collaboration avec I. Seiliez et C. Vachot, INRA de St Pée-sur-Nivelle). Nous avons également déterminé l'expression des ARNm codant la cathepsine D et la m-calpaïne, protéases impliquées dans les voies lysosomale et calcium-dépendante, respectivement. Nous avons aussi analysé, par Western-blotting en utilisant des anticorps phospho-spécifiques, l'activation d'une voie majeure impliquée dans la régulation de la protéolyse mais aussi de la traduction protéique, i.e. voie Mammalian Target of rapamycin (mTOR).

4. Limites de l'étude réalisée

Les modifications induites par des changements journaliers d'aliments sont par essence temps-dépendantes. En raison de la complexité du modèle utilisé ici (alternance de régimes variant par leur teneur en énergie, en protéines ou les deux), nous n'avons pas réalisé d'études cinétiques. Pour étudier les effets des changements d'aliment (lors des programmes d'alimentation séquentielle) sur le métabolisme protéique, nous avons choisi d'abattre les poulets 5 heures après le changement d'aliment. Ce temps est suffisant pour observer, dans des modèles aviaires, des modifications d'expression des atrogènes, que ce soit *in vitro* suite à des modifications d'apport en insuline ou en acides aminés (Tesseraud et al., 2007) ou *in vivo* suite à une mise à jeun ou à une insulinopénie aigüe induite par immuno-neutralisation (Dupont et al., 2008). Il permet également des études de signalisation sur un pas de temps qui ne soit pas excessivement long.

Connaissant le rôle pivot que joue le facteur d'initiation eIF3f dans les processus d'atrophie/hypertrophie dans le muscle squelettique (Csibi et al., 2009, 2010), nous avons voulu explorer son implication potentielle dans le contrôle de l'équilibre synthèse/dégradation des protéines dans le modèle d'alimentation séquentielle ; l'idée était alors de considérer eIF3f comme un « marqueur » de la balance anabolisme/catabolisme et non en tant que régulateur de la traduction avec l'étude des mécanismes sous-jacents. Ceci suppose de quantifier l'expression protéique de ce facteur d'initiation et d'examiner sa disparition éventuelle dans les conditions dites cataboliques (e.g. P- *vs.* P+), ce que nous n'avons pas pu faire pour l'instant du fait de la difficulté à obtenir un anticorps spécifique reconnaissant eIF3f de poulet.

RESULTATS & DISCUSSION

Avant propos

Nous avons choisi de présenter les résultats obtenus pendant la thèse sous forme de publications. Ces publications sont précédées d'un résumé en français et sont complétées par des résultats complémentaires.

Les résultats de la première étude ont été publiés dans *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B* (Publication 1). L'exploitation de la deuxième étude a donnée lieu à une deuxième publication qui est soumise à *Journal of Nutritio nal Biochemistry* (Publication 2). Ce travail a également été présenté en tant que communication orale lors du congrès XIIIth European Poultry Conference*, August 23-27,* 2010. Le texte en anglais correspondant est intégré dans les annexes.

Un des fils conducteurs de la thèse est la régulation des atrogènes dans des modèles physiologiques de modulations de la croissance musculaire. Sont inclus en annexe des articles correspondant à des travaux auxquels j'ai participé : un article sur la régulation de atrogin-1 par l'insuline et les acides aminés (publié dans *Biochemical and Bi ophysical Research Communications*), et une revue de synthèse sur le thème 'Manipuler le métabolisme tissulaire par les acides aminés' (sous presse dans *World's Poultry Science Journal*).

Publication n°1

Effects of heat exposure on Akt/S6K1 signaling and expression of genes related to protein and energy metabolism in chicken (*Gallus gallus*) *pectoralis major* muscle

S. Boussaid-Om Ezzine, N. Everaert, S. Métayer-Coustard, N. Rideau, C. Berri, Romain Joubert, S. Temim, A. Collin, S. Tesseraud

Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 157 (2010) 281-287.

Publication n°2

Regulators of protein metabolism are affected by cyclical nutritional treatments with diets varying in protein and energy content

S. Boussaid-Om Ezzine, S. Métayer-Coustard, A. Collin, C. Leterrier, I. Bouvarel, I. Seiliez, S. Tesseraud. *Accepté dans Journal of Nutritional Biochemistry* (septembre 2011).

Partie1. Effets d'une exposition à la chaleur sur la voie de signalisation Akt/S6K1 et sur l'expression des gènes impliqués dans les métabolismes protéique et énergétique dans le muscle *Pectoralis major* du poulet (*Gallus gallus*) (Publication n°1)

Résumé :

Afin de mieux comprendre les modifications de la croissance musculaire induites par une exposition à la chaleur, nous avons déterminé l'expression de gènes spécifiques impliqués dans le métabolisme protéino-énergétique au niveau du muscle *Pectoralis major* chez le poulet de chair. Nous avons également exploré la voie de signalisation protéine kinase B (PKB appelée aussi Akt)/p70S6 kinase (S6K1)/S6, impliquée dans la transduction des signaux anaboliques régulant ainsi le métabolisme et l'équilibre protéosynthèse/protéolyse. Des poulets de quatre semaines d'âge ont été exposés à 32 ou à 22°C pendant 1 semaine. Les poulets des deux groupes ont été mis à jeun ou non pendant 16 h, et ont reçu ou non une administration orale d'une solution de glucose et arginine pour induire une réponse anabolique (traitement de 30 min). L'exposition à la chaleur et la diminution de l'ingéré associée modifient l'expression de quelques gènes impliqués dans le métabolisme énergétique (par exemple sous-expression du facteur de transcription PGC-1α de -40%) et le métabolisme protéique (par exemple sur-expression de l'E3 ubiquitine ligase atrogin-1 de +80%). Cependant, dans nos conditions expérimentales, l'expression de nombreux gènes du métabolisme musculaire est inchangée. La capacité de synthèse des protéines musculaires (rapport ARN/protéines) est clairement réduite au chaud (environ -20%). La protéine ribosomale S6 est légèrement moins activée par le traitement glucose et arginine à 32°C comparé à 22°C, ce qui pourrait indiquer une efficacité un peu moindre de la traduction des ARNm en protéines au chaud. L'analyse de l'équilibre glucose/insuline suggère des changements du métabolisme du glucose suite à l'exposition d'une semaine à la chaleur, ce qui reste à démontrer.

Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 157 (2010) 281–287

Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Biochemistry and Physiology, Part B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cbpb

Effects of heat exposure on Akt/S6K1 signaling and expression of genes related to protein and energy metabolism in chicken (*Gallus gallus*) *pectoralis major* muscle

S. Boussaid-Om Ezzine [a], N. Everaert [b], S. Métayer-Coustard [a], N. Rideau [a], C. Berri [a], R. Joubert [a], S. Temim [c], A. Collin [a], S. Tesseraud [a,*]

[a] INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France
[b] Departement of Biosystems. Laboratory for Physiology and Immunology of Domestic Animals, K.U. Leuven, Kasteelpark Arenberg, 30, 3001 Leuven, Belgium
[c] Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, B.P. 161 El Harrach, Alger, Algérie

ARTICLE INFO

Article history:
Received 22 January 2010
Received in revised form 30 June 2010
Accepted 4 July 2010
Available online 8 July 2010

Keywords:
Gene expression
Signaling
Muscle metabolism
Heat exposure
Chicken

ABSTRACT

In order to improve understanding of the heat-induced changes in muscle growth, we determined the expression of genes related to protein and energy metabolism in the *pectoralis major* muscle of chickens. We also explored the protein kinase B (PKB also called Akt)/p70 S6 kinase (S6K1)/S6 pathway that mediates anabolic signals thereby regulating metabolism and hypertrophic/atrophic balance. Four-week-old chickens were exposed to 32 or 22 °C for 1 week. Chickens from both groups were then fasted for 16 h or left fed, and submitted to an oral administration of glucose–arginine to induce an anabolic response (30-min treatment) or left untreated. High ambient temperature and the associated decrease in feed intake modified the expression of certain energy-related genes (e.g. −40% for PGC-1α) and protein metabolism (e.g. about +80% for atrogin-1), but the expression of several muscle metabolism-related genes considered here was unchanged. The capacity for muscle protein synthesis, i.e. RNA/protein ratio, was reduced in warm conditions (~−20%). Slightly lower activation of S6 induced by glucose–arginine treatment was found at 32 °C compared to 22 °C, which might indicate somewhat lower efficiency of mRNA translation. Analysis of glucose/insulin balance suggested changes in glucose metabolism under heat exposure. However, this remains to be characterized.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Chronic heat exposure drastically affects chicken growth performance and feed intake, and causes a series of physiological and metabolic changes such as depressed protein deposition (Geraert et al., 1996a; Temim et al., 1999, 2000). Under these critical conditions, the changes in protein deposition may be the consequence of changes in protein synthesis and/or proteolysis. In chickens, muscle protein synthesis is clearly decreased, irrespective of muscle type (Temim et al., 2000). This is related to a lower capacity for protein synthesis (assessed by the RNA/protein ratio representative of ribosomal capacity), independently of feed intake. A reduction in translational efficiency (i.e. amount of protein synthesized daily per RNA unit) is also observed, at least for the *pectoralis major* muscle. On the other hand, indirect measurements of muscle proteolysis have not provided definitive conclusions regarding the heat-related changes in this component of protein turnover (Temim et al., 2000). Moreover, despite several studies exploring the effects of chronic heat exposure on metabolic and hormonal parameters (Geraert et al., 1996b; Collin et al., 2002; McMorris et al., 2006) and muscle protein turnover (Yunianto et al., 1997; Samuels et al., 2000; Temim et al., 2000) in mammals and birds, little information is available on the molecular and cellular mechanisms through which muscle protein deposition is reduced under these critical conditions for any species.

Recent studies have highlighted genes that are specifically induced during atrophy (atrophy-related genes, also called atrogenes) for their essential role in controlling muscle proteolysis (Gomes et al., 2001; Bodine et al., 2001). These genes encode muscle-specific E3-ubiquitin ligases such as Muscle Atrophy F box (MAFbx or atrogin-1) and Muscle Ring Finger-1 (MuRF1) involved in the ubiquitination of proteins targeted to the ubiquitin-proteasome-dependent proteolytic system. Two other major proteolytic systems are involved in vertebrate muscle proteolysis, i.e. lysosomal and Ca^{2+}-dependent systems involving cathepsins and calpain/calpastatin, respectively (Lecker et al., 1999; Attaix et al., 2001). Although they are not systematically activated in muscle wasting conditions (Lecker et al., 1999; Attaix et al., 2001), such proteolytic systems have to be considered because they potentially contribute to muscle protein degradation. As protein turnover is a highly

Abbreviations: Akt or PKB, protein kinase B; atrogin-1 or MAFbx, muscle atrophy F box; C2, proteasome C2 subunit also called proteasome α1 subunit; Cs, ribosomal capacity; GP, glycolytic potential; GSK3, glycogen synthase kinase 3; MuRF1, muscle ring finger-1; Nutr, nutritional state; PGC-1α, PPARγ coactivator-1α; S6K1, p70 S6 kinase or 70 kDA ribosomal protein S6 kinase; S6, ribosomal protein S6; Temp, temperature; Ub, ubiquitin.

* Corresponding author. Tel.: +33 2 47 42 78 32; fax: +33 2 47 42 77 78.
E-mail address: Sophie.Tesseraud@tours.inra.fr (S. Tesseraud).

1096-4959/$ – see front matter © 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.cbpb.2010.07.001

energy-consuming process, the reduction in protein deposition under heat conditions may originate from a failure in the energy supply. The transcription factor PPARγ coactivator-1α (PGC-1α), that has been shown to be sensitive to cold exposure in the chicken (Ueda et al., 2005; Ijiri et al., 2009), acts as a key regulator of mitochondrial biogenesis, oxidative metabolism and glucose uptake (Handschin and Spiegelman, 2006). PPARs have important roles in controlling energy metabolism in the whole body and in the regulation of fatty acid oxidation, particularly for PPARα and β/δ (Grimaldi, 2007). Glycogen synthase kinase 3 (GSK3), glycogen synthase and glycogen phosphorylase are involved in glucose metabolism (Welsh et al., 1996; Doble and Woodgett, 2003; Sibut et al., 2008). It is of note that genes such as atrogin-1, MuRF1, PPAR, PGC-1α, GSK3 are insulin sensitive, or related to insulin action or development of insulin resistance.

Insulin is a major regulator of glucose metabolism, and is also the primary hormone known to regulate protein metabolism acting on both protein synthesis and proteolysis (Tesseraud et al., 2007b). Insulin sensitivity might be modified in warm conditions, as suggested by Geraert et al. (1996b), but the underlying mechanisms have never been explored and the involvement of heat-related changes in insulin response has not yet been defined in any species. In the chicken as in mammals, insulin acts via the activation of its receptor, whose role is to recognize the hormone and to initiate a cascade of intracellular events (Proud, 2006; Taniguchi et al., 2006; Tesseraud et al., 2007b). The insulin signal is mediated by the activation of intracellular kinases such as protein kinase B (PKB also called Akt), affecting the phosphorylation of some major effectors involved in the regulation of glucose utilization (e.g. GSK3), proteolysis (e.g. atrogin-1) and protein synthesis (e.g. p70 S6 kinase, S6K1). Cytoplasmic serine/threonine S6K1 is stimulated after a single insulin injection in chickens, with concomitant phosphorylation of the ribosomal protein S6 (S6) (Bigot et al., 2003; Duchêne et al., 2008a,b). S6K1 is activated by other anabolic signals including amino acids through a signaling pathway that is well conserved between species (Tesseraud et al., 2006). The aim of the present study was to investigate the effects of heat exposure for one week on specific genes related to protein and energy metabolism in chickens. In addition to studying their muscular expression under heat exposure, we investigated the Akt/S6K1 signaling cascade. Breeding conditions and experimental procedures were based on our previous studies (Temim et al., 1999, 2000) comparing two ambient temperatures (22 or 32 °C).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Nitrocellulose membrane, pre-made polyacrylamide solution and protein standards were purchased from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). Antibodies raised against phospho-Akt [S473], Akt, phospho-GSK3α,β [S21/9], phospho-S6K1 [T389], phospho-S6K1 [T421/S424], phospho-S6 [S235/S236] and S6 were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Anti-S6K1 antibody was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) and anti-vinculin from Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA). Antibodies to 20S proteasome α-subunits (against subunit C8 and subunits C2, C3, C8, C9, Iota and Zeta) were from Biomol International (Enzo Life Sciences International, Inc., Plymouth Meeting, PA, USA). Alexa Fluor secondary antibodies were from Molecular Probes (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

2.2. Animals and experimental procedures

One-day-old male broiler chicks (*Gallus gallus*; Ross strain, Sicamem, France) were reared conventionally for the first 28 d. They received a complete starter diet with 22% Crude Protein (CP) and 3100 kcal metabolizable energy/kg. Water was provided *ad libitum* throughout the experiment and the light schedule was 23:1 h light–dark cycle. On d28, the birds were divided into two homogenous mass-matched groups (1349 ± 17 g) and transferred to individual cages under controlled environmental conditions, at either 32 °C (high constant temperature) or 22 °C (thermoneutrality) for the following 7 d. They were fed a complete standard growing diet with 20% CP and 3100 kcal metabolizable energy/kg *ad libitum*. Food intake was recorded every day from 28 to 34 d for the determination of individual daily consumption. Body weights were measured at 28 and 34 d to determine individual growth rates. At 34 d of age, chickens exposed to 22 °C or 32 °C were either fed *ad libitum* or fasted for 16 h (overnight) to investigate the effects of heat exposure under the two nutritional states. Then, to explore the potential heat-related changes in both glucose/insulin balance and signaling, 35-d-old chickens from each group (fed and fasted at 22 °C and 32 °C) received an oral administration of a solution containing 2 g/kg glucose and 0.21 g/kg arginine 30 min before slaughter or were left untreated. This amount of glucose has been shown to induce a transitory increase in insulinemia in chickens (Simon and Rosselin, 1978). Since heat exposure may limit insulin secretion in heat-treated birds (Geraert et al., 1996b), arginine was provided in the glucose solution for its stimulatory action in insulin secretion (Rideau et al., 1986; Cochard et al., 1998; Frank et al., 2007). The amount of arginine chosen significantly and transiently raises plasma and tissue arginine concentrations in various species (Obled, 1988; Tesseraud, 1991). Eight groups of six chickens were therefore constituted according to: ambient temperature (32 *vs.* 22 °C), nutritional state (fed *vs.* fasted condition) and treatment (glucose–arginine *vs.* control). Chickens from the four environmental condition groups had similar body weights (2017 ± 47 g at 22 °C and 1706 ± 54 g at 32 °C). After blood sampling, all the chickens were sacrificed by decapitation. The *pectoralis major* muscles were removed, weighed, quickly frozen in liquid nitrogen, and stored at −80 °C until analysis. After blood centrifugation, aliquots of plasma were prepared and stored at −20 °C until the determination of glucose and insulin levels. All experiments were carried out with due regard to legislation governing the ethical treatment of animals, and investigators were certified by the French government to carry out animal experiments.

2.3. Plasma glucose and insulin concentrations

Plasma glucose levels were measured by the glucose oxidase method using an automated analyzer (Glucose Beckman Analyzer 2; Palo Alto, CA, USA). Plasma insulin levels were determined by radioimmunoassay with a guinea pig anti-porcine insulin antibody (Ab 27-6, generously provided by Dr. G. Rosselin, Saint-Antoine Hospital, Paris, France) using chicken insulin as the standard (Ruffier et al., 1998). All samples were run in the same assay in order to avoid inter-assay variations.

2.4. Muscle glycolytic potential and ribosomal capacity

Glycolytic potential (GP) represents an estimate of muscle glycogen level at slaughter (Monin and Sellier, 1985). It takes into account the main intermediates of glycogen degradation in live and postmortem muscle and therefore represents an estimate of *in vivo* glycogen level. Glycogen, glucose-6-phosphate, free glucose and lactate were measured in *pectoralis major* muscles by enzymatic procedures according to Dalrymple and Hamm (1973). Glycolytic potential was calculated according to the formula: GP = 2[glycogen + glucose + glucose-6-phosphate] + lactate, and was expressed as μmoles of lactate equivalent per g of tissue.

Ribosomal capacity (Cs), i.e. the ratio of RNA to protein, corresponds to the capacity for protein synthesis of a tissue; it is an index related to the number of ribosomes and thus protein synthesis machinery (Millward and Waterlow, 1978). Frozen powdered muscle samples were homogenized in 2% $HClO_4$, according to the method of

Schmidt–Thannhauser as modified by Munro and Fleck (1969). Protein content was measured using the bicinchoninic acid kit (Interchim, Montluçon, France). Total RNA was measured on the basis of the ultraviolet absorbance at 260 nm, with a correction for peptide material based on the ultraviolet absorbance at 232 nm. Ribosomal capacity (Cs) was then calculated as the ratio between total RNA and protein, and expressed as mg RNA per g protein.

2.5. Preparation of muscle lysates and Western blotting

To analyze the signaling pathways potentially affected by heat exposure, muscle lysates were prepared as previously described (Duchêne et al., 2008a,b). Protein concentrations were determined using the Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, USA). Tissue lysates (60 μg of protein) were subjected to SDS-PAGE gel electrophoresis and Western blotting using the appropriate antibody. Membranes were also probed with an anti-vinculin antibody to control gel loading. After washing, membranes were incubated with an Alexa Fluor secondary antibody (Molecular Probes, Interchim, Montluçon, France). Bands were visualized by Infrared Fluorescence using the Odyssey® Imaging System (LI-COR Inc. Biotechnology, Lincoln, NE, USA) and quantified by Odyssey infrared imaging system software (Application software, version 1.2).

2.6. RNA extraction and qRT-PCR analyses

Total RNA was extracted using RNA Now (Biogenetic, Seabrook, TX, USA) according to the manufacturer's recommendations. After RNase-Free DNase treatment, RNA was reverse-transcribed using Super Script II RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and Random primers (Promega, Charbonnieres-les-bains, France). Quantitative real time RT-PCRs were performed in duplicate using an ABI Prism 7000 apparatus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The primers chosen to study the expression of specific selected genes (20S proteasome C2, MuRF1, Atrogin-1, Cathepsin B, m-calpain for proteolysis; PGC-1α, PPARα and β/δ for transcription factors and energy metabolism; GSK3, Glycogen synthase, Glycogen phosphorylase for insulin signaling and glucose metabolism) had previously been used in our laboratory (Dupont et al., 2008; Tesseraud et al., 2009; Sibut et al., 2008). Gene mRNA levels were estimated on the basis of PCR efficiency and threshold cycle (Ct) deviation of an unknown sample compared to a control, as previously described (Chabrolle et al., 2007). 18S ribosomal RNA was chosen as the reference gene.

2.7. Statistical analysis

Values are presented as means ± SEM. The data were processed using the Statview Software program, version 5 (SAS Institute, Cary, NC, USA). The homogeneity of variance between groups was tested by Bartlett's test. In the case of heterogeneity of variance, the non-parametric Kruskal–Wallis test was used to test differences between groups (for levels of phosphorylation, and plasma concentrations of glucose and insulin). Means were then compared using the Mann–Whitney test. To give a clear presentation of the results, we chose to show signaling data in the fasted state but not in the fed state, in which there was no effect of ambient temperature (Temp, 32 *vs.* 22 °C) or treatment (glucose–arginine *vs.* control). For growth performance and gene expression, data were subjected to analysis of variance (ANOVA) considering Temp (32 *vs.* 22 °C), nutritional state (Nutr, fed *vs.* fasted condition) and treatment (glucose–arginine *vs.* control) as main effects and their interactions in the model. No effect of treatment or interaction between Temp or Nutr and treatment was found. For sake of clarity, data were therefore pooled across treatments (i.e. control and glucose–arginine groups were pooled) and analyzed again by considering Temp and Nutr as main effects. The means were compared by Fisher's least significant difference test in the case of a significant effect and $P<0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Growth performance and muscle characteristics

Heat exposure for one week markedly affected growth performance. Body weight gain was 55.9 ± 2.8 *vs.* 94.5 ± 2.1 g/d at 32 °C and 22 °C, respectively ($P<0.001$), corresponding to a decrease of ~40% in warm conditions. Similarly, feed intake was significantly lower at 32 °C than at 22 °C (128.0 ± 2.9 *vs.* 168.8 ± 2.7 g/d, respectively, i.e. decrease of ~25%; $P<0.001$). Feed conversion ratio was significantly higher at 32 °C than at 22 °C (2.29 ± 0.08 *vs.* 1.79 ± 0.02 g/g, respectively, i.e. ~+30%; $P<0.001$). *Pectoralis major* muscle characteristics were determined in 35-d-old chickens that were fed or food-deprived for 16 h (Table 1). High ambient temperature significantly reduced muscle weight (by ~15 to 20% according to the nutritional state, $P<0.001$). Similar findings were observed for body weight on d35. Muscle glycolytic potential was not significantly affected by ambient temperature, whereas it was lower in food-deprived chickens compared to fed chickens ($P<0.05$). Muscle RNA content and ribosomal capacity (i.e. capacity for muscle protein synthesis) were reduced in heat-exposed chickens, irrespective of nutritional state (decrease of ~20%, $P<0.05$).

3.2. Gene expression in skeletal muscle

We first investigated whether one-week heat exposure could affect mRNA expression of some specific genes in the *pectoralis major* muscle of fasted and fed chickens (Table 2). Selected genes are involved in energy and protein metabolism. The E3 Ubiquitin ligase atrogin-1 was up-regulated by heat exposure (~+80%), whereas the protease m-calpain was down-regulated (~−50%) whatever the

Table 1
Effects of one-week heat exposure on body weight and breast muscle characteristics in fasted and fed chickens at 35 d of age[1].

Nutritional state (Nutr)	Fasted		Fed		*P* values		
Ambient temperature (Temp)	22 °C	32 °C	22 °C	32 °C	Nutr	Temp	Nutr×Temp
Body mass, g	1883 ± 40 [b]	1656 ± 22 [c]	2126 ± 27 [a]	1756 ± 48 [c]	<0.001	<0.001	<0.05
Muscle mass, g	127.07 ± 4.09 [b]	110.94 ± 4.34 [c]	146.58 ± 3.77 [a]	114.55 ± 3.59 [c]	<0.01	<0.001	<0.05
Muscle GP, μmol/g[2]	87.4 ± 2.9	86.1 ± 2.7	101.3 ± 5.6	92.2 ± 3.3	<0.05	NS	NS
Muscle proteins, mg/g	126.2 ± 2.6	122.3 ± 2.6	118.1 ± 1.5	126.4 ± 4.4	NS	NS	NS
Muscle RNA, μg/g	948 ± 49	734 ± 67	1061 ± 71	732 ± 72	NS	<0.001	NS
Cs, mg/g[3]	7.08 ± 0.49	6.13 ± 0.54	8.43 ± 0.77	6.71 ± 0.54	NS	<0.05	NS

[1]Chickens were exposed between 4 and 5 weeks of age to either 22 °C or 32 °C. Five-week-old chickens were fed *ad libitum* or fasted for 16 h. Data are expressed as means ± SEM ($n=12$). They were analyzed using two-way ANOVA considering the ambient temperature and nutritional state as main effects (see Materials and methods). Means not sharing the same letter are significantly different ($P<0.05$).
[2]GP, glycolytic potential expressed as μmoles of lactate equivalent per g of tissue. For this parameter, analyses were performed on six chickens per group.
[3]Cs, ribosomal capacity.

Table 2
Effects of one-week heat exposure on gene expression in *pectoralis major* muscle in fasted and fed chickens[1].

Nutritional state (Nutr)	Fasted		Fed		*P* values		
Ambient temperature (Temp)	22 °C	32 °C	22 °C	32 °C	Nutr	Temp	Nutr×Temp
Proteolysis							
Atrogin-1	0.62 ± 0.13	0.87 ± 0.21	0.58 ± 0.09	1.30 ± 0.28	NS	<0.05	NS
Ubiquitin	1.08 ± 0.11^{b}	1.41 ± 0.14^{ab}	1.85 ± 0.16^{a}	1.51 ± 0.15^{ab}	<0.01	NS	<0.05
m-calpain	0.89 ± 0.19	0.47 ± 0.04	1.24 ± 0.24	0.64 ± 0.16	NS	<0.01	NS
Transcriptional factors and energy metabolism							
PGC-1α	1.08 ± 0.12	0.71 ± 0.12	0.95 ± 0.15	0.56 ± 0.08	NS	<0.01	NS
PPARα	0.67 ± 0.07	0.57 ± 0.04	0.75 ± 0.07	0.88 ± 0.11	<0.05	NS	NS

[1]Chickens were exposed between 4 and 5 weeks of age to either 22 °C or 32 °C. Five-week-old chickens were fed *ad libitum* or fasted for 16 h. The relative expression of each gene (i.e., corrected for 18S rRNA that did not significantly differ according group) was determined by real time RT-PCR as described in Materials and methods. Data are expressed as means ± SEM ($n = 12$). They were analyzed using two-way ANOVA considering the ambient temperature and nutritional state as main effects (see Materials and Methods). Means not sharing the same letter are significantly different ($P<0.05$). Several transcripts were not significantly different according group and are not presented in the table (20S proteasome C2, MuRF1, Cathepsin B for proteolysis; PPARβ/δ for transcriptional factors and energy metabolism; GSK3, Glycogen synthase, Glycogen phosphorylase for insulin signaling and glucose metabolism).

nutritional state. The mRNA levels of ubiquitin were not significantly different between 22 and 32 °C despite an interaction between the effects of ambient temperature and nutritional state. The expression of other genes related to proteolysis (i.e. 20S proteasome C2, MuRF1, Cathepsin B) was not modified. The levels of some proteasome proteins were determined by Western blotting using antibodies against subunit C8 and subunits C2, C3, C8, C9, Iota and Zeta to confirm further the lack of any effect of heat exposure on the proteasome. In our experimental conditions, we did not record any change in protein expression of 20S proteasome α-subunits (data not shown).

Expression of PGC-1α, a transcription factor involved in energy metabolism, was significantly decreased by heat exposure for one week (~−40%, $P<0.01$). The expression of other transcription factors (PPARα and PPARβ/δ) and that of kinases and phosphorylase involved in glucose metabolism (GSK3, Glycogen synthase and Glycogen phosphorylase) was not changed by heat exposure, whereas an effect of the nutritional state was observed for PPARα, which was higher in fed than in fasted chickens.

3.3. Glucose/insulin balance

In control chickens (white bars; Fig. 1A), one-week heat exposure led to significantly lower glycemia in the fasted state, but not in the fed state. Insulinemia was thus unchanged (Fig. 1A). Administration of glucose and arginine significantly increased chicken glycemia as expected. Whatever the nutritional state, these increases were much more pronounced at 32 °C than at 22 °C (79 *vs.* 48%, respectively, in fasted chickens; 48 *vs.* 22%, respectively in fed chickens). Administration of glucose and arginine augmented insulinemia, especially in fasted chickens; in the fed state, the increase was significant only at 32 °C. It is noteworthy that glucose levels were significantly higher at 32 °C compared to 22 °C in the fed chickens receiving glucose–arginine treatment ($P<0.01$), whereas insulinemia did not significantly differ between the two ambient temperatures.

3.4. Akt/S6K1 signaling pathway

Akt is activated by refeeding and insulin in chicken muscle (Duchêne et al., 2008a, b), but no information is available to date on Akt regulation and activation under heat exposure. Heat exposure for one week did not affect Akt phosphorylation in the fasted state (Fig. 2A). Similar results were found in the fed state (data not shown). Glucose–arginine treatment increased Akt phosphorylation on S473 in fasted chickens ($P<0.05$), and this effect was observed whatever the ambient temperature. We also investigated the potential regulation of an Akt downstream target, i.e. kinase GSK3 known to regulate glycogen synthesis (Welsh et al., 1996). The level of phosphorylation of GSK3 was not affected by one-week heat exposure (data not shown), and thus no heat-related changes in the Akt/GSK3 pathway were recorded in our experimental conditions.

We next focused on the regulation of S6K1 that controls mRNA translation (Proud, 2006). We explored the phosphorylation of this kinase on serine/threonine residues considered as most critical for kinase function, i.e. T389 and T421/S424 (Pullen and Thomas, 1997; Dennis et al., 1998). In control chickens (white bars; Fig. 2B), one-week heat exposure did not alter S6K1 phosphorylation on T389 in the fasted state. By contrast, the level of S6K1 phosphorylation on T421/S424 was greater at 32 °C than at 22 °C ($P<0.05$). No heat-related difference was found in fed chickens for either T389 or T421/S424, S6K1 phosphorylation thus being higher compared to the fasted state, as expected (data not shown).

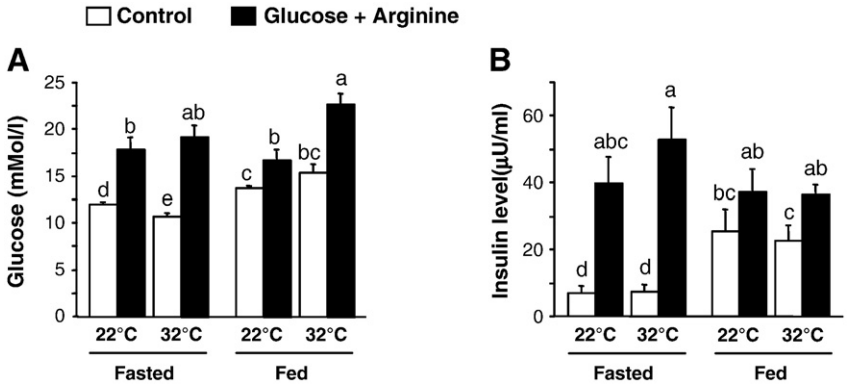


Fig. 1. Effects of one-week heat exposure on plasma glucose (A) and insulin (B) levels in fasted and fed chickens at 5 weeks of age. Chickens were subjected to glucose-arginine treatment or were left untreated. Plasma glucose levels were measured by the glucose oxidase peroxidase method and insulin levels by radioimmunoassay. Data are expressed as means ± SEM ($n = 6$). The non-parametric Kruskal–Wallis test was used to test differences between groups; means were then compared using the Mann–Whitney test. Means not sharing the same letter are significantly different ($P<0.05$).

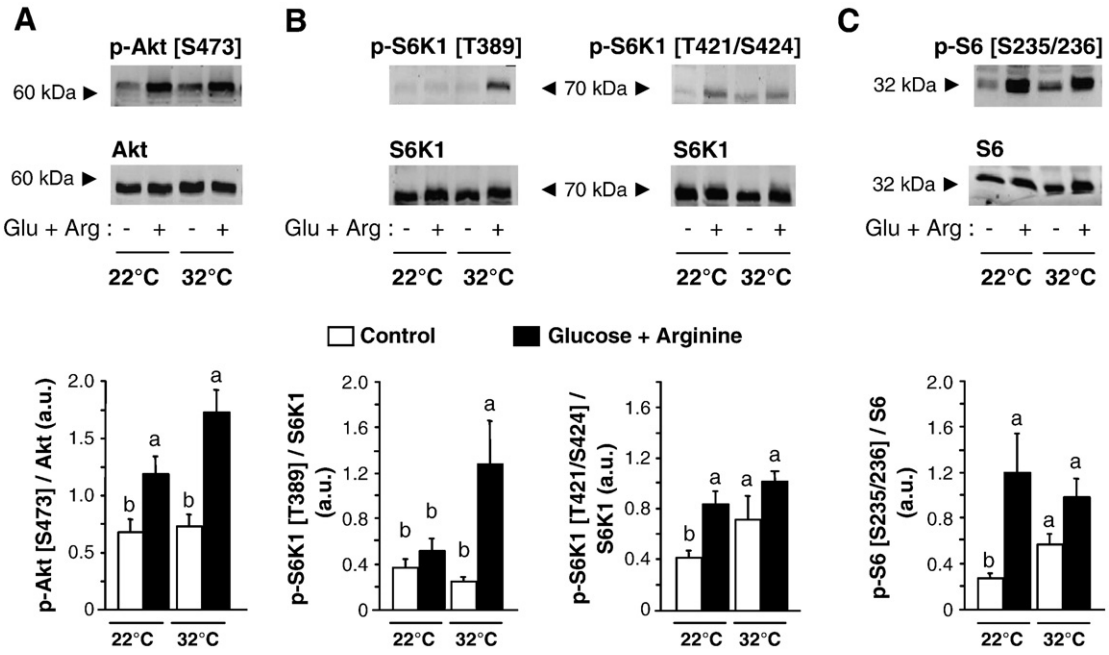


Fig. 2. Effects of one-week heat exposure on the phosphorylation of Akt (A), S6K1 (B), and S6 (C) in the *pectoralis major* muscle of fasted chickens at 5 weeks of age. Chickens were subjected to glucose-arginine treatment or were left untreated. Representative western blots of Akt, S6K1 and S6 phosphorylation. Data are expressed as means ± SEM of Akt, S6K1 and S6 phosphorylation ($n=6$). The non-parametric Kruskal–Wallis test was used to test differences between groups; means were then compared using the Mann–Whitney test. Means not sharing the same letter are significantly different ($P<0.05$).

Administration of glucose and arginine increased S6K1 phosphorylation in fasted chickens, but the significance of the response depended on the residue and ambient temperature: for T389, $P<0.05$ only at 32 °C and for T421/S424, $P<0.05$ only at 22 °C (Fig. 2B). To integrate such specific regulation of S6K1, the phosphorylation of its downstream target S6 was examined. As reported for S6K1 phosphorylation on T421/S424, one-week heat exposure enhanced S6 phosphorylation in skeletal muscle of control fasted chickens (white bars; Fig. 2C). The activation of S6 by glucose–arginine treatment was significant at 22 °C (increase in the phosphorylation level by ~+350%, $P<0.01$), but not at 32 °C (~+75%, $P>0.05$). Similarly, significant activation of S6 by feeding (fed *vs.* fasted state) was found at 22 °C in control chickens (~+450%, $P<0.01$) but not at 32 °C (~+90%, $P>0.05$) (data not shown).

4. Discussion

4.1. Experimental model

We used broiler chickens in the finishing period (from 4 to 5 weeks), during which they are more sensitive to high ambient temperatures than younger birds (Geraert et al., 1996a). Our experimental model consisted of one week's exposure of broiler chickens to a constant temperature of 32 °C or 22 °C, a model based on our previous studies (Temim et al., 1999, 2000). In long-term heat exposure experiments, the choice of appropriate controls is difficult because of the heat-related decrease in food intake. In the present experiment, we did not choose pair-feeding techniques because of repeated cycles of postprandial and post-absorptive states due to meals. These cycles induce short-term variations in supply, and consequently metabolism, whereas chickens consume food throughout the day, providing an almost continuous supply of nutrients. Furthermore, it is doubtful that 22 °C is still in the thermal neutrality zone for pair-fed animals consuming 25% less feed than their *ad libitum*-fed counterparts, with consequences on their metabolism and heat production. Therefore feeding *ad libitum* was preferred in our study, where the proper effect of temperature and that of feed intake reduction were confounded. We showed in this study that heat exposure for one week reduced feed intake (~25%) and much more growth (~40%), thereby increasing the feed to gain ratio as previously reported in broiler chickens after either 1.5 or 2 weeks of heat exposure (Geraert et al., 1996a; Temim et al., 1999, 2000). Moreover, one-week heat exposure reduced *pectoralis major* muscle weight by approximately −20%, in good agreement with previous results of Ain Baziz et al. (1996) and Temim et al. (1999, 2000).

4.2. Effects of heat exposure on parameters related to protein metabolism

At the molecular level, the expression of genes related to proteolysis considered in the present study was unchanged in the majority of cases (20S proteasome C2 subunit, E3 ubiquitin ligase MuRF1, lysosomal protease cathepsin B), with the exception of cytosolic cysteine protease m-calpain (down-regulated), ubiquitin (differently affected by ambient temperature according to nutritional state) and atrogin-1 (up-regulated). In mammals and birds, atrogin-1 has been found to be down-regulated by the addition of amino acids (Tesseraud et al., 2007a; Herningtyas et al., 2008) but over-expressed in atrophic conditions including diabetes and insulin privation (Lecker et al., 2004; Dupont et al., 2008), or following cyclical decreases in supply of dietary lysine (Tesseraud et al., 2009). These findings suggest that the decrease in chicken muscle growth observed here in warm conditions is also associated with upregulation of the muscle-specific E3 ligase atrogin-1. This E3 ubiquitin ligase participates in controlling the predominant proteolytic process in muscle, i.e. the ubiquitin-proteasome-dependent pathway (Lecker, 2003), that could thus be activated by higher ambient temperature or heat-related decrease in feed intake.

We showed in this study that the ribosomal capacity (Cs), estimated in muscle by the ratio of RNA to protein, was clearly reduced under heat exposure in both fasted and fed chickens, in agreement with previous results (Temim et al., 2000). Cs is measured in metabolic studies as an index of the synthesis capacity of a tissue related to the number of ribosomes (Millward and Waterlow, 1978). These findings thus indicate a heat-related reduced capacity for protein synthesis in the skeletal muscle of chickens. The efficiency of

protein synthesis might also be affected at the translational level. We therefore studied the S6K1/S6 signaling pathway involved in the control of mRNA translation into proteins, which is activated in response to anabolic factors in mammals and birds (Proud, 2006; Taniguchi et al., 2006; Tesseraud et al., 2006). In the study reported here, the S6K1 pattern of phosphorylation showed some slight and unexplained discrepancies according to residues (i.e. T389 and T421/S424). S6K1 has several serine/threonine residues, corresponding to 8 potential phosphorylation sites. A recent *in vitro* study performed with mammalian cells emphasized the complexity of S6K1 regulation since the phosphorylation of a particular site is not necessarily concordant with activation of the kinase (Musnier et al., 2009). Interestingly, the activation of the S6K1 downstream target considered in this study (i.e. S6) by glucose–arginine treatment in fasted chickens and by nutritional state in control chickens was significant at 22 °C, but not at 32 °C, suggesting an impaired response to anabolic signals under heat exposure. Taken together, our results demonstrated that exposure to a high ambient temperature for one week alters the synthesis machinery and/or initiation of translation consistently with the lower rates of protein synthesis previously found in skeletal muscles of heat-exposed chickens (Temim et al., 2000).

4.3. Effects of heat exposure on parameters related to energy metabolism

Our results indicate that the muscular expression of PGC-1α, a transcription factor regulating energy metabolism, was clearly reduced (by approximately −40%) during heat exposure for one week. This is in agreement with recent findings obtained in birds submitted to acute (i.e. 5 h) heat stress (Bedrani et al., 2009) or to 24 h rewarming after 24 h of cold exposure (Ijiri et al., 2009). Moreover, there is evidence that acute cold exposure (e.g. 24 h) up-regulates PGC-1α in the skeletal muscles of chickens, although this change in PGC-1α expression was not sustained in chickens exposed to long-term cold (i.e. one week) (Ueda et al., 2005). The markedly lower values found here even after one week of heat exposure may be partly due to the higher fat deposition in heat-exposed chickens (Ain Baziz et al., 1996), in agreement with reduced expression of PGC-1α in obese mammals (Crunkhorn et al., 2007). Considering the function of PGC-1α (see Handschin and Spiegelman, 2006 for a review), these findings could also reflect lower intensity of oxidative metabolism, which would be consistent with the reduction of heat production reported in birds (Li et al., 1992; Tesseraud and Temim, 1999) and in pigs (Collin et al., 2001a,b,c) in warm conditions. Whether or not this also has an incidence on ATP synthesis and energy availability for protein synthesis remains to be elucidated. Our results also indicate that the expression of PPARs, transcription factors involved in fatty acid utilization, was unchanged in heat-exposed chickens. In view of the fact that heat-exposed chickens exhibit increased fatness (Ain Baziz et al., 1996), this appears surprising considering that lower muscle fatty acid utilization has been reported to be associated with higher adiposity in mammals and fish (Colberg et al., 1995; Young et al., 2002; Kolditz et al., 2008). However, as reported in a recent study performed in chickens selected for high or low abdominal adiposity (Collin et al., 2009), this relationship is not systematic.

4.4. Glucose utilization and insulin control

In the present study, one-week heat exposure did not modify the expression of genes related to glucose utilization (e.g. GSK3, Glycogen synthase, Glycogen phosphorylase) nor did it affect activation of the Akt/GSK3 pathway. However, by reducing the expression of PGC-1α, i.e. a transcription factor that promotes glucose uptake in skeletal muscle, in particular after cold exposure (Oliveira et al., 2004), this could modify glucose utilization. In agreement with this, our results showed that administration of glucose–arginine to fed chickens induced higher glycemia at 32 °C than at 22 °C, without a temperature-related difference in insulinemia, suggesting a lower capacity of insulin to stimulate glucose uptake or delayed response kinetics under heat conditions. Whether or not there is insulin resistance in heat-exposed chickens is an unsolved issue, since we did not find major changes in insulin signaling in the warm environment, despite the indubitable heat-related decrease in mRNA level of the PGC-1α gene, known to coordinate insulin signaling. Indeed, PGC-1α depletion has been shown to attenuate insulin signal transduction in C2C12 myotubes (Pagel-Langenickel et al., 2008), and this transcription factor has been hypothesized to have a central role in the pathophysiology of insulin resistance (Pagel-Langenickel et al., 2008; Patti et al., 2003). Further exploration of this potential insulin insensitivity of chickens should focus on the insulin-sensitive glucose transporter (Glut4 in muscle of mammalian species) that remains to be formally characterized in chickens (see Dupont et al., 2009 for a review).

In conclusion, heat exposure for one week decreases muscle growth and depresses muscle protein synthesis (particularly lower capacity for muscle protein synthesis) in 5-week-old broiler chickens. These findings were associated with changes in the expression of some specific genes related to energy and protein metabolism. Our results also suggest heat-induced differences with regard to glucose/insulin balance, supporting the hypothesis that glucose metabolism is affected in heat-exposed chickens. The factors regulating changes in chicken metabolism and the underlying mechanisms during heat exposure require further investigation.

Acknowledgements

We are grateful to K. Gérard (INRA, UE1295 Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours, F-37380 Nouzilly, France) for animal care, S. Crochet, E. Cailleau-Audouin and M. Derouet (INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France) for technical assistance and V. Santé-Lhoutellier for determining glycolytic potential (INRA, UR370 Qualité des produits animaux, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France). We would like to thank P. Lescoat (INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France) for valuable discussions. This study was funded by INRA. S. Boussaid is a PhD student supported by grants from INRA and the Government of Tunisia.

References

Ain Baziz, H., Geraert, P.A., Padilha, J.C.F., Guillaumin, S., 1996. Chronic heat exposure enhances fat deposition and modifies muscle and fat partition in broiler carcasses. Poult. Sci. 75, 505–513.

Attaix, D., Combaret, L., Pouch, M.N., Taillandier, D., 2001. Regulation of proteolysis. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 4, 45–49.

Bedrani, L., Berri, C., Grasteau, S., Jego, Y., Yahav, S., Everaert, N., Jlali, M., Joubert, R., Métayer-Coustard, S., Praud, C., Temim, S., Tesseraud, S., Collin, A., 2009. Effects of embryo thermal conditioning on thermotolerance, parameters of meat quality and muscle energy metabolism in heavy line of chicken. Proceedings of the 4th Workshop on Fundamental Physiology and Perinatal Development in Poultry; WPSA; 2009/09/10-12; Bratislava, Slovak Republic.

Bigot, K., Taouis, M., Tesseraud, S., 2003. Refeeding and insulin regulate S6K1 activity in chicken skeletal muscles. J. Nutr. 133 (2), 369–373.

Bodine, S.C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V.K., Nunez, L., Clarke, B.A., Poueymirou, W.T., Panaro, F.J., Na, E., Dharmarajan, K., Pan, Z.Q., Valenzuela, D.M., DeChiara, T.M., Stitt, T.N., Yancopoulos, G.D., Glass, D.J., 2001. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. Science 294, 1704–1708.

Chabrolle, C., Tosca, L., Crochet, S., Tesseraud, S., Dupont, J., 2007. Expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in chicken ovary: potential role in ovarian steroidogenesis. Domest. Anim. Endocrinol. 33 (4), 480–487.

Cochard, A., Guilhermet, R., Bonneau, M., 1998. Plasma growth hormone (GH), insulin and amino acid responses to arginine with or without aspartic acid in pigs. Effect of the dose. Reprod. Nutr. Dev. 38 (3), 331–343.

Colberg, S.R., Simoneau, J.A., Thaete, F.L., Kelley, D.E., 1995. Skeletal muscle utilization of free fatty acids in women with visceral obesity. J. Clin. Invest. 95, 1846–1853.

Collin, A., Lebreton, Y., Fillaut, M., Vincent, A., Thomas, F., Herpin, P., 2001a. Effects of exposure to high temperature and feeding level on regional blood flow and oxidative capacity of tissues in piglets. Exp. Physiol. 86 (1), 83–91.

Collin, A., van Milgen, J., Dubois, S., Noblet, J., 2001b. Effect of high temperature and feeding level on energy utilization in piglets. J. Anim. Sci. 79 (7), 1849–1857.

Collin, A., van Milgen, J., Dubois, S., Noblet, J., 2001c. Effect of high temperature on feeding behaviour and heat production in group-housed young pigs. Br. J. Nutr. 86 (1), 63–70.
Collin, A., Vaz, M.J., Le Dividich, J., 2002. Effects of high temperature on body temperature and hormonal adjustments in piglets. Reprod. Nutr. Dev. 42 (1), 45–53.
Collin, A., Swennen, Q., Skiba-Cassy, S., Buyse, J., Chartrin, P., Le Bihan-Duval, E., Crochet, S., Duclos, M.J., Joubert, R., Decuypere, E., Tesseraud, S., 2009. Regulation of fatty acid oxidation in chicken (*Gallus gallus*): interactions between genotype and diet composition. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 153 (2), 171–177.
Crunkhorn, S., Dearie, F., Mantzoros, C., Gami, H., da Silva, W.S., Espinoza, D., Faucette, R., Barry, K., Bianco, A.C., Patti, M.E., 2007. Peroxisome proliferator activator receptor gamma coactivator-1 expression is reduced in obesity: potential pathogenic role of saturated fatty acids and p38 mitogen-activated protein kinase activation. J. Biol. Chem. 282 (21), 15439–15450.
Dalrymple, R.H., Hamm, R., 1973. A method for extraction of glycogen and metabolites from a single muscle sample. J. Food Technol. 8, 439–444.
Dennis, P.B., Pullen, N., Pearson, R.B., Kozma, S.C., Thomas, G., 1998. Phosphorylation sites in the autoinhibitory domain participate in p70(s6k) activation loop phosphorylation. J. Biol. Chem. 273, 14845–14852.
Doble, B.W., Woodgett, J.R., 2003. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. J. Cell Sci. 116 (Pt 7), 1175–1186.
Duchêne, S., Audouin, E., Berri, C., Dupont, J., Tesseraud, S., 2008a. Tissue-specific regulation of S6K1 by insulin in chickens divergently selected for growth. Gen. Comp. Endocrinol. 156 (1), 190–198.
Duchêne, S., Metayer, S., Audouin, E., Bigot, K., Dupont, J., Tesseraud, S., 2008b. Refeeding and insulin activate the Akt/p70S6 kinase pathway without affecting IRS1 tyrosine phosphorylation in chicken muscle. Domest. Anim. Endocrinol. 34 (1), 1–13.
Dupont, J., Tesseraud, S., Derouet, M., Collin, A., Rideau, N., Crochet, S., Godet, E., Cailleau-Audouin, E., Métayer-Coustard, S., Duclos, M.J., Gespach, C., Porter, T.E., Cogburn, L.A., Simon, J., 2008. Insulin immuno-neutralization in chicken: effects on insulin signaling and gene expression in liver and muscle. J. Endocrinol. 197 (3), 531–542.
Dupont, J., Tesseraud, S., Simon, J., 2009. Insulin signaling in chicken liver and muscle. Gen. Comp. Endocrinol. 163 (1–2), 52–57.
Frank, J.W., Escobar, J., Nguyen, H.V., Jobgen, S.C., Jobgen, W.S., Davis, T.A., Wu, G., 2007. Oral N-carbamylglutamate supplementation increases protein synthesis in skeletal muscle of piglets. J. Nutr. 137 (2), 315–319.
Geraert, P.A., Padilha, J.C.F., Guillaumin, S., 1996a. Metabolic and endocrine changes induced by chronic exposure in broiler chickens: Growth performance, body composition and energy retention. Br. J. Nutr. 75, 195–204.
Geraert, P.A., Padilha, J.C.F., Guillaumin, S., 1996b. Metabolic and endocrine changes induced by chronic heat exposure in broiler chickens: biological and endocrinological variables. Br. J. Nutr. 75, 205–216.
Gomes, M.D., Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Navon, A., Goldberg, A.L., 2001. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 14440–14445.
Grimaldi, P.A., 2007. Peroxisome proliferator-activated receptors as sensors of fatty acids and derivatives. Cell. Mol. Life Sci. 64 (19–20), 2459–2464.
Handschin, C., Spiegelman, B.M., 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. Endocr. Rev. 27 (7), 728–735.
Herningtyas, E.H., Okimura, Y., Handayaningsih, A.E., Yamamoto, D., Maki, T., Iida, K., Takahashi, Y., Kaji, H., Chihara, K., 2008. Branched-chain amino acids and arginine suppress MaFbx/atrogin-1 mRNA expression via mTOR pathway in C2C12 cell line. Biochim. Biophys. Acta 1780 (10), 1115–1120.
Ijiri, D., Kanai, Y., Hirabayashi, M., 2009. Possible roles of myostatin and PGC-1alpha in the increase of skeletal muscle and transformation of fiber type in cold-exposed chicks: expression of myostatin and PGC-1alpha in chicks exposed to cold. Domest. Anim. Endocrinol. 37 (1), 12–22.
Kolditz, C., Borthaire, M., Richard, N., Corraze, G., Panserat, S., Vachot, C., Lefèvre, F., Médale, F., 2008. Liver and muscle metabolic changes induced by dietary energy content and genetic selection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 294, R1154–R1164.
Lecker, S.H., 2003. Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting: multiple parallel pathways? Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 6 (3), 271–275.
Lecker, S.H., Solomon, V., Mitch, W.E., Goldberg, A.L., 1999. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. J. Nutr. 129, 227S–237S.
Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Gilbert, A., Gomes, M., Baracos, V., Bailey, J., Price, S.R., Mitch, W.E., Goldberg, A.L., 2004. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. FASEB J. 18, 39–51.
Li, Y., Ito, T., Nishibori, M., Yamamoto, S., 1992. Effects of environmental temperature on heat production associated with food intake and on abdominal temperature in laying hens. Br. Poult. Sci. 33 (1), 113–122.
McMorris, T., Swain, J., Smith, M., Corbett, J., Delves, S., Sale, C., Harris, R.C., Potter, J., 2006. Heat stress, plasma concentrations of adrenaline, noradrenaline, 5-hydroxytryptamine and cortisol, mood state and cognitive performance. Int. J. Psychophysiol. 61 (2), 204–215.
Millward, D.J., Waterlow, J.C., 1978. Effect of nutrition protein turnover in skeletal muscle. Fed. Proc. 37, 2283–2290.
Monin, G., Sellier, P., 1985. Pork of low technological quality with a normal rate of pH fall in the intermediate post mortem period: the case of the Hampshire breed. Meat Sci. 13, 49–63.
Munro, H.N., Fleck, A., 1969. Analysis of tissues and body fluids for nitrogenous constituents. In: Munro, H.N. (Ed.), Mammalian Protein Metabolism, vol. 3. Academic Press, New York, pp. 424–525.
Musnier, A., Heitzler, D., Boulo, T., Tesseraud, S., Durand, G., Lécureuil, C., Guillou, H., Poupon, A., Reiter, E., Crépieux, P., 2009. Developmental regulation of p70 S6 kinase by a G protein-coupled receptor dynamically modelized in primary cells. Cell. Mol. Life Sci. 66 (21), 3487–3503.
Obled, C., 1988. Aspect dynamique du métabolisme protéique au cours du développement du rat après sevrage. Contribution à l'évaluation des méthodes de mesure des vitesses d'utilisation métabolique des acides aminés. Thèse de Docteur ès Sciences de l'Université de Clermont II (FRA); INRA, Laboratoire d'Etude du Métabolisme Azoté, Theix (FRA).
Oliveira, R.L., Ueno, M., de Souza, C.T., Pereira-da-Silva, M., Gasparetti, A.L., Bezzera, R.M., Alberici, L.C., Vercesi, A.E., Saad, M.J., Velloso, L.A., 2004. Cold-induced PGC-1alpha expression modulates muscle glucose uptake through an insulin receptor/Akt-independent, AMPK-dependent pathway. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 287 (4), E686–E695.
Pagel-Langenickel, I., Bao, J., Joseph, J.J., Schwartz, D.R., Mantell, B.S., Xu, X., Raghavachari, N., Sack, M.N., 2008. PGC-1alpha integrates insulin signaling, mitochondrial regulation, and bioenergetic function in skeletal muscle. J. Biol. Chem. 283 (33), 22464–22472.
Patti, M.E., Butte, A.J., Crunkhorn, S., Cusi, K., Berria, R., Kashyap, S., Miyazaki, Y., Kohane, I., Costello, M., Saccone, R., Landaker, E.J., Goldfine, A.B., Mun, E., DeFronzo, R., Finlayson, J., Kahn, C.R., Mandarino, L.J., 2003. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: potential role of PGC1 and NRF1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100 (14), 8466–8471.
Proud, C.G., 2006. Regulation of protein synthesis by insulin. Biochem. Soc. Trans. 34 (Pt 2), 213–216.
Pullen, N., Thomas, G., 1997. The modular phosphorylation and activation of p70s6k. FEBS Lett. 410, 78–82.
Rideau, N., Simon, J., Leclercq, B., 1986. Further characterization of insulin secretion from the perfused duodenum-pancreas of chicken: a comparison of insulin release in chickens selected for high and low abdominal fat content. Endocrinology 119, 2635–2641.
Ruffier, L., Simon, J., Rideau, N., 1998. Isolation of functional glucagon islets of Langerhans from the chicken pancreas. Gen. Comp. Endocrinol. 112 (2), 153–162.
Samuels, S.E., McAllister, T.A., Thompson, J.R., 2000. Skeletal and heart muscle protein turnover during long-term exposure to high environmental temperatures in young rats. Can. J. Physiol. Pharmacol. 78 (7), 557–564.
Sibut, V., Le Bihan-Duval, E., Tesseraud, S., Godet, E., Bordeau, T., Cailleau-Audouin, E., Chartrin, P., Duclos, M.J., Berri, C., 2008. Adenosine monophosphate-activated protein kinase involved in variations of muscle glycogen and breast meat quality between lean and fat chickens. J. Anim. Sci. 86 (11), 2888–2896.
Simon, J., Rosselin, G., 1978. Effect of fasting, glucose, amino acids and food intake on in vivo insulin release in the chicken. Horm. Metab. Res. 10, 93–98.
Taniguchi, C.M., Emanuelli, B., Kahn, C.R., 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7, 85–96.
Temim, S., Chagneau, A.M., Guillaumin, S., Michel, J., Peresson, R., Geraert, P.A., Tesseraud, S., 1999. Effects of chronic heat exposure and protein intake on growth performance, nitrogen retention and muscle development in broiler chickens. Reprod. Nutr. Dev. 39, 145–156.
Temim, S., Chagneau, A.M., Peresson, R., Tesseraud, S., 2000. Chronic heat exposure alters protein turnover of three different skeletal muscles in finishing broiler chickens fed 20 or 25% protein diets. J. Nutr. 130, 813–819.
Tesseraud, S., 1991. Régulation du métabolisme protéique chez des chèvres taries et en lactation. Rôle de l'insuline et des acides aminés explorés par une nouvelle technique de "clamp". Thèse de Docteur de l'Université de Rennes I (FRA); INRA, Laboratoire d'Etude du Métabolisme Azoté, Theix (FRA).
Tesseraud, S., Temim, S., 1999. Modifications métaboliques chez le poulet de chair en climat chaud : conséquences nutritionnelles: INRA Productions Animales, vol. 12, pp. 353–363.
Tesseraud, S., Abbas, M., Duchene, S., Bigot, K., Vaudin, P., Dupont, J., 2006. Mechanisms involved in the nutritional regulation of mRNA translation: features of avian model. Nutr. Res. Rev. 19, 104–116.
Tesseraud, S., Métayer-Coustard, S., Boussaid, S., Crochet, S., Audouin, E., Derouet, M., Seiliez, I., 2007a. Insulin and amino acid availability regulate atrogin-1 in avian QT6 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 357 (1), 181–186.
Tesseraud, S., Métayer, S., Duchêne, S., Bigot, K., Grizard, J., Dupont, J., 2007b. Regulation of protein metabolism by insulin: value of different approaches and animal models. Domest. Anim. Endocrinol. 33 (2), 123–142.
Tesseraud, S., Bouvarel, I., Collin, A., Audouin, E., Crochet, S., Seiliez, I., Leterrier, C., 2009. Daily variations in dietary lysine content alter the expression of genes related to proteolysis in chicken pectoralis major muscle. J. Nutr. 139 (1), 38–43.
Ueda, M., Watanabe, K., Sato, K., Akiba, Y., Toyomizu, M., 2005. Possible role for avPGC-1alpha in the control of expression of fiber type, along with avUCP and avANT mRNAs in the skeletal muscles of cold-exposed chickens. FEBS Lett. 579 (1), 11–17.
Welsh, G.I., Wilson, C., Proud, C.G., 1996. GSK3: a SHAGGY frog story. Trends Cell Biol. 6 (7), 274–279.
Young, M.E., Guthrie, P.H., Razeghi, P., Leighton, B., Abbasi, S., Patil, S., Youker, K.A., Taegtmeyer, H., 2002. Impaired long-chain fatty acid oxidation and contractile dysfunction in the obese Zucker rat heart. Diabetes 51, 2587–2595.
Yunianto, V.D., Hayashi, K., Kaneda, S., Ohtsuka, A., Tomita, Y., 1997. Effect of environmental temperature on muscle protein turnover and heat production in tube-fed broiler chickens. Br. J. Nutr. 77 (6), 897–909.

I. Principaux résultats

L'exposition chronique pendant 1 semaine à une température ambiante élevée (32°C *vs.* 22°C) affecte significativement les performances de croissance et le poids du *Pectoralis major*, comme attendu. La capacité de synthèse des protéines musculaires, i.e. capacité ribosomale (rapport ARN/protéines), est clairement réduite en conditions chaudes, mais le potentiel glycolytique (PG) n'est pas affecté.

Pour mieux comprendre l'altération de la croissance musculaire liée à une exposition à la chaleur, nous avons déterminé dans le muscle *Pectoralis major* l'expression de gènes reliés aux métabolismes protéique et énergétique. L'exposition chronique à la chaleur ne modifie l'expression que de quelques gènes liés aux métabolismes énergétique et protéique. La chaleur n'affecte pas l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du glucose tels que la GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3), la GS (Glycogen Synthase) et la GYS (Glycogen Synthase Phosphorylase), ainsi que les facteurs de transcription PPARα et PPARβ/δ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor), impliqués dans le métabolisme énergétique. Ni l'expression de l'E3 ubiquitine ligase MuRF1, ni celle de la Cathepsine B (système protéolytique lysosomal) et de la sous-unité C2 du protéasome 20S (système protéolytique ubiquitine protéasome-dépendant) ne sont modifiées.

Le traitement glucose et arginine augmente significativement la glycémie, et ce de façon plus prononcée au chaud qu'à thermoneutralité ($P<0,01$). A l'état nourri, une glycémie plus élevée est enregistrée à 32°C par rapport à 22°C chez les poulets ayant reçu le traitement glucose et arginine, alors que l'insulinémie ne diffère pas entre les 2 températures ambiantes. Ceci pourrait être cohérent avec une plus faible capacité de l'insuline à stimuler l'utilisation du glucose au chaud, ce qui doit encore être démontrer.

Nous avons également exploré la cascade de signalisation impliquant la protéine kinase B (PKB ou Akt), la protéine kinase p70S6 (S6K1) et la protéine ribosomale S6. Nous avons en particulier examiné sa potentielle activation suite à l'administration de glucose et arginine (voir détails dans le matériel et méthodes). Quelle que soit la température ambiante, les niveaux de phosphorylation d'Akt sur Ser473, de la protéine S6K1 sur Thr421/Ser424 et Thr389, et de la protéine ribosomale S6 sur Ser235/Ser236 sont augmentés par l'administration de glucose et arginine (*vs.* Témoin). L'activation de la protéine ribosomale S6 parait cependant être amoindrie au chaud comparé à la thermoneutralité.

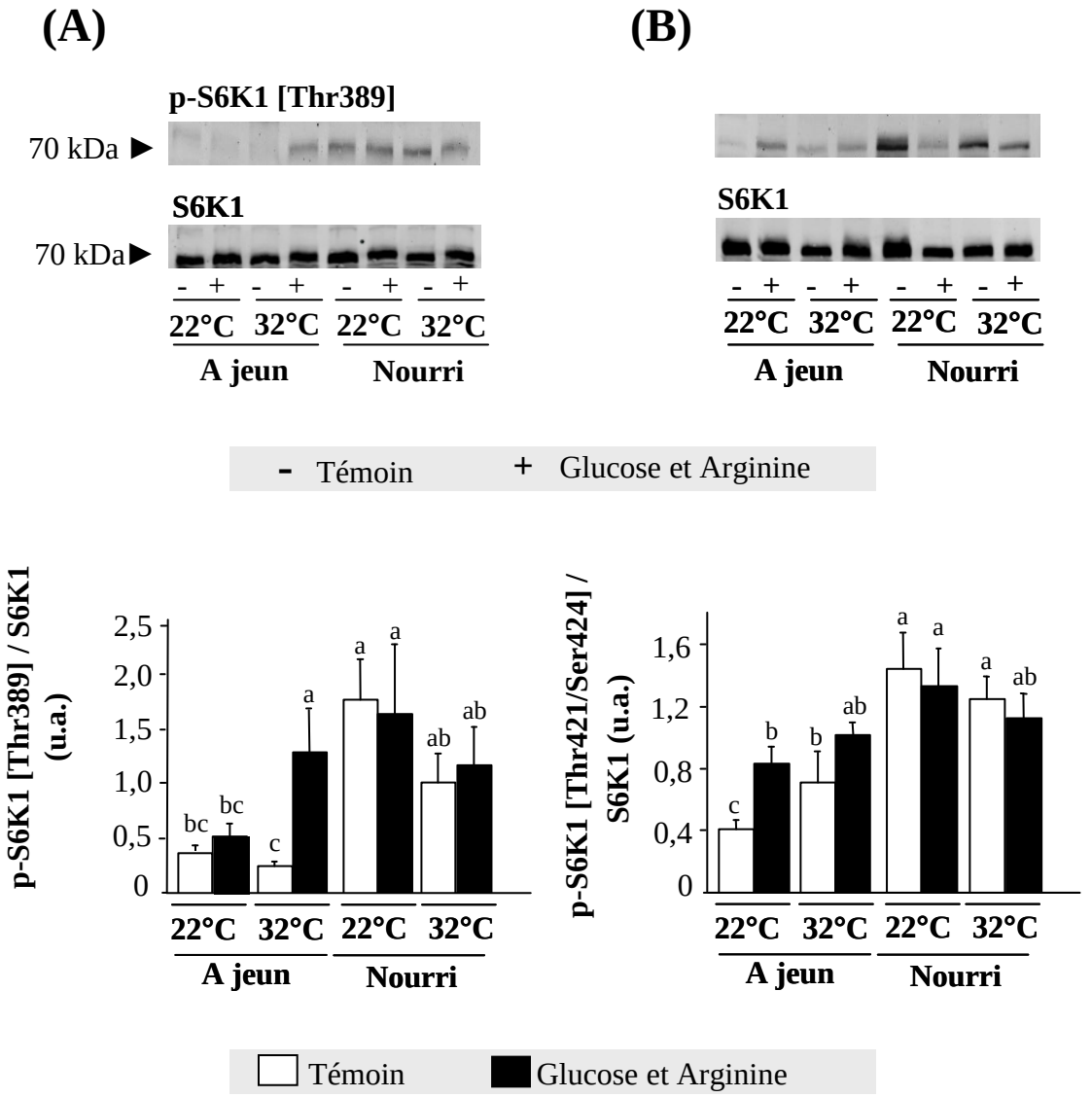


Figure 34. Niveaux de phosphorylation de S6K1 sur Thr389 et Thr421/Ser424 au niveau du muscle pectoral (*Pectoralis majo r*) de poulets à 5 semaines d'âge. Les poulets exposés pendant une semaine à 22° et 32°C sont soumis aux traitements suivants : Lot témoin ou intubation unique intra-jabot de glucose et arginine (dose : 2 g/kg de glucose et 0,21 g/kg d'arginine) et sont soit nourris soit à jeun. (A & B) blots représentatifs de phospho-S6K1 [Thr389], de phospho-S6K1 [Thr421/Ser424] et de S6K1 total. Les données sont exprimées comme moyennes ± SEM (n = 6) et analysées par ANOVA, avec comme effets principaux l'état nutritionnel (à jeun *vs.* nourri), la température (32°C *vs.* 22°C) et le traitement (Glucose et Arginine). Les lettres différentes indiquent une différence significative à $p<0,05$.

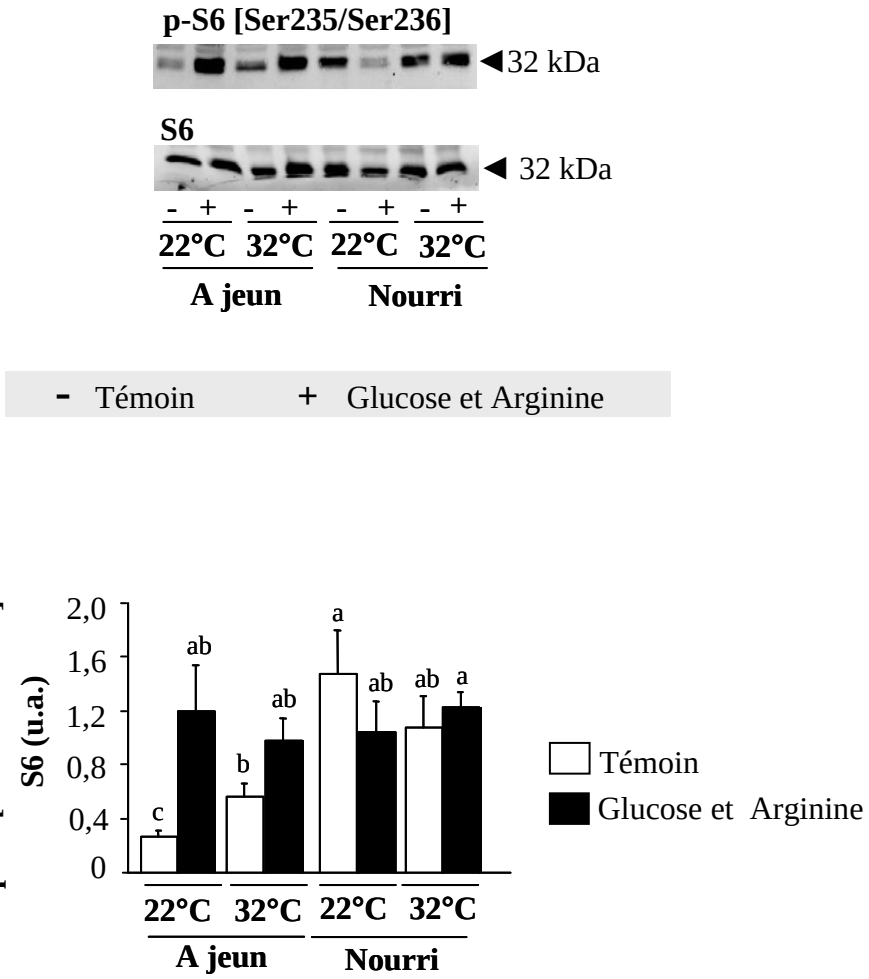


Figure 35. Niveaux de phosphorylation de la protéine ribosomale S6 au niveau du muscle pectoral (*Pectoralis major*) de poulets à 5 semaines d'âge. Les poulets exposés pendant une semaine à 22° et 32°C sont soumis aux traitements suivants : Lot témoin ou intubation unique intra-jabot de glucose et arginine (dose : 2 g/kg de glucose et 0,21 g/kg d'arginine) et sont soit nourris soit à jeun. Blots représentatifs de phospho-S6 Ser235/Ser236 et de S6 total. Les données sont exprimées comme moyennes ± SEM (n = 6) et analysées par ANOVA, avec comme effets principaux l'état nutritionnel (à jeun *vs.* nourri), la température (32°C *vs.* 22°C) et le traitement (Glucose et Arginine). Les lettres différentes indiquent une différence significative à $p<0,05$.

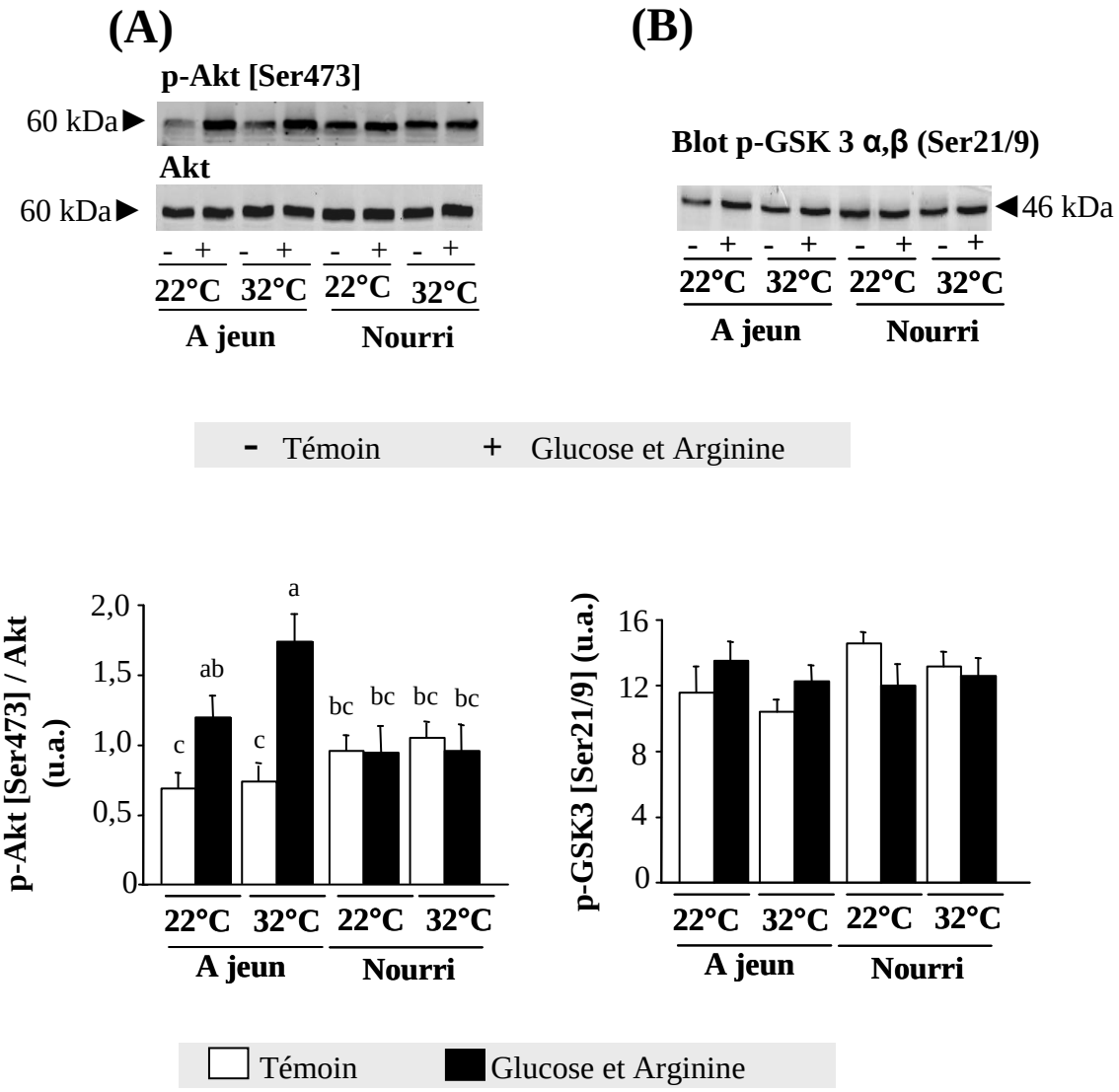


Figure 36. Niveaux de phosphorylation d'Akt et de GSK3 au niveau du muscle pectoral (*Pectoralis major*) de poulets à 5 semaines d'âge. Les poulets exposés pendant une semaine à 22° et 32°C sont soumis aux traitements suivants : Lot témoin ou intubation unique intra-jabot de glucoseet arginine (dose : 2 g/kg de glucose et 0,21 g/kg d'arginine) et sont soit nourris soit à jeun. (A & B) Blots représentatifs de phospho-Akt Ser473, d'Akt total et de phospho-GSK 3 α,β (Ser21/Ser9). Les données sont exprimées comme moyennes ± SEM (n = 6) et analysées par ANOVA, avec comme effets principaux l'état nutritionnel (à jeun *vs.* nourri), la température (32°C *vs.* 22°C) et le traitement (Glucose et Arginine). Les lettres différentes indiquent une différence significative à $p<0,05$.

II. Résultats complémentaires

Pour simplifier la présentation des résultats dans l'article publié dans *Comparative Biochemistry and Physiology* , nous n'avons pas montré les données de phosphorylation des acteurs de la voie Akt/S6K1/S6 chez les poulets nourris. Nous avons inclus ces résultats complémentaires dans les **figures 34, 35 & 36A**. Brièvement, à l'état nourri, l'exposition à la chaleur pendant une semaine n'affecte pas la phosphorylation de Akt, S6K1 et S6. Quelle que soit la température ambiante, les niveaux de phosphorylation de S6K1 sur Thr421/Ser424 et Thr389, et de la protéine ribosomale S6 sur Ser235/236 sont plus élevés à l'état nourri qu'à l'état à jeun, comme attendu. Signalons cependant que cette activation par l'alimentation (état nourri *vs.* à jeun) n'atteint pas le seuil de signification statistique dans le cas de la protéine ribosomale S6 chez les poulets exposés au chaud : augmentation de 90% à 32°C ($P>0,05$) alors que l'augmentation est de 450% à 22°C ($P<0,01$).

Dans la présente expérience, nous n'avons pas démontré que l'exposition d'une semaine à la chaleur pouvait modifier le stock de glycogène musculaire. Nous enregistrons pourtant une diminution légère du potentiel glycolytique PG (de l'ordre de 10%) au chaud chez les poulets nourris. Cette réduction n'atteint pas la signification statistique, probablement en raison du faible effectif (n = 6), mais elle serait cohérente avec des données non publiées précédemment obtenues (voir thèse de Aïn Baziz, 1996). Il serait ainsi possible d'envisager l'hypothèse d'une altération du transport et du stockage de glucose qui pourrait réduire l'apport en énergie au muscle et donc son stockage, mais aussi limiter la protéosynthèse au chaud. Nous ne pouvions pas étudier les altérations éventuelles existant au niveau des transporteurs de glucose insulino-sensibles, l'homologue de GLUT4 restant à caractériser chez le poulet. Nous avons en revanche examiné l'état d'activation de la kinase GSK3, connue pour son implication dans la régulation de la synthèse de glycogène et cible de Akt (Welsh et al., 1996). Cependant, nos résultats ne montrent pas d'effet de la chaleur sur la phosphorylation de la GSK3 (**Figure 36B**).

Dans nos conditions expérimentales, le poids du muscle pectoral est clairement diminué au chaud. Nous avons voulu savoir quel était l'impact de l'exposition d'une semaine à une température élevée sur l'expression de gènes importants au niveau structure musculaire et cellulaire, en ciblant notre attention sur deux isoformes de chaînes lourdes de myosine (MyHC) et sur la β-actine au niveau du muscle *Pectoralis major*.

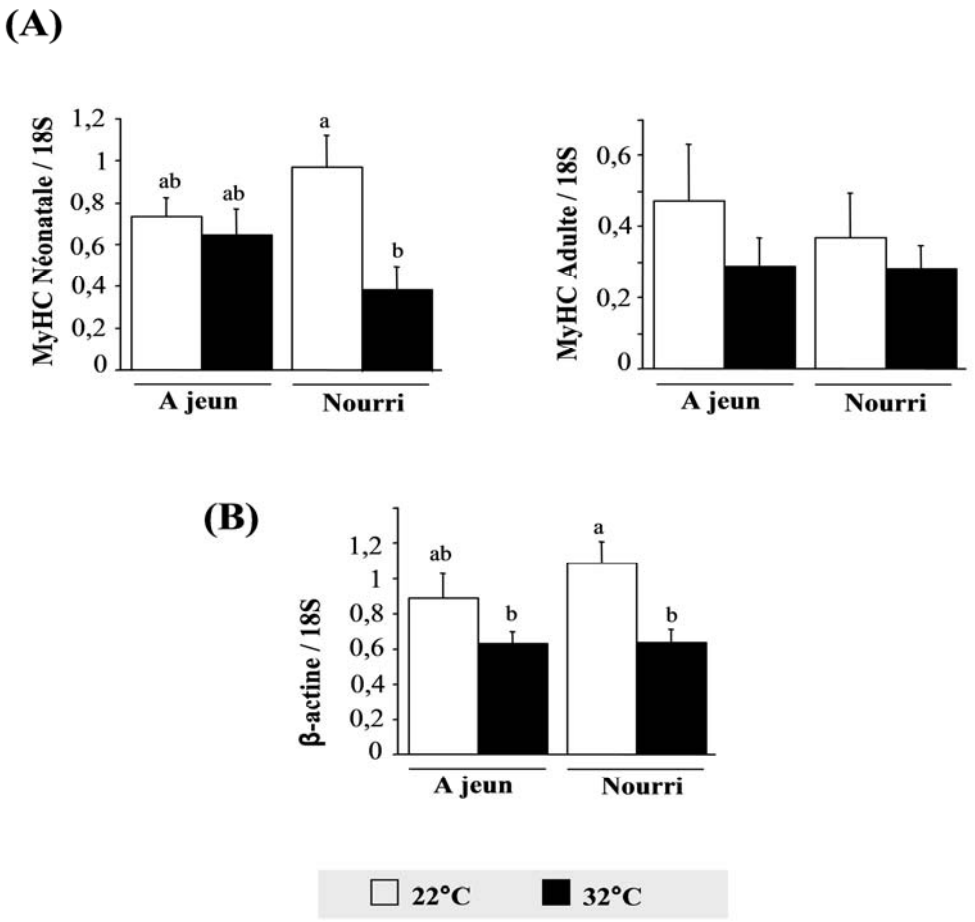


Figure 37. Niveaux d'expression de deux isoformes de chaînes lourdes de myosine (MyHC) (A) et de β-actine (B) au niveau du muscle pectoral (*Pectoralis major*) de poulets à 5 semaines d'âge. Les poulets exposés pendant une semaine à 22° et 32°C sont soumis aux traitements suivants : Lot témoin ou intubation unique intra-jabot de glucose et arginine (dose : 2 g/kg de glucose et 0,21 g/kg d'arginine) et sont soit nourris soit à jeun. Les données sont exprimées comme moyennes ± SEM (n = 12) et analysées par ANOVA, avec comme effets principaux l'état nutritionnel (à jeun *vs.* nourri) et la température (32°C *vs.* 22°C). Les lettres différentes indiquent une différence significative à $p<0,05$.

Les isoformes de MyHC choisies sont la MyHC néonatale et la MyHC adulte, sachant qu'une des particularités des muscles aviaires est leur capacité à exprimer des isoformes de MyHC néonatales ou même embryonnaires dans le muscle mature (Crow & Stockdale, 1986). L'expression de la MyHC adulte n'est pas significativement altérée en conditions chaudes même si les valeurs sont numériquement inférieures (**Figure 37A**). L'exposition à la chaleur diminue significativement l'expression des ARNm de la MyHC néonatale au moins chez les poulets nourris (**Figure 37A**). Nous avons aussi observé une diminution de l'expression des ARNm de la β-actine avec la chaleur, et ceci quel que soit l'état nutritionnel (**Figure 37B**).

III. Discussion

Suite à l'exposition à la chaleur, la baisse de la vitesse de croissance est supérieure à la diminution d'ingéré. Il en résulte une baisse de l'indice de consommation comme observé précédemment (Aïn Baziz et al., 1996 ; Geraert et al., 1996a ; Temim et al., 1999, 2000). En comparant des poulets élevés à 22 ou 32 °C et à ingéré égal, la chaleur exerce un effet direct sur la croissance en plus de son effet indirect via la baisse de la consommation (Geraert et al., 1996a). Le poids du *Pectoralis major* est également diminué au chaud (-20%) en cohérence avec les résultats précédents (Temim et al., 1999, 2000).

Des données préliminaires, non publiées, indiquent que la chaleur pourrait exercer un effet significatif sur des éléments d'une voie majeure de protéolyse, la voie ubiquitine protéasome-dépendante : sur-expression significative des messagers de l'ubiquitine à 32°C (augmentation d'un facteur 3, $P<0,01$) et forte augmentation de la quantité de la sous-unité C8 du protéasome (+70%, $P<0,05$) (mesures réalisées à jeun ; voir thèse de Temim, 2000). Dans nos conditions expérimentales, une interaction entre les effets température et état nutritionnel a été observée pour l'expression de l'ubiquitine : les valeurs à jeun sont numériquement supérieures à 32°C comparé à 22°C, sans atteindre cependant la signification statistique. Nous ne montrons pas de changement dans l'expression protéique de différentes sous-unités du protéasome, en utilisant des anticorps dirigés contre la sous-unité C8 et les sous-unités C2, C3, C8, C9, Iota et Zeta. D'autres messagers clés de la protéolyse sont en revanche significativement modifiés par la chaleur, mais parfois dans des sens différents. Par exemple, quel que soit l'état nutritionnel, le niveau d'expression des ARNm codant la m-calpaïne (système calcium-dépendant) est réduit et celui codant l'E3 ubiquitine ligase atrogin-1 est augmenté au chaud. Face à ces résultats contradictoires il semble difficile de conclure, d'autant plus que nous ignorons si la variation de l'expression de ces éléments reflète une

réelle modification de la protéolyse induite par la chaleur. Signalons qu'une démonstration claire de l'effet de la température sur la protéolyse est difficile à faire en l'absence de technique de mesure directe et fiable de la protéolyse *in vivo*.

Au cours de précédents travaux réalisés au laboratoire (voir thèse de Temim, 2000), plusieurs approches complémentaires avaient été utilisées pour estimer au mieux ce paramètre. La détermination de l'excrétion de 3-méthylhistidine (index de la dégradation des protéines contractiles) suggère que la protéolyse globale du poulet est peu affectée, mais cette mesure pourrait masquer des effets différentiels de la chaleur sur les différents compartiments et tissus de l'organisme. La protéolyse a donc été aussi examinée au niveau de tissus individuels (trois types de muscle squelettique), au travers de la différence entre la protéosynthèse (mesurée par incorporation d'un acide aminé radioactif) et le dépôt de protéines (estimation suite à l'abattage d'animaux à 2 âges différents) pour chacun des muscles considérés. La chaleur semblerait réduire légèrement la protéolyse musculaire mais pas dans tous les muscles étudiés. Quoi qu'il en soit, la protéolyse apparait moins affectée que ne l'est la protéosynthèse.

Les résultats de notre étude font apparaître un effet clair de la chaleur sur la quantité des ARN et la capacité ribosomale (Cs) du muscle, quel que soit l'état nutritionnel (à jeun ou nourri). Dans les conditions testées par Temim et al. (1999), une baisse du Cs a également été observée. Ainsi, cette baisse du Cs pourrait refléter une altération de la capacité de synthèse des protéines dans le muscle au chaud. La synthèse protéique pourrait aussi être affectée au niveau traductionnel. Nous avons donc étudié l'impact de la chaleur sur la voie de signalisation S6K1/S6 impliquée dans la traduction des ARNm en protéines et qui est activée par les facteurs anaboliques chez les mammifères comme chez les oiseaux (Bigot et al., 2003 ; Tesseraud et al., 2006). L'exposition d'une semaine à la chaleur ne modifie pas considérablement l'activation de cette voie de signalisation. Néanmoins, le traitement glucose et arginine augmente la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 à 22°C mais pas à 32°C. De même, chez le groupe témoin, une activation significative de la protéine S6 en fonction de l'état nutritionnel (nourri *vs.* à jeun) a été observé à thermoneutralité mais pas au chaud. Ces résultats suggèrent une altération de la phase d'initiation de la synthèse protéique, ce qui serait concordant avec la plus faible efficacité traductionnelle (mesure des quantités de protéines synthétisées par jour et par unité d'ARN) trouvée dans le muscle pectoral des poulets exposés à la chaleur (Temim et al., 2000). L'ensemble de ces résultats démontre que l'exposition d'une semaine à la chaleur affecte la machinerie de synthèse et/ou l'initiation de

la traduction, en accord avec les plus faibles vitesses de synthèse protéique mesurées dans le muscle des poulets élevés au chaud (Temim et al., 2000).

Au niveau du métabolisme énergétique, le résultat le plus marquant est la forte réduction de l'expression musculaire du facteur de transcription PPARγ coactivator-1α (PGC-1α) au chaud. Ceci est en accord avec ce qui a été obtenu suite à un coup de chaleur aigu (Bedrani et al., 2009) et le réchauffement pendant 24h suite à l'exposition au froid pendant 24h (Ijiri et al., 2009). Cette sous-expression de PGC-1α à 32°C est cohérente avec un engraissement accru (Aïn Baziz et al., 1996) et éventuellement un métabolisme oxydatif moins intense avec une réduction de production de la chaleur (Tesseraud & Temim, 1999 ; Collin et al., 2001). PGC-1α coordonne aussi la signalisation de l'insuline et joue un rôle dans la physiopathologie de l'insulino-résistance.

Existe-t-il réellement une résistance à l'insuline chez l'animal exposé au chaud ? Il est difficile de répondre à cette question sur la base des résultats que nous avons obtenus ou plus largement lorsque l'on considère que les poulets présentent une régulation insulinique particulière comparée aux mammifères. Malgré une insuline endogène hyperactive circulant à des concentrations « normales », le poulet mime d'une certaine manière un état de diabète de type 2, avec une glycémie élevée (2 g/L) et une résistance relative à l'insuline exogène d'origine mammalienne (Simon, 1989). Il y a également des particularités concernant les étapes précoces de la signalisation de l'insuline au niveau musculaire (pour revues Tesseraud et al., 2007a ; Dupont et al., 2009). En effet, la voie de signalisation impliquant le substrat du récepteur de l'insuline IRS-1 (Insulin Receptor Substrate 1) et la PI3K (Phosphoinositol 3-Kinase) n'est stimulée par aucune des conditions expérimentales connues pour modifier l'insulinémie voire pour modifier la sensibilité à l'insuline, i.e. réalimentation *vs*. jeûne (Dupont et al., 1998b), administration d'insuline (Dupont et al., 2004), traitement avec un anticorps anti-insuline (Dupont et al., 2008), traitement chronique à la corticostérone (Dupont et al., 1998b), sélection génétique sur l'engraissement (Dupont et al., 1998b). A l'inverse, l'injection d'insuline comme la réalimentation augmentent la phosphorylation et/ou l'activité de kinases comme Akt et S6K1 (Bigot et al., 2003 ; Duchêne et al., 2008), démontrant que le muscle de poulet n'est pas complètement réfractaire à l'insuline.

Les changements induits par la chaleur des métabolismes protéique et énergétique pourraient aussi être reliés au statut des hormones thyroïdiennes et des glucocorticoïdes. Chez les mammifères et les oiseaux, l'exposition à des températures élevées résulte en une diminution des concentrations plasmatiques en triiodothyronine T3 (Samuels et al., 2000 ;

Collin et al., 2002 ; Geraert et al., 1996b) et en une augmentation des concentrations plasmatiques en cortisol ou corticostérone (McMorris et al., 2006 ; Yunianto et al. 1997 ; Geraert et al., 1996b). De telles modifications hormonales pourraient contribuer à diminuer la synthèse protéique dans le muscle (Savary et al., 1998 ; Samuels et al., 2000). De manière intéressante, il a été montré que la corticostérone inhibe le transport de glucose stimulé par l'insuline dans des muscles isolés de poulet (Zhao et al., 2009). Il est donc possible que, en ambiance chaude, les concentrations plus fortes de corticostérone soient associées à des changements d'utilisation du glucose par les muscles. Ces données sont compatibles avec les augmentations de glycémie induites par le traitement glucose et arginine bien plus prononcées à 32°C qu'à 22°C dans la présente étude. Comme la glycémie a été mesurée 30 minutes après l'intubation de la solution de glucose et arginine, il serait cependant intéressant de réaliser une étude cinétique pour suivre l'évolution de la glycémie suite à l'administration de glucose et arginine, et donc étayer davantage nos résultats.

Nos données ne permettent pas de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse d'un défaut d'apport énergétique au niveau cellulaire sous forme de glucose au muscle par l'altération du transporteur de glucose insulino-dépendant Glut 4 (non encore caractérisé) ou de l'une des voies de signalisation qui le contrôle (PI3K, Akt…). L'objectif initial de cette étude était rappelons-le de tester cette hypothèse en apportant au poulet en période de finition du glucose et également de l'arginine qui stimule *in vitro* la sécrétion d'insuline (Rideau et al., 1986). Nous avons justifié ces choix dans la partie Matériel et Méthodes. Il faut par ailleurs souligner que le besoin en arginine pourrait être accru et sa disponibilité altérée en ambiance chaude (Brake & Balnave, 1995), ce qui justifierait d'adapter son apport à 32°C. Ceci entre dans le cadre des différentes stratégies nutritionnelles envisagées et testées, pour l'instant sans franc succès, pour favoriser la croissance des poulets en ambiance chaude. Par exemple, une supplémentation lipidique n'a que peu d'effet. L'augmentation de l'apport alimentaire en protéines, si elle améliore légèrement les performances des poulets, ne permet pas de compenser réellement les effets négatifs de la chaleur (pour revue Tesseraud & Temin, 1999).

Dans le laboratoire, la stratégie « adaptation nutritionnelle » a été examinée de façon plus générale en utilisant différentes modalités d'apport en glucose et arginine pendant la période expérimentale (entre 28 et 35 jours d'âge) : 1) par voie alimentaire avec une supplémentation du régime de base à l'aide de glucose (10% du régime) et d'arginine (0,2% du régime) ; 2) par administration quotidienne (1 fois par jour à 9h) dans le jabot d'une solution de glucose 30% plus d'arginine 6,25% (correspondant à environ 2 g/kg de glucose et

0,21 g/kg d’arginine) (données non publiées). Dans ces conditions expérimentales, à court comme à long-terme, l’apport de solutions de glucose et arginine ne présente pas d’effet positif sur les paramètres testés : consommation alimentaire horaire pendant les cinq heures suivant chaque injection ou intubation, consommation quotidienne, performances de croissance, développement musculaire. Si des effets positifs des apports en glucose et arginine avaient été mesurés, cette approche pouvait conduire vers des additifs nutritionnels nouveaux. L’idée est alors d’apporter au niveau métabolique des combinaisons de nutriments simples dans cette situation critique pour l’animal que constitue l’exposition chronique à la chaleur. Il est en revanche important de signaler que les performances les plus intéressantes qui ont été observées, sont obtenues lorsque les poulets ont été nourris avec le régime supplémenté en glucose et arginine. Nous en ignorons actuellement les raisons.

Partie 2. Les variations journalières des apports en protéines et énergie régulent le métabolisme protéique dans le muscle de poulet (Publication n°2)

Résumé :

Il a été précédemment montré que les E3 ubiquitine ligases MuRF1 et atrogin-1, qui médient l'ubiquitinylation des protéines et donc la protéolyse musculaire, sont régulées par l'alternance cyclique de régimes variant par la teneur en lysine. Ici, dans cette étude, nous avons approfondi les connaissances sur l'adaptation métabolique aux variations alimentaires en explorant l'équilibre protéosynthèse/protéolyse musculaire dans un modèle plus complexe. Nous avons pratiqué trois programmes d'alimentation séquentielle (AS) sur des poulets à partir de 10 jours d'âge. L'AS consistait en une alternance de régimes variant en protéines (P+ : 230 g/kg suivi de P- : 150 g/kg), en énergie (E- : 2800 kcal/kg suivi de E+ : 3200 kcal/kg), ou les deux à la fois (E-P+ suivi de E+P-), en comparaison avec un régime témoin équilibré (CP = 190 g/kg et EM = 3000 kcal/kg). Les performances de croissance des animaux soumis à l'AS sont similaires dans tous les traitements. Les niveaux des ARNm de MuRF1 et atrogin-1 sont régulés par l'alternance des régimes en protéines (sur-expression avec le régime P- *vs.* P+) et en énergie (sous-expression avec le régime E+ *vs.* E-). Avec les régimes mixtes, l'expression d'atrogin-1 est régulée (augmentation avec E+P- *vs.* E-P+), mais pas celle de MuRF1. Ces régulations pourraient impliquer la kinase mammalian Target of Rapamycin (mTOR), qui est davantage phosphorylée avec le régime P+ *vs.* P-. Les cibles de mTOR, i.e. eukaryotic initiation factor 4E-Binding Protein (4E-BP1), la p70S6 kinase (S6K1) et la protéine ribosomale S6, connues pour contrôler la synthèse protéique, sont activées très fortement par les régimes riches en protéines (P+ *vs.* P-) et de façon plus modeste par le régime E-P+ comparé à E+P-. Les mécanismes coordonnant l'équilibre protéosynthèse/protéolyse restent à caractériser.

Regulators of protein metabolism are affected by cyclical treatments with diets varying in protein and energy content

Sourour Boussaid-Om Ezzine[a], Sonia Métayer-Coustard[a], Anne Collin[a], Nicole Rideau[a], Christine Leterrier[d], Isabelle Bouvarel[b], Iban Seiliez[c], and Sophie Tesseraud[a,*]

[a] *INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France*
[b] *Institut Technique de l'Aviculture, Centre INRA de Tours, F-37380 Nouzilly, France*
[c] *INRA, UR1067 Nutrition, Métabolisme, Aquaculture, F-64310 St Pée-sur-Nivelle, France*
[d] *INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France*

*** Corresponding author :** Dr. S. Tesseraud, Ph.D., INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France. Tel.: +33 247 42 78 32, Fax: +33 247 42 77 78, E-mail address: Sophie.Tesseraud@tours.inra.fr

Running title: Effects of sequential feeding on protein metabolism

Keywords: Sequential feeding; Protein; Energy; Metabolism; Chicken muscle

Abbreviations used: atrogin-1 or MAFbx, muscle atrophy F box; C2, proteasome C2 subunit; Cs, ribosomal capacity; 4E-BP1, eukaryotic initiation factor 4E binding protein; FoxO, forkhead box-O transcription factor; mTOR, mammalian target of rapamycin; MuRF1, muscle ring finger-1; S6K1, 70 kDA ribosomal protein S6 kinase; S6, ribosomal protein S6.

Journal title: The Journal of Nutritional Biochemistry

Reference: JNB6799

ABSTRACT

There is evidence that the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and atrogin-1, that mediate the ubiquitination of proteins and thereby proteolysis, are regulated by cyclical nutritional treatments varying in lysine content. In order to explore further the regulatory mechanisms involved in metabolic adaptation to dietary changes, we investigated the effects of daily variations in energy [2800 (E-) followed by 3200 kcal/kg (E+)], protein [230 (P+) followed by 150g/kg (P-)] or both [E-P+ followed by E+P-] on muscle protein metabolism in 2-week-old male broiler chickens. Growth performance was similar for all treatments. Expression of atrogin-1 and MuRF1 was changed by alternation of diets varying in protein (higher expression with P- *vs* P+) and energy content (higher expression with E- *vs* E+). The expression of atrogin-1 was regulated with mixed diets (increase in E+P- *vs* E-P+) but not that of MuRF1. Such regulation may involve the mammalian Target of Rapamycin (mTOR), which was more phosphorylated with P+ than with P-. Eukaryotic initiation factor 4E binding protein (4EBP1), p70S6 kinase (S6K1) and ribosomal protein S6, that are mTOR targets known to control protein synthesis, were highly activated by increased protein content (P+ *vs* P-). The mechanisms coordinating the protein synthesis/proteolysis balance remain to be characterized.

Keywords: Sequential feeding; Protein; Energy; Metabolism; Chicken muscle

Article accepted for publication: 22 Sep 2011

Proofs available: Uncorrected proof, correspondant à la version présentée dans cette thèse

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

Journal of Nutritional Biochemistry xx (2011) xxx–xxx

Journal of Nutritional Biochemistry

Regulators of protein metabolism are affected by cyclical nutritional treatments with diets varying in protein and energy content☆

Sourour Boussaid-Om Ezzine[a], Sonia Métayer-Coustard[a], Anne Collin[a], Nicole Rideau[a], Christine Leterrier[b], Isabelle Bouvarel[c], Iban Seiliez[d], Sophie Tesseraud[a,*]

[a]INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France
[b]INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France
[c]Institut Technique de l'Aviculture, Centre INRA de Tours, F-37380 Nouzilly, France
[d]INRA, UR1067 Nutrition, Métabolisme, Aquaculture, F-64310 St. Pée-sur-Nivelle, France

Received 3 May 2011; received in revised form 12 September 2011; accepted 22 September 2011

Abstract

There is evidence that the E3 ubiquitin ligases muscle ring finger-1 (MuRF1) and atrogin-1, which mediate the ubiquitination of certain proteins and thereby their proteolysis, are regulated by cyclical nutritional treatments varying in lysine content. In order to explore further the regulatory mechanisms involved in metabolic adaptation to dietary changes, we investigated the effects of daily variations in energy [2800 (E−) followed by 3200 kcal/kg (E+)], protein [230 (P+) followed by 150g/kg (P−)] or both [E−P+ followed by E+P−] on muscle protein metabolism in 2-week-old male broiler chickens. Growth performance was similar for all treatments. Expression of atrogin-1 and MuRF1 was changed by alternation of diets varying in protein (higher expression with P− vs. P+) and energy content (higher expression with E− vs. E+). The expression of atrogin-1 was regulated with mixed diets (increase in E+P− vs. E−P+) but not that of MuRF1. Such regulation may involve the mammalian target of rapamycin (mTOR), which was more phosphorylated with P+ than with P−. Eukaryotic initiation factor 4E binding protein, p70S6 kinase and ribosomal protein S6, which are mTOR targets known to control protein synthesis, were highly activated by increased protein content (P+ vs. P−). The mechanisms coordinating the protein synthesis/proteolysis balance remain to be characterized.
© 2011 Published by Elsevier Inc.

Keywords: Sequential feeding; Protein; Energy; Metabolism; Chicken muscle

1. Introduction

The nutritional regulation of metabolism involves feeding level, the nature of nutrients and the rate of nutrient delivery [1–4]. There is evidence that the timing of protein feeding regulates protein metabolism. For instance, a pulse protein feeding pattern (i.e., consuming the greater part of daily proteins in a single meal compared to distribution of daily proteins in a number of meals) results in a higher nitrogen balance in the elderly and in older animals because of lower leucine oxidation and whole-body protein degradation during the postabsorptive state and higher stimulation of protein synthesis in the whole body, liver and muscle during the fed state [5,6]. Similarly, the kinetics of digestion of proteins and the resulting amino acid absorption from the gut have a major effect on protein anabolism. Indeed, studies in humans indicate that slowly absorbed proteins (e.g., casein) may promote overall protein deposition by reducing protein degradation [7], a result obtained whether slowly absorbed proteins are offered without or simultaneously with nonprotein energy. However, when energy is also provided, quickly absorbed proteins can also be efficient [7–9], demonstrating the importance of taking into account both protein and energy supply when exploring time-dependent regulation of protein metabolism.

Recent findings obtained in chickens suggest temporal regulation of muscle proteolysis according to dietary treatment and a high metabolic capacity to compensate for cyclical changes in amino acid supply [10]. More precisely, genes related to proteolysis, in particular, the E3 ubiquitin ligases muscle atrophy F box (MAFbx or atrogin-1) and muscle ring finger-1 (MuRF1) are overexpressed in the skeletal muscle of chickens transiently receiving lower lysine intake in sequential feeding programs. These two important genes (also called atrogenes) control the polyubiquitination and thus the degradation of certain proteins, including myofibrillar proteins [11–13]. They are regulated by hormones such as insulin and amino acids via mechanisms involving the forkhead box-O transcription factor (FoxO) and the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathways [14–17]. mTOR is also involved in the control of protein synthesis

Abbreviations: atrogin-1 or MAFbx, muscle atrophy F box; C2, proteasome C2 subunit; Cs, ribosomal capacity; 4E-BP1, eukaryotic initiation factor 4E binding protein; FoxO, forkhead box-O transcription factor; mTOR, mammalian target of rapamycin; MuRF1, muscle ring finger-1; S6K1, 70 kDA ribosomal protein S6 kinase; S6, ribosomal protein S6.

☆ Supported by research grants from ACTA/MAP/MESR and INRA.

* Corresponding author. Tel.: +33 247 42 78 32; fax: +33 247 42 77 78.
E-mail address: Sophie.Tesseraud@tours.inra.fr (S. Tesseraud).

0955-2863/$ - see front matter © 2011 Published by Elsevier Inc.
doi:10.1016/j.jnutbio.2011.09.009

UNCORRECTED PROOF

ARTICLE IN PRESS

through its downstream targets p70 S6 kinase (S6K1) and the translational repressor eukaryotic initiation factor 4E binding protein (4EBP1) (see Kimball and Jefferson [18] and Tesseraud et al. [19] for reviews). 4EBP1 corresponds to the binding protein of initiation factor eIF4E and acts as a competitive inhibitor of eIF4F complex formation, subsequently limiting the formation of the 48S preinitiation complex. S6K1 is a serine/threonine kinase that phosphorylates several proteins, including the ribosomal protein S6, also affecting the initiation stage of mRNA translation. To our knowledge, little has been established regarding the mechanisms controlling the protein synthesis/proteolysis balance in response to cyclical changes in dietary supply. The aim of the present study was therefore to explore the potential changes in protein metabolism and signaling in chicken submitted to sequential feeding with diets varying in protein and/or energy content. The experiment was designed to distinguish the respective effects of protein and energy content.

2. Methods and materials

2.1. Broiler chickens and distribution of feeds

Seven hundred twenty one-day-old male broiler chicks (Ross PM3) were wing-banded and randomly distributed into 36 pens (1.6×1.75 m, 20 chicks per pen) in a conventional environmentally controlled poultry shed at the Poultry Research Centre in Nouzilly, France. The floor was covered with wood shavings. Lighting was reduced from 24 light (L):0 dark (D) to 14L:10D daily after the age of 2 days and was then increased to 16L:8D daily at the age of 7 days. Environmental temperature was progressively reduced from 32°C to 23°C. Feed was provided in linear feeders. All the chickens received the same starter diet (2900 kcal/kg ME, 21% CP). From the age of 10 days, chickens were given either control (C) or sequential programs *ad libitum*.

Seven diets (Table 1) were used for the sequential programs, as previously proposed by Bouvarel et al. [20], with the applied goal of developing new nutritional strategies or modifying constraints for diet formulation. The control diet was complete feed C (3000 kcal/kg ME, 19.5% CP). Two diets were isoenergetic with differences in protein and essential amino acid content: the high-protein diet (P+, 23.4% CP) and the low-protein diet (P−, 15.6% CP). Two diets were isoproteic with differences in ME content: the low-energy diet (E−, 2800 kcal/kg ME) and the high-energy diet (E+, 3200 kcal/kg ME). Two diets had differences in both protein and energy content: the high-protein and low-energy diet (E−P+) and the low-protein and high-energy diet (E+P−). Three sequential feeding treatments were used: (1) alternation of diets varying in crude protein (S_P, P+ followed by P−), (2) alternation of diets varying in energy (S_E, E− followed by E+) and (3) alternation of diets varying in protein and energy content (S_{EP}, E−P+ followed by E+P−). Each "new" diet was introduced after the dark phase, during which chickens were not eating.

Table 1
Composition (%) and characteristics of experimental feeds

	C	S_P		S_E		S_{EP}	
Ingredients		P+	P−	E−	E+	E−P+	E+P−
Corn	20.12	31.00	30.54	20.58	45.23	12.35	50.44
Wheat	50.00	24.78	50.00	50.00	20.96	50.00	27.61
Soybean meal	18.39	31.48	12.05	24.78	17.87	27.06	9.00
Corn gluten	4.73	5.00	1.48	0.18	7.00	6.00	5.00
Rapeseed oil	2.91	4.00	2.14	0.80	5.00	0.77	4.00
Dicalcium phosphate	1.34	1.46	1.37	1.32	1.54	1.29	1.54
Calcium carbonate	1.24	1.07	1.27	1.21	1.12	1.21	1.19
Salt	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
L-Lysine HCl	0.37	0.27	0.31	0.21	0.39	0.36	0.39
DL-Methionine	0.14	0.21	0.09	0.17	0.11	0.21	0.05
Tryptophan	0.000	0.000	0.000	0.000	0.023	0.000	0.028
Premix*	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
Calculated content							
ME (kcal/kg)	3000	3000	3000	2800	3200	2800	3200
CP (%, analyzed)	19.50	23.40	15.60	19.60	19.40	23.40	15.70
Fat (%, analyzed)	5.1	6.3	4.5	2.9	7.6	3.0	6.8
ME:CP (kcal/g CP)	15.4	12.8	19.2	14.3	16.5	12.0	20.4
Lysine (%)	1.07	1.29	0.84	1.07	1.07	1.29	0.84
TSAA (%)	0.81	0.99	0.64	0.81	0.81	0.99	0.64
Threonine (%)	0.67	0.84	0.53	0.68	0.68	0.81	0.53
Tryptophan (%)	0.20	0.25	0.16	0.22	0.20	0.25	0.16
Calcium (%)	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95
Available phosphorus (%)	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37

* Composition as previously described by Bouvarel et al. [16].

Sequential feeding was carried out over 48-h cycles. Experiments on sequential feeding using 48-h cycles previously showed that this technique had no negative effect on performance if the consumption of the sequential feeds provided an energy and amino acid intake similar to the control diet [20,21]. In the present study, on days 14 and 15 (cycle 3), six chickens per diet from different pens were used for measurements, corresponding to chickens receiving the complete diet (C), the P+ diet (S_P sequential program), the E− diet (S_E sequential program) and the E−P+ diet (S_{EP} sequential program) on day 14 and to chickens receiving the complete diet (C), the P− diet (S_P sequential program), the E+ diet (S_E sequential program) and the E+P− diet (S_{EP} sequential program) on day 15. These chickens were weighed at 9 days of age and at the end of the experiment (on days 14–15). Throughout this period, chickens from all feeding programs (i.e., all sequential programs and control diet) showed similar growth rates (40.0 ± 1.4 g/d). Feed intake per pen calculated for the remaining birds was not significantly different between feeding programs (56.8 ± 1.3 g/d per chicken during the three cycles corresponding to 10–15 days of age).

Approximately 5 h after the changes of diet that took place at 9:00 a.m. each day, chickens used for measurements were sacrificed by decapitation after blood sampling. The pectoralis major muscles were removed and quickly frozen. Frozen tissues were ground in liquid nitrogen and stored at −80°C until analysis. All experiments were carried out with due regard to legislation governing the ethical treatment of animals, and investigators were certified by the French government to carry out animal experiments.

2.2. Plasma parameters and muscle characteristics

Plasma αNH2 NP N concentrations (α-amino-nonprotein nitrogen, an estimate of total free amino acids) were measured after extraction with 10% (v/v) sulfosalicylic acid using 2% ninhydrin reagent (Sigma Chemicals) and L-serine as standard [22]. Plasma insulin levels were determined by radioimmunoassay with a guinea pig anti-porcine insulin antibody (Ab 27-6, generously provided by Dr. G. Rosselin, Saint-Antoine Hospital, Paris, France) using chicken insulin as the standard [23]. All samples were run in the same assay in order to avoid interassay variations.

For measurement of muscle protein, RNA and ribosomal capacity, frozen powdered muscle samples were homogenized in 2% HClO4 according to the method of Schmidt-Thannhauser as modified by Munro and Fleck [24]. Protein content was measured according to Smith et al. [25] by colorimetric reaction with bicinchoninic acid. Total RNA was measured on the basis of the ultraviolet absorbance at 260 nm, with a correction for peptide material based on the ultraviolet absorbance at 232 nm. Ribosomal capacity, i.e., the capacity for protein synthesis (an index related to the number of ribosomes and thus protein synthesis machinery), was calculated as the ratio of RNA to protein [26].

2.3. RNA isolation and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted using RNA Now (Biogentec, Seabrook, TX, USA) from 100-mg muscle samples according to the manufacturer's recommendations. After RNase-Free DNase treatment, RNA was reverse-transcribed using Super Script II RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in the presence of Random Primers (Promega, Charbonnieres-les-Bains, France). Quantitative PCRs were performed in duplicate using the Abi Prism 7000 apparatus (Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA) as previously described [27]. The primers chosen to amplify parts of MuRF1, atrogin-1, m-calpain, cathepsin B, 20S proteasome C2 subunit and ubiquitin had previously been used in our laboratory [10]. Gene expression levels were estimated on the basis of PCR efficiency and threshold cycle deviation of an unknown sample versus a control, as previously described [27]. 18S ribosomal RNA was chosen as the reference gene.

2.4. Peptidase activity of the proteasome

Frozen powdered muscle samples were homogenized in ice-cold buffer (pH 7.5) containing 50 mmol/L Tris, 250 mmol/L sucrose, 10 mmol/L ATP, 5 mmol/L MgCl2, 1 mmol/L DTT and protease inhibitors. As previously described [28], the proteasomes were isolated by three sequential centrifugations, and the final pellet was resuspended in buffer containing 50 mmol/L Tris (pH 7.5), 5 mmol/L MgCl2 and 20% glycerol. Peptidase activity of the proteasome was determined from 15 μg of proteins of the proteasome preparation by measuring the hydrolysis of the fluorogenic substrates succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (LLVY) and Boc-Leu-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (LRR) (Sigma, Saint Louis, MO, USA). These substrates are preferentially hydrolyzed by the chymotrypsin-like and the trypsin-like activity of the proteasome, respectively. Peptidase activity was determined by measuring the accumulation of the fluorogenic reagent methylcoumarylamide (AMC) using an LS50B luminescence spectrometer (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) (excitation and emission wavelengths of 360 nm and 430 nm, respectively).

2.5. Western blotting

To analyze the signaling pathways potentially involved in regulation of protein metabolism, muscle lysates were prepared as previously described [29]. Muscle lysates (60 μg of protein) were subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel

UNCORRECTED PROOF

Table 2
Feed intake in chickens receiving either control (C) or sequential programs at 14 and 15 days of age *

Sequential treatment†	C		S_P		S_E		S_{EP}		S.E.M.	P <
Diet	C	C	P+	P−	E−	E+	E−P+	E+P−		
Day of experiment‡	d14	d15	d14	d15	d14	d15	d14	d15		
Average feed intake, g/d	65.4		64.0		63.4		62.8		1.9	NS
Daily feed intake, g/d§	64.1[ab]	66.7[a]	59.9[bc]	68.2[a]	57.3[c]	69.4[a]	55.3[c]	70.2[a]	1.9	<.05

* Feed intake was calculated per pen and expressed per chicken. Results are expressed as means ± S.E.M. (n=9). They were analyzed using one-way ANOVA.

† S_P, sequential feeding with alternation of diets varying in crude protein (P+ followed by P−); S_E, sequential feeding with alternation of diets varying in energy (E− followed by E+); S_{EP}, sequential feeding with alternation of diets varying in protein and energy content (E−P+ followed by E+P−).

‡ Day of experiment: d14 (first day of the cycle 3) and d15 (second day of the cycle 3).

§ Daily feed intake: consumption of each diet over the 24 h of distribution.

electrophoresis and Western blotting using the appropriate antibodies: p-FoxO1 [T24] and p-FoxO3a [T32], p-mTOR [S2448], p-S6K1 [T389], p-S6K1 [T421/S424], p-S6 [S235/S236] and p-4EBP1 [S65] (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA); S6K1 and mTOR/FRAP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and vinculin (Sigma Chemical Company). After washing, membranes were incubated with an Alexa Fluor secondary antibody (Molecular Probes, Interchim, Montluçon, France). Bands were visualized by Infrared Fluorescence by the Odyssey Imaging System (LI-COR Inc. Biotechnology, Lincoln, NE, USA) and quantified by Odyssey infrared imaging system software (Application software, version 1.2).

2.6. Statistical analysis

Values are presented as means ± S.E.M. Data were processed using the Statview Software program, version 5 (SAS Institute, Cary, NC, USA). The homogeneity of variance between groups was tested by Bartlett's test. In the case of heterogeneity of variance (for peptidase activity of the proteasome), the nonparametric Kruskal–Wallis test was used to test differences between groups, and means were compared using the Mann–Whitney test. For all other parameters, data were subjected to analysis of variance (ANOVA) to detect significant intergroup differences. The means were compared by Fisher's least significant difference test in the case of a significant effect. P<.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Animal characteristics

Within the sequential feeding cycle 3 (i.e., on days 14–15), the average feed intake calculated per pen and expressed per chicken did not show any significant differences between feeding programs (63.9 ± 1.8 g/d) (Table 2). In the sequential feeding treatments S_P, S_E and S_{EP}, daily feed intake was higher on day 15 than on day 14, whereas it was not significantly different between diets at each time point (i.e., at 14 and 15 days of age).

Five hours after switching diets, daily dietary changes did not drastically modify plasma insulin concentration (2.70 ± 0.44 ng/ml) (Table 3). The plasma levels of total free amino acids were significantly higher with the P+ diet compared to the P− diet (2.1-fold higher, P<.05). We did not observe any significant difference in the levels of free amino acids between E+ and E− diets and between E−P+ and E+P− diets. There was no significant difference between groups with regard to pectoralis major muscle RNA and protein content (Table 3). The capacity for muscle protein synthesis (i.e., RNA/protein ratio) was thus not changed whatever the diet.

3.2. Daily changes in dietary protein and/or energy content modulated MuRF1 and atrogin-1 expression in chicken muscle

Five hours after switching diets, we explored the potential regulation of atrogin-1 and MuRF1 by daily variations in energy or protein, or both (Fig. 1A). The levels of mRNA expression of atrogin-1 and MuRF1 were dramatically affected by the alternation of diets varying in protein, with overexpression with P− compared to P+ (4.5-fold for atrogin-1, P<.001; 1.6-fold for MuRF1, P<.01). Atrogin-1 and MuRF1 were underexpressed with E+ compared to E− (2.7-fold for atrogin-1 and 1.8-fold for MuRF1, P<.01). With a mixed diet sequence, the expression of atrogin-1 was up-regulated in E+P− compared to E−P+ (2.1-fold, P<.05), but not that of MuRF1. On the other hand, the expression of certain other genes related to proteolysis (i.e., cathepsin B, m-calpain, ubiquitin and 20S proteasome C2) was not modified by any treatment (data not shown). To explore further the potential changes in the ubiquitin proteasome system, we studied the activity of the major proteasome peptidases (i.e., trypsin-like and chymotrypsin-like) in the pectoralis major muscle. Peptidase activity of the proteasome was not drastically changed by the alternation of diet, with the exception of the mixed diet sequence, where levels of trypsin-like and chymotrypsin-like activity were higher in E+P− than in E−P+ (1.2-fold and 1.4-fold, respectively; P<.05) (Fig. 1B).

3.3. TOR responded to daily changes in dietary protein and/or energy content

We first focused on the changes in FoxO phosphorylation potentially induced by daily variations in dietary protein and energy content. The levels of phosphorylated FoxO1 and FoxO3a measured

Table 3
Effects of daily changes in dietary protein and/or energy content on plasma parameters and muscle characteristics in chickens at 14–15 days of age *

Sequential treatment†	C	S_P		S_E		S_{EP}		S.E.M.	P <
Diet	C	P+	P−	E−	E+	E−P+	E+P−		
Plasma parameters									
Insulin, ng/ml	3.58	3.28	2.59	2.63	3.22	2.80	2.69	0.38	NS
αNH2 NP N, mg/ml‡	0.89 [a]	0.98 [a]	0.57 [b]	0.76 [ab]	0.88 [a]	0.91 [a]	0.73 [ab]	0.07	<.05
Muscle characteristics									
Protein, mg/g	115	114	112	106	117	116	118	5	NS
RNA, μg/g	1.99	2.00	1.88	1.90	2.01	1.99	2.05	0.07	NS
Cs, mg RNA/g protein§	17.4	17.6	16.9	18.0	17.2	17.3	17.5	0.6	NS

* Measurements were performed 5 h after the switch of diet. Results are expressed as means ± S.E.M. (n=6 except for C where n=12). They were analyzed using one-way ANOVA.

† S_P, sequential feeding with alternation of diets varying in crude protein (P+ followed by P−); S_E, sequential feeding with alternation of diets varying in energy (E− followed by E+); S_{EP}, sequential feeding with alternation of diets varying in protein and energy content (E−P+ followed by E+P−).

‡ αNH2 NP N, αNH2 nonprotein nitrogen, an estimate of free amino acids, is expressed as mg L-serine equivalent/ml.

§ Cs, capacity for protein synthesis.

UNCORRECTED PROOF

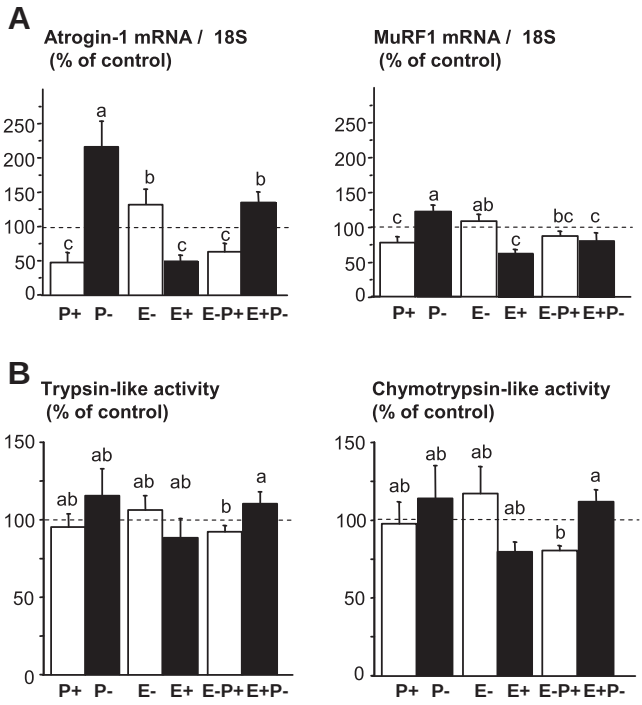


Fig. 1. Effects of daily changes in dietary protein and/or energy content on the expression of atrogin-1 and MuRF1 (A) and on trypsin-like and chymotrypsin-like peptidase activity of the proteasome (B) in breast muscle of 2-week-old chickens. Measurements were performed 5 h after the switch of diet. Analyses were carried out by real-time RT-PCR. mRNA levels were normalized using 18S rRNA; 18S was not significantly affected by dietary treatments. Results are expressed as percentages of the control on the day of the experiment and presented as means ± S.E.M. (n=6). Means not sharing the same letter are significantly different (P<.05).

5 h after the switch of diet were not significantly changed by sequential feeding (Fig. 2A). Since mTOR may also be involved in the regulation of E3 ubiquitin ligases, we next measured the phosphorylation of mTOR (Fig. 2B). The level of mTOR phosphorylation was significantly greater in the pectoralis major muscle of chickens fed the P+ diet compared to the P− diet (1.7-fold, P<.05). The difference in mTOR phosphorylation between the E−P+ and E+P− diets was not significant, and fairly similar values were observed in the breast muscle of chickens fed the E− and E+ diet.

3.4. mTOR targets related to mRNA translation were also regulated

To assess whether mTOR targets related to mRNA translation into proteins were regulated, we next examined the downstream effectors S6K1, S6 and 4EBP1. We explored the phosphorylation of S6K1 on the serine/threonine residues considered to be most critical for kinase function, i.e., T389 and T421/S424 [30,31]. The level of S6K1 phosphorylation was significantly greater in the breast muscle of chickens fed the P+ diet compared to the P− diet (4.5- to 5.1-fold according to serine/threonine residue, P<.05) (Fig. 3A). Similarly, S6 and 4EBP1 were more highly phosphorylated in the muscle of chickens fed the P+ diet compared to the P− diet (4.2- and 1.85-fold for S6 and 4EBP1, respectively; P<.05) (Fig. 3B–C). The levels of phosphorylated S6K1 and 4EBP1 measured 5 h after the switch of diets differing in energy content were not significantly different. Nevertheless, the E+ diet led to increased S6 phosphorylation compared to the E− diet (3.5-fold, P<.05). Alternation of mixed diets resulted in relatively more consistent findings: although there was no significant difference between E−P+ and E+P− diets for S6K1 phosphorylation on T389, higher levels of p-S6K1 on T421/S424 (2.6-fold, P<.05), p-S6 (1.7-fold, P=.06) and p-4EBP1 (1.7-fold, P<.05) were found in the E−P+ diet compared to the E+P− diet.

4. Discussion

Sequential feeding programs with daily variations in dietary protein and/or energy content were carried out to explore the short-term regulation of protein metabolism in chicken skeletal muscle. We used 48-h cycles that did not impair overall growth performance as previously demonstrated [20,21] or capacity for protein synthesis (i.e., protein synthesis machinery) in chicken pectoralis major muscles. Chickens from all feeding programs exhibited similar average feed intake. Overconsumption was found on the second day of the cycle, which can be explained by the general increase in daily feed intake related to chicken growth and potential changes in feed preferences. Clearly, similar sequential feeding experiments [32] showed a notable effect measured in the short term with diets varying in energy. Birds decreased their consumption of low-energy diets during the first 15 min of distribution and conversely increased consumption of high-energy diets. These experiments did not reveal any effect on feed intake with diets varying in protein content.

In these experimental conditions, alternation of diets varying in protein and energy content applied for two cycles resulted in marked regulation of atrogin-1 and MuRF1. Such regulation of the two E3 ubiquitin ligases in response to dietary provision is in good agreement with the results obtained using another 48-h cycle sequential feeding program with diets varying in lysine content for seven cycles [10]. This implies overexpression of atrogin-1 and MuRF1 in the breast muscle of chickens transiently receiving lower provision of protein, amino acid (i.e., lysine) and energy, whatever the study. It should be noted that this effect was found without lower quantities of P− consumed (vs. P+), whereas the energy effect may be at least partly explained by the underconsumption of E− vs. E+ as shown during the first 15 min of distribution in previous experiments [32]. The fact that changes in atrogin-1 and MuRF1 expression were recorded at different times depending on the study (here and Ref. [10]), i.e., after two and seven cycles of sequential feeding and both 5 h and 24 h after switching diets, supports the hypothesis of some consistent mechanisms of atrogene regulation according to temporal changes in dietary provision, despite the dynamic nature of such regulation. In our experimental conditions, these changes in atrogene mRNA levels did not induce major alterations in chymotrypsin-like and trypsin-like activity measured at 5 h postswitch. A somewhat similar pattern between proteasomal peptidase activity and expression data was recorded, but the diet-related variations within a sequential feeding program were not so marked and failed to reach statistical significance, except for alternation of mixed diets. Although a relationship between atrogene expression and degradation capacity of the proteasome is not systematic, as reported in different models of muscle atrophy in trout for instance [28,33,34], we cannot exclude the possibility that more than 5 h is necessary after switching diet to obtain an enhanced effect.

In the present study, the use of three sequential feeding programs varying in either protein or energy, or both, also provides evidence of significant differences between atrogin-1 and MuRF1 regulation. In particular, the expression of atrogin-1 was almost twice as high in the E+P− diet than in the E−P+ diet, whereas that of MuRF1 was unchanged. These findings may be partly due to different changes induced by protein and energy provision according to the two E3 ubiquitin ligases. For MuRF1, the increase was approximately 1.7-fold in both P− compared to P+ and E− compared to E+ sequences, with potential compensation effects of energy and protein in the case of alternation of mixed diets. Conversely, for atrogin-1, the extent of stimulation was much more pronounced with cyclical changes in protein content (4.5-fold in P− vs. P+) compared to cyclical changes

UNCORRECTED PROOF

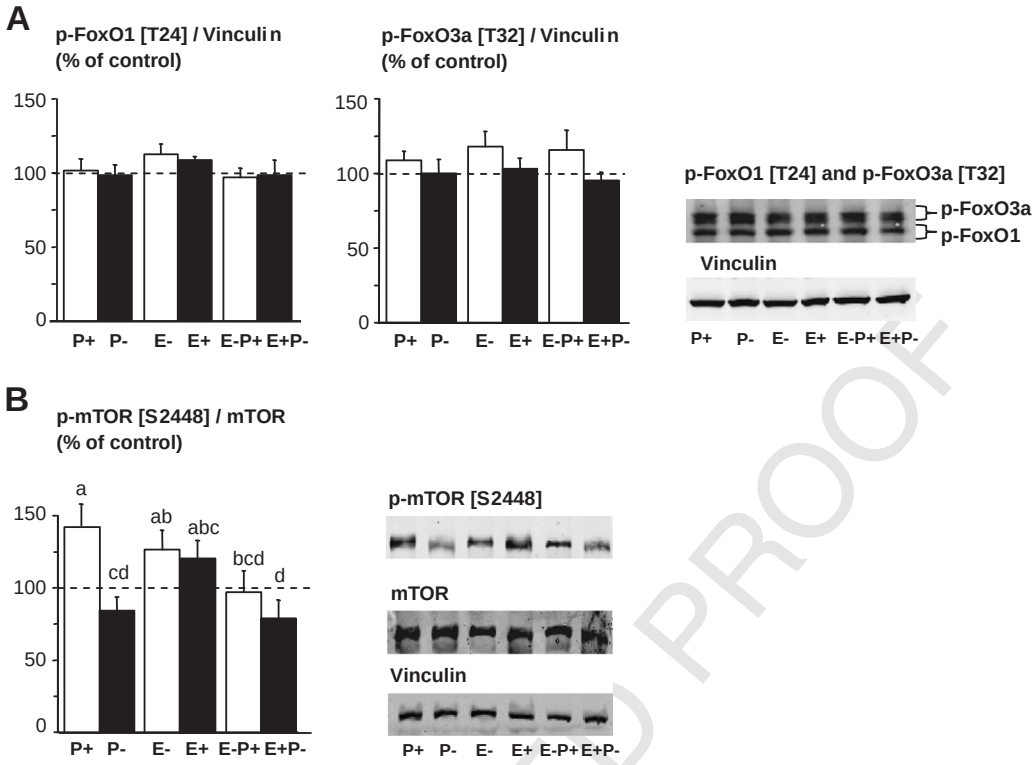


Fig. 2. Effects of daily changes in dietary protein and/or energy content on the phosphorylation of FoxOs (A) and mTOR (B) in breast muscle of 2-week-old chickens. Measurements were performed 5 h after the switch of diet. Representative Western blots performed using the antibodies indicated. Blots were quantified, and the p-FoxO1/vinculin, p-FoxO3a/vinculin and p-mTOR/mTOR ratios were determined. Results are expressed as percentages of the control on the day of the experiment and presented as means ± S.E.M. (n=6). Means not sharing the same letter are significantly different (P<.05).

in energy content (2.7-fold in E− vs. E+), which is a possible explanation for the doubled atrogin-1 expression in the E+P− compared to the E−P+ diet. This particularly high effect of daily variations in protein levels specifically on atrogin-1 expression must be emphasized because it is very original. To our knowledge, the few studies in which changes in dietary provision have been tested on E3 ligases did not show such drastic and specific regulation of atrogin-1. A recent study indicated that atrogene expression may depend on the amino acid profile of dietary proteins, but without higher stimulation of atrogin-1 compared to MuRF1 [35]. The higher values were thus recorded with the zein protein (a very amino-acid-imbalanced protein with considerable lysine deficiency) that produced greatly delayed growth and, on the basis of previous experiments using lysine-deficient diets [36,37], probably induced changes in muscle protein breakdown.

In mammals and chickens, the transcription factors FoxOs are involved in the control of E3 ubiquitin ligases [10,14,15,38]. Here, FoxO1 phosphorylation was unchanged following daily variations in dietary protein and/or energy content, and variations in FoxO3a phosphorylation were not strong enough to be significant at 5 h postswitch. Regulation of atrogene expression with alternation of diets varying in energy independent of TOR signaling suggests that other mechanisms regulate atrogene expression that were not detectable in our experimental conditions (e.g., single collection at 5 h postswitch). The drastic increase in S6 phosphorylation on S235/S236 in the E+ diet compared to the E− diet without changes in the phosphorylation of TOR, S6K1 and 4EBP1, which is an interesting but unexplained response, also indicates the complexity of the underlying mechanisms. The signaling pathways that mediate control of gene transcription are only partially understood, and additional experiments are still needed to define the precise cascade of molecular events involved.

The kinase mTOR was clearly regulated by alternation of diets varying in protein (lower phosphorylation in P− vs. P+) and may contribute to modulation of atrogin-1 expression in these conditions (overexpression in P− vs. P+) since, as shown by *in vitro* studies [16,17,39], it is involved in the regulation of this atrogene. The changes observed in atrogin-1 expression and the mTOR cascade may originate from variations in anabolic factors such as amino acids. In particular, the major effect of daily variations in protein content, which led here to a significant increase in plasma amino acid concentrations, is consistent with findings demonstrating the control of this E3 ligase by amino acids *in vitro* [16,17,40,41]. The role of amino acids *in vivo* is less clear. For example, muscle atrogin-1 has been found to be unresponsive to leucine in rats in two experimental conditions, i.e., acutely and chronically elevated plasma leucine concentrations [42]. In our experimental conditions, it is possible that amino acids acted in synergy with insulin, whose plasma concentrations should have been transiently changed with differences between diets, although these differences were not significant at the time of sampling. Interestingly, we observed concomitant changes in atrogin-1 expression and in phosphorylation levels of mTOR targets involved in mRNA translation into proteins (e.g., lower phosphorylation of S6K1, S6 and 4EBP1 in P− vs. P+). These findings may corroborate recent evidence indicating that atrogin-1 is related to muscle protein synthesis and growth through the regulation of downstream effectors of mTOR, and that the activity or inactivity of a common set of molecules controlling specific cellular pathways determines whether the skeletal muscle tissue will respond to defined stimuli with muscle growth or loss [13,43,44]. eIF3f has been characterized as a substrate of atrogin-1 [45]. eIF3f plays a key role in muscle hypertrophy by increasing the activity of the TOR pathway, and the overexpression of an eIF3f mutant resistant to degradation is associated with protection against muscle atrophy

UNCORRECTED PROOF

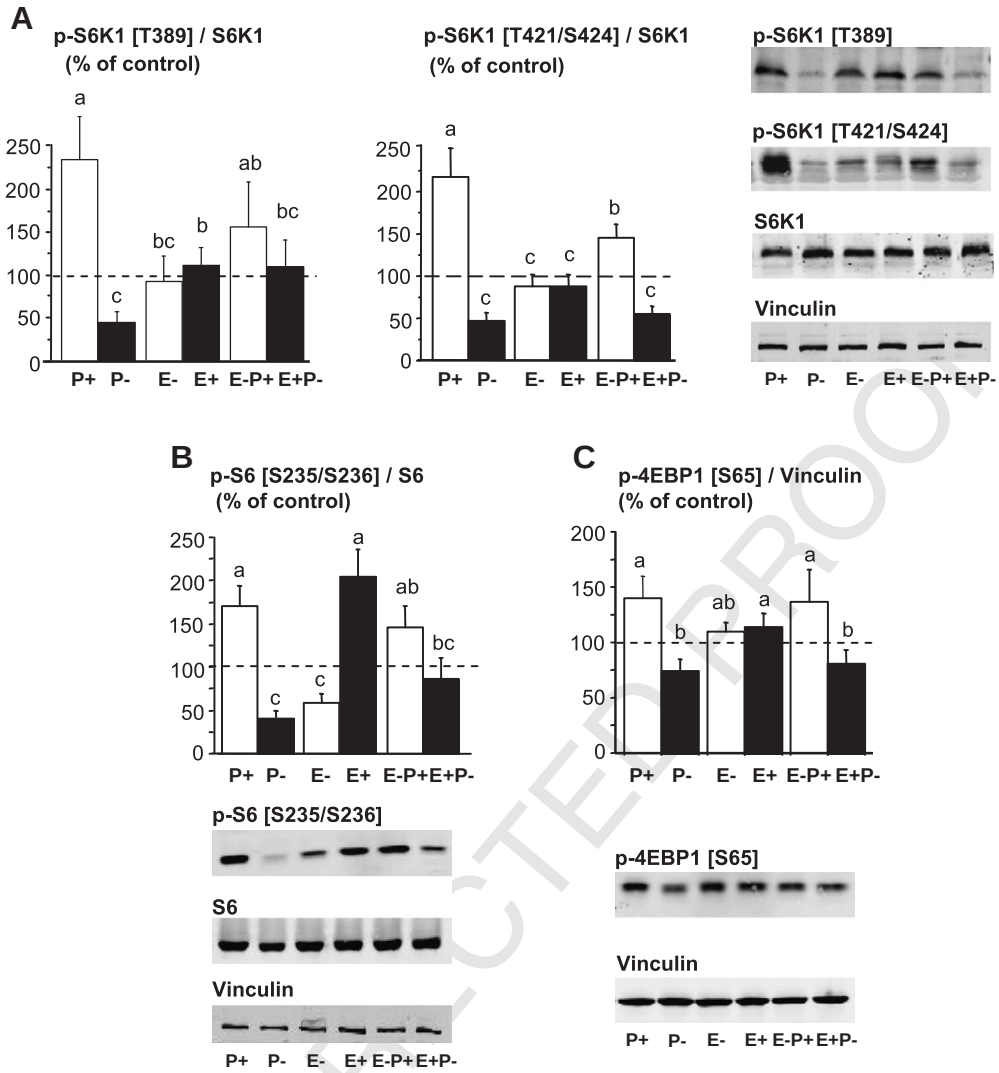


Fig. 3. Effects of daily changes in dietary protein and/or energy content on the phosphorylation of mTOR downstream targets related to translation initiation in breast muscle of 2-week-old chickens. Phosphorylation of S6K1 (A), S6 (B) and 4EBP1 (C). Measurements were performed 5 h after the switch of diet. Representative Western blots performed using the antibodies indicated. Blots were quantified, and the p-S6K1[T389]/S6K1, p-S6K1[T421/S424]/S6K1, p-S6[S235/S236]/S6 and p-4EBP1[S65]/vinculin ratios were determined. Results are expressed as percentages of the control on the day of the experiment and presented as means ± S.E.M. (n=6). Means not sharing the same letter are significantly different (P<.05).

[43,44]. The specific targeting of a particular protein (eIF3f) by atrogin-1 may explain the decreased protein synthesis observed in atrophy. It is noteworthy that although MuRF1 and atrogin-1 are E3 ubiquitin ligases, the specificity of their substrates means that they probably have different roles in the control of muscle mass. MuRF1 is involved in the degradation of myofibrillar proteins since myosin heavy chain and other myofibrillar proteins are targeted for breakdown by the proteasome in a MuRF1-dependent manner [11,12]. MuRF1 may thus be associated with muscle proteolysis, whereas changes in atrogin-1 appear not to be systematically correlated with the rates of muscle proteolysis.

In conclusion, expression of atrogin-1 and MuRF1 is regulated in the short term (i.e., 5 h after the diet change) by 48-h cycle sequential feeding programs with diets varying in protein and/or energy content. In our experimental model designed to distinguish the effects of protein and energy provision on the regulation of muscle metabolism in chickens with maintained growth performance, we show some atrogene-specific regulation, with a particularly pronounced effect of protein sequence on atrogin-1. Our results also suggest that the translational efficiency of protein synthesis is affected through the regulation of the mTOR cascade without any impairment of the synthesis machinery (i.e., capacity for protein synthesis). The mechanisms coordinating the short-term regulation of the protein synthesis/proteolysis balance by nutrients remain to be characterized. These findings also provide a basis for our understanding of metabolic adaptation to variations in dietary provision. Sequential feeding models are valuable tools for exploring chrononutrition with the aim of developing alternative nutritional strategies. Such strategies could be used for several purposes such as improving overall protein deposition and optimizing feed utilization.

Acknowledgments

The authors thank Florence Favreau (INRA, UE1295 PEAT, Nouzilly, France) and Anne-Marie Chagneau (INRA, UR83 Recherches Avicoles, Nouzilly, France) for animal care and experimental design management, and Magali Bergès, Estelle Cailleau-Audouin, Sabine Crochet and Hamza Mameri (INRA, UR83 Recherches Avicoles, Nouzilly, France) for their technical assistance. They are also grateful to Christiane Vachot (INRA, UR1067 Nutrition, Métabolisme, Aquaculture, St. Pée-sur-Nivelle, France) for peptidase activity measurements and to D. Raine (Surrey, UK) for editing the English language.

UNCORRECTED PROOF

AUTHOR QUERY FORM

ELSEVIER	**Journal: JNB** **Article Number: 6799**	**Please e-mail or fax your responses and any corrections to:** **Jill Shepherd** **E-mail: J.Shepherd@Elsevier.com** **Tel: 352-483-8113** **Fax: 352-483-3417**

Dear Author,

Please check your proof carefully and mark all corrections at the appropriate place in the proof (e.g., by using on-screen annotation in the PDF file) or compile them in a separate list. Note: if you opt to annotate the file with software other than Adobe Reader then please also highlight the appropriate place in the PDF file. To ensure fast publication of your paper please return your corrections within 48 hours.

For correction or revision of any artwork, please consult http://www.elsevier.com/artworkinstructions.

Any queries or remarks that have arisen during the processing of your manuscript are listed below and highlighted by flags in the proof. Click on the 'Q' link to go to the location in the proof.

Location in article	Query / Remark: click on the Q link to go Please insert your reply or correction at the corresponding line in the proof
Q1	Please confirm that given names and surnames have been identified correctly.
Q2	Please indicate the definition in the legend.
Q3	The reference cited is not credited to Bouvarel et al. Please check. The Ref is [20]
Q4	Please indicate the significance of letters a, b and c in Tables 2 and 3.
Q5	Please check if this can be changed to "A total of 720 1-day-old" for clarity.
Q6	Please check if the definitions provided here are appropriate.
Q7	Please define at first use.
Q8	Please define at first use.

Thank you for your assistance.

References

[1] Walrand S, Boirie Y. Optim izing protein inta ke in aging. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 2005;8(1):89-94.

[2] Hocquette JF, Tesserau d S, Cassar-Malek I, Chillard Y, Or tigues-Marty I. Responses to nutrients in farm anim als: im plications for production and quality. Anim al. 2007;1(9):1297-1313.

[3] Rosebrough RW , McMurtry JP, Steele NC. Prot ein and energy relations in the broiler chicken. Chronic or acu te effects of alternating protein or in termittent feeding regimens on broiler lipid metabolism. Br J Nutr. 1989;61(2):223-33.

[4] Rosebrough RW, Russe ll BA, Richards MP. Furthe r studies on short-te rm adaptations in the expression of lipogenic genes in broile rs. Com p Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2011;159(1):1-6.

[5] Arnal MA, Mosoni L, Boirie Y, H oulier ML, Morin L, V erdier E, Ritz P, Antoin e JM, Prugnaud J, Beaufrère B, Mirand PP. Protein pulse feeding improves protein retention in elderly women. Am. J. Clin. Nutr. 1999;69(6):1202-1208.

[6] Arnal MA, Mosoni L, Dardevet D, Ribeyre MC, Bayle G, Prugnaud J, Patureau Mirand P. Pulse protein feeding pattern restores stim ulation of muscle protein synthesis during the feeding period in old rats. J. Nutr. 2002;132(5):1002-1008.

[7] Boirie Y, Dangin M, Gachon P, Vasson MP, Maubois JL , Beaufrère B. Slow and fast dietary proteins differently m odulate postpra ndial protein accretion. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1997;94(26):14930-14935.

[8] Dangin M, Boirie Y, Garcia-Rodenas C, Gac hon P, Fauquant J, Callier P, Ballèvre O, Beaufrère B. The dig estion rate of protei n is an independent regulating factor of postprandial protein retention. Am . J. P hysiol. Endocrinol. Metab. 2001;280(2):E340-348.

[9] Morens C, Bos C, Pueyo ME, Benam ouzig R, Gausserès N, Luengo C, Tomé D, Gaudichon C. Increasin g habitual p rotein intake accentuates differences in postprand ial dietary nitrogen utilization between pr otein sources in humans. J. Nutr. 2003;133(9):2733-2740.

[10] Tesseraud S , Bouvarel I, Collin A, Audouin E, Crochet S, Seiliez I, Leterrier C. Daily variations in dietary lysine c ontent alter the expression of ge nes related to proteolysis in chicken pectoralis major muscle. J. Nutr. 2009;139(1):38-43.

[11] Clarke BA, Drujan D, W illis MS, Murphy LO, Corpina RA, Burova E, Rakhilin SV, Stitt TN, Patte rson C, Latres E, Glass DJ . The E3 Ligase MuRF1 degrades m yosin heavy chain protein in dexam ethasone-treated skeletal m uscle. Cell Metab. 2007;6(5):376-85.

[12] Cohen S, Brault JJ, Gygi SP, Glass DJ, Valenz uela DM, Gartner C, Latres E, Goldberg AL. During m uscle atrophy, thick, but not thin , filam ent components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. J Cell Biol. 2009;185(6):1083-95.

[13] Attaix D, Baracos VE. MAFbx/Atrogin-1 expression is a poor index of m uscle proteolysis. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 2010;13(3):223-224.

[14] Sandri M, S andri C, Gilbert A, Skurk C, Cala bria E, Picard A, W alsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL. Foxo transcri ption factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. Cell. 2004;117:399-412.

[15] Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyva Y, Kline WO, Gonzalez M, Yancopoulos GD, Glass DJ. The IGF-1/PI3K /Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. Mol. Cell. 2004;14(3):395-403.

[16] Herningtyas EH, Oki mura Y, Handayaningsih AE, Ya mamoto D, Maki T, Iida K, Takahashi Y, Kaji H, Chihara K. Branched -chain am ino a cids and arginine suppress MaFbx/atrogin-1 m RNA expression via m TOR pathway in C2C12 ce ll line. Biochim . Biophys. Acta. 2008;1780(10):1115-1120.

[17] Tesseraud S , Métayer-C oustard S, Boussaid S, Crochet S, A udouin E, Derouet M, Seiliez I. In sulin and am ino acid availab ility regulate atro gin-1 in avian QT6 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007;357(1):181-186.

[18] Kimball SR, Jefferson LS. Role of am ino acids in th e tran slational co ntrol of pro tein synthesis in mammals. Semin. Cell. Dev. Biol. 2005;16(1):21-27.

[19] Tesseraud S, Abbas M, Duchene S, Bigot K, Vaudin P, Dupont J. Mechanism s involved in the nutritional regulation of m RNA transla tion: features of th e avian m odel. Nutr. Res. Rev. 2006;19(1):104-116.

[20] Bouvarel I, Chagneau AM, Lescoat P, Tessera ud S, Leterrier C. Forty-eight-hour cycle sequential f eeding with diets varying in protein and energy contents: adaptation in broilers at different ages. Poult. Sci. 2008;87(1):196-203.

[21] Bouvarel I, Barrier-Guillot B, Larroude P, Boutten B, Leterrier C, Merlet F, Vilariño M, Roffidal L, Tesseraud S , Castaing J, Picard M. Sequential feeding programs for broile r chickens: twenty-four- and forty-eight-hour cycles. Poult. Sci. 2004; 83(1):49-60.

[22] Dupont J, Tesseraud S, Derouet M, Collin A, Rideau N, Cro chet S, God et E, Cailleau-Audouin E, Métayer-C oustard S, Duclos MJ, Gespach C, Porter TE, Cogburn LA, Simon J. Insulin immuno-neutralization in chicken: effects on insulin signaling and gene expression in liver and muscle. J. Endocrinol. 2008;197(3):531-542.

[23] Ruffier L, Crochet S, Rideau N. I nsulin re lease by islets of Lange rhans isolated from dorsal and ventral lobes of chicken pancreas. Ann. N. Y. Acad .Sci. 1998;839:553-555.

[24] Munro HN, Fleck A. Analysis of tissues an d body fluids f or nitrogenous constituents. In: Munro HN, editor. Mamm alian Protein Me tabolism. New York: Academ ic Press; 1969. pp. 424-525.

[25] Smith PK, Krohn RI, Herm anson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurem ent of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 1985;150(1):76-85.

[26] Tesseraud S , Peresson R, Chagneau AM. Age -related changes of pr otein turnover in specific tissues of the chick. Poult Sci. 1996;75(5):627-31.

[27] Chabrolle C, Tosca L, Crochet S, Tesseraud S, D upont J. Expression of adiponectin and its recep tors (AdipoR1 and AdipoR2) in chicken ovary: Potential role in ovarian steroidogenesis. Domest. Anim. Endocrinol. 2007;33(4):480-487.

[28] Seiliez I, Panserat S, Skiba-Cassy S, Fric ot A, Vachot C, Kaushik S, Tesseraud S. Feeding status regulates th e polyubiquitination step of the ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in rainbow trout (Oncorhynchus m ykiss) muscle. J. Nutr. 2008;138(3):487-491.

[29] Duchêne S, Métayer S, Audouin E , Bigot K, Dupont J, T esseraud S. Refeeding and insulin activate the A KT/p70S6 kinase path way without affecting IRS1 tyrosine phosphorylation in chicken muscle. Domest. Anim. Endocrinol. 2008;34(1):1-13.

[30] Pullen N, T homas G. The m odular phosphor ylation and activati on of p70s6k. FEBS. Lett. 1997;410(1):78-82.

[31] Dennis PB, Pullen N, P earson RB, Koz ma SC, Thomas G. Phosphorylation sites in the autoinhibitory dom ain participate in p70(s 6k) activation loop phos phorylation. J. Biol. Chem. 1998;273(24):14845-14852.

[32] Bouvarel I, Vallee C, Chagneau AM, Constantin P, Lescoat P, Ferreira G, Leterrier C. Effects of various energy and protein le vels during sequential feeding on feed preferences in meat-type chickens. Animal. 2008;2(11):1674-1681.

[33] Martin SA, Blaney S, Bowm an AS, Hou lihan DF. Ubiquitin -proteasome-dependent proteolysis in rainbow trout (Oncorhynchus m ykiss): effect of food deprivation. Pflugers. Arch. 2002;445(2):257-266.

[34] Wang J, Salem M, Qi N, Kenney PB, Rexroad C E 3rd, Yao J. Molecular characterization of the MuRF genes in rain bow trout: Potentia l role in m uscle degradation. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2011;158(3):208-15.

[35] Luo J, Chen D, Yu B. Effects of different dietary protein sources on expression of genes related to protein metabolism in growing rats. Br. J. Nutr. 2010;104(10):1421-1428.

[36] Tesseraud S , Peresson R, Lopes J, Chagneau AM. Dietary lysine deficiency greatly affects m uscle and liver protein turnov er in growing chickens. Br J Nutr. 1996;75(6):853-65.

[37] Tesseraud S, Tem im S, Le Bihan-D uval E, Chagneau AM. Increase d responsiveness to dietary lysine deficiency of p ectoralis major muscle protein turnover in broilers selected on breast development. J. Anim. Sci. 2001;79(4):927-933.

[38] Nakashima K, Yakabe Y, Ya mazaki M, Abe H. Effects of fasting and refeeding on expression of atrogin-1 and Ak t/FOXO signaling pathway in sk eletal muscle of chick s. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2006;70:2775-2778.

[39] Latres E, Am ini AR, Am ini AA, Griffiths J, Martin FJ, W ei Y, Lin HC, Yancopoulos GD, Glass DJ. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase /Akt/mammalian target of rapa mycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway. J. Biol. Chem. 2005;280:2737-2744.

[40] Bower NI, de la Serrana DG, Johns ton IA. Characterisation and differential regulation of MAFbx/Atrogin-1 alpha and beta transcript s in sk eletal muscle of Atlantic s almon (Salmo salar). Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010;396(2):265-271.

[41] Cleveland BM, W eber GM. Effects of insulin- like growth factor-I, insulin, and leucine on protein turnover and ubiquitin ligase expres sion in rainbow trout prim ary myocytes. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2010;298(2):R341-50.

[42] Frost RA, Nystrom GJ , Jefferson LS, Lang CH. Hor mone, cytokine, and nutritional regulation of sepsis-induced increases in atrogin-1 and MuRF1 in skeletal m uscle. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2007;292:E501-E512.

[43] Csibi A, Leibovitch MP, Cornille K, Tin tignac LA, Leibovitch SA. MAFbx/Atrogin -1 controls the activity of the initiation factor eIF3-f in skeletal muscle atrophy by targeting multiple C-terminal lysines. J. Biol. Chem. 2009;284(7):4413-4421.

[44] Csibi A, Cornille K, Leibovitch MP, Poupon A, Tintignac LA, Sanchez AM, Leibovitch SA. The translation regulator y subunit eIF3f controls th e kinase-dependent m TOR signaling required for muscle differentiat ion and hypertrophy in m ouse. PLoS. One. 2010;5(2):e8994.

[45] Lagirand-Cantaloube J, Offner N, Csib i A, Leibovitch MP, Batonnet-Pichon S, Tintignac LA, Segura CT, Leibovitch SA. The initiation factor eIF3-f is a m ajor target for atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. THE EMBO Journal 2008; 27(8):1266-1276.

I. Principaux résultats

Le modèle d'alimentation séquentielle (AS) tel que pratiqué, avec des aliments variant en énergie et/ou en protéines, a permis d'obtenir des performances de croissance similaires à celles obtenues avec une alimentation complète (i.e. régime équilibré distribué de manière continue). Au niveau du muscle *Pectoralis major* , la capacité de synthèse des protéines musculaires déterminée au travers de la capacité ribosomale (Cs) n'est pas non plus affectée par les traitements d'AS, comparé à l'alimentation complète témoin. L'utilisation du modèle d'AS suggère que le poulet de chair est capable d'une certaine adaptation métabolique face à des changements alimentaires. Pour comprendre les mécanismes sous-jacents, nous avons exploré l'impact de l'alternance des régimes sur la traduction des protéines et la protéolyse musculaires. Les niveaux des ARNm codant atrogin-1 et MuRF1, mesurés 5 heures après le changement des aliments, sont altérés par les régimes variant en protéines (P+ *vs*. P-) ou en énergie (E+ *vs*. E-). Les régimes mixtes, variant à la fois en protéines et en énergie (E+P- *vs.* E-P+), affectent l'expression d'atrogin-1 mais pas celle de MuRF1. Dans nos conditions expérimentales, seuls les régimes mixtes induisent des variations significatives des activités peptidases du protéasome (système ubiquitine protéasome-dépendant), i.e. trypsine-like et chymotrypsine-like, qui sont plus élevées avec E+P- comparé à E-P+.

Dans la littérature, il a été montré que les E3 ligases atrogin-1 et MuRF1 sont régulées par des voies de signalisation intracellulaires impliquant FoxO et/ou mTOR. Dans notre étude, l'AS n'a pas modifié significativement la phosphorylation des protéines FoxO1 et FoxO3a au niveau du muscle *Pectoralis major*. Cependant, la phosphorylation de mTOR est augmentée par les régimes P+ *vs*. P- ($P<0,05$). De même, le niveau de phosphorylation des effecteurs de cette protéine impliqués dans le contrôle de la traduction des ARNm en protéines (i.e. S6K1, S6 et 4E-BP1) est augmenté par les régimes P+ *vs*. P- ($P<0,05$). Les régimes variant en énergie (E+ *vs*. E-) n'affectent que la phosphorylation de la protéine ribosomale S6. Les régimes mixtes (E-P+ *vs*. E+P-) augmentent la phosphorylation des trois cibles de mTOR mais avec une amplitude moins importante que les régimes variant en protéines, voire n'atteignant pas la signification statistique. Ces variations sont relativement cohérentes avec celles des concentrations plasmatiques en acides aminés libres, qui sont elles aussi plus importantes pour les alternances impliquant une variation de la teneur en protéines seule (aminoacidémie 2,1 fois plus forte avec le régime P+ *vs.* P-, et 1,5 fois plus forte avec le régime E-P+ *vs.* E+P-).

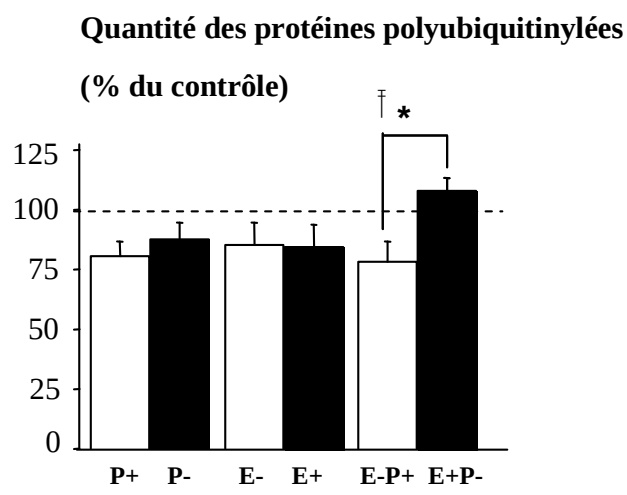


Figure 38. Effets des changements journaliers des teneurs du régime en énergie et/ou protéines sur la quantité des protéines polyubiquitinylées dans le muscle *Pectoralis major* de poulets à 14-15 j d'âge. Les solubilisats du muscle (60 µg de protéines) sont soumis à une électrophorèse SDS-PAGE, puis transférés sur membrane de nitrocellulose. Celle-ci est ensuite incubée avec un anticorps anti-polyubiquitine (clone FK1). Les bandes ont été visualisées et quantifiées par fluorescence Infrarouge (Odyssey System). L'histogramme montre la quantification des 3 bandes principales detectées. Les données rapportées par rapport au contrôle du jour (en % du contrôle), sont analysées par ANOVA. Elles sont exprimées comme moyennes ± SEM (n = 6).

II. Résultats complémentaires

La fonction des E3 ubiquitine ligases MuRF1 et atrogin-1 est ciblée sur la phase d'ubiquitinylation des protéines. Dans la voie de protéolyse ubiquitine protéasome-dépendante, ce processus d'ubiquitinylation est essentiel pour permettre la dégradation des protéines par le protéasome 26S. Nous avons examiné les éventuelles variations de l'ubiquitinylation des protéines lors de l'alternance des régimes dans nos programmes d'AS. Les protéines polyubiquitinylées sont identifiées par western blot (électrophorèse SDS-PAGE) en utilisant un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre les protéines conjuguées à l'ubiquitine (clone FK1, Upstate/Chemicon Direct, France). Trois bandes majeures de poids moléculaire apparent supérieur à 100-150 kDa ont été obtenues. Nous les avons chacune quantifiées et nous avons également quantifié l'ensemble des bandes révélées (**Figure 38**). Quel que soit le mode de quantification, il n'y a pas de modification importante des quantités de protéines polyubiquitinylées mesurées 5 heures après le changement de l'aliment. Notons cependant que les valeurs apparaissent plus élevées dans le groupe E+P- *vs.* E-P+, en cohérence avec ce qui est observé avec les activités protéolytiques trypsine-like et chymotrypsine-like (supérieures avec E+P- comparé à E-P+).

Pour compléter ces résultats et analyser comment la protéolyse pouvait être touchée dans notre modèle, nous avons déterminé l'expression d'autres gènes impliqués dans différents systèmes protéolytiques : lysosomal (cathepsine B), calcium-dépendant (m-calpaïne) et ubiquitine protéasome-dépendant (sous-unité C2 du protéasome 20S et ubiquitine). Nous montrons que les niveaux d'ARNm codant ces acteurs de la protéolyse ne sont pas altérés par les alternances d'aliments, quel que soit le traitement (**Tableau 7**). Nous nous sommes de même intéressés aux caspases qui peuvent intervenir dans les premières étapes de la dégradation des protéines contractiles dans certaines conditions cataboliques. Nous avons ainsi cherché à déterminer par Western-Blot l'activation de la caspase 3 en utilisant un anticorps anti Cleaved Caspase-3 (Asp175) qui permet la détection des niveaux endogènes des fragments (17 à 19 kDa) de la caspase-3 activée (résultant du clivage à côté de l'Asp175). Nous n'avons pas obtenu de résultats exploitables, même en essayant d'optimiser les conditions de préparation des échantillons de muscles pectoraux, par exemple avec une lyse par 3 cycles de congélation dans l'azote liquide et décongélation dans l'eau (environ 25°C).

Tableau 7 : Effet de l'alimentation séquentielle (cycles de 48 heures) avec des aliments variant à la fois en protéines et en énergie sur l'expression des gènes impliqués dans la protéolyse au niveau du muscle *Pectoralis major* de poulets de 14 à 15 jours d'âge[*].

Programme d'AS	**S_P**		**S_E**		**S_{EP}**			
Aliments	P+	P-	E-	E+	E-P+	E+P-	SEM	*P* <
Protéolyse (*% contrôle*)								
m-Calpaïne	124,6	120,9	84,2	120,4	119,8	92,7	17,9	NS
Cathepsine-B	112,8	95,9	87,3	89,1	109,0	95,1	15,9	NS
Protéasome C2	88,6	140,1	134,8	110,2	117,7	170,5	29,2	NS
Ubiquitine (Ub)	91,8	84,3	113,3	86,6	90,8	74,2	8,1	NS

[*]Les poulets sont abattus 5 heures après le changement d'aliment.

S_P : Alternance des aliments variant en protéines (P+ suivi de P-).

S_E : Alternance des aliments variant en énergie (E- suivi de E+).

S_{EP} : Alternance des aliments variant à la fois en protéines et en énergie (E-P+ suivi de E+P-).

Les données sont exprimées en pourcentage de l'aliment témoin et sont présentées sous forme de moyennes ± SEM (n = 6).

NS : Non significatif à un taux de signification α=5%.

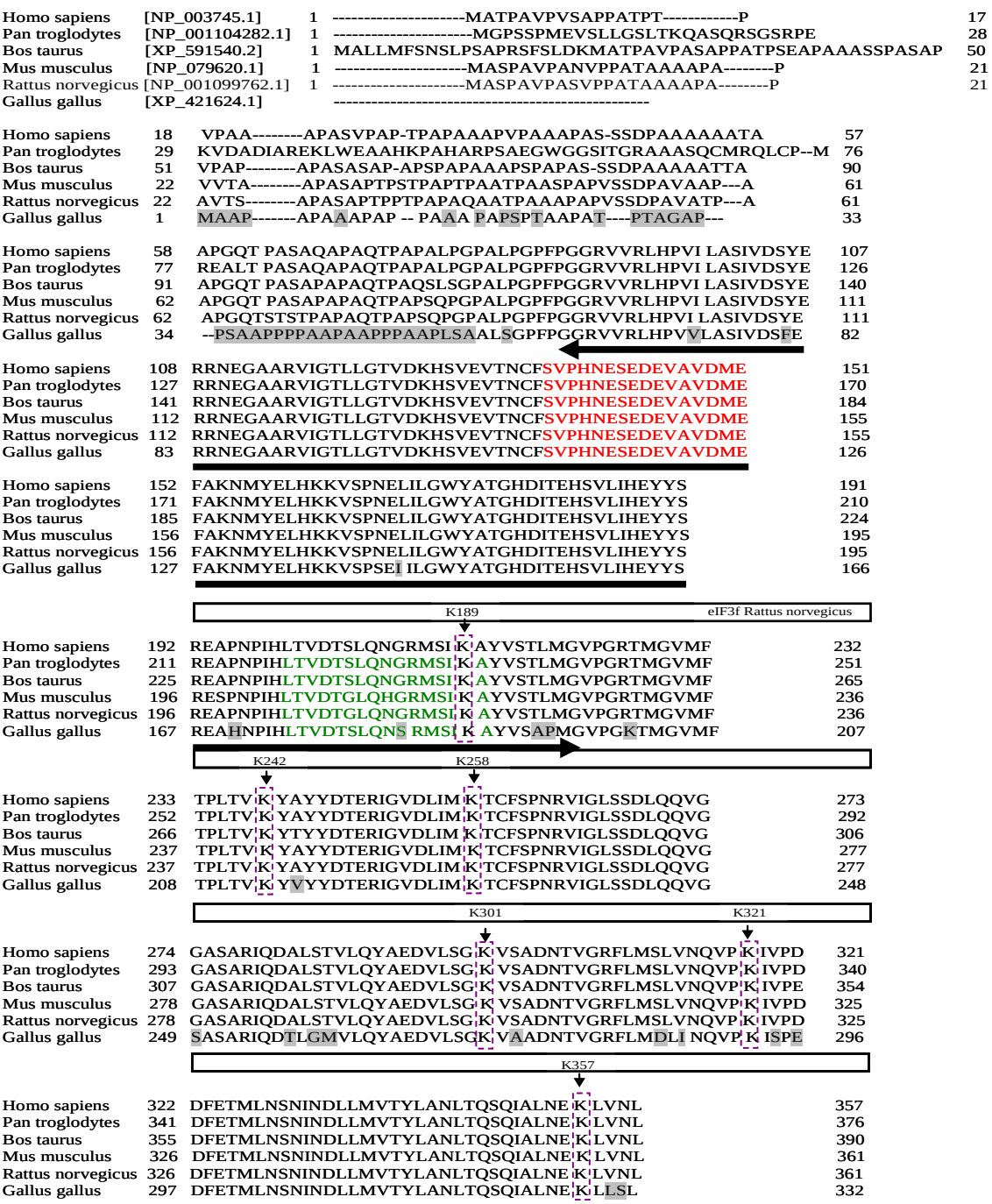


Figure 39. Comparaison de la séquence de eIF3f de poulet avec différentes espèces. Les acides aminés soulignés en gris ne sont pas conservés en comparaison avec la séquence du Rattus norvegicus. Les séquences avec couleur de police rouge représentent le peptide 1 et avec la couleur verte le peptide 2, (peptides utilisés pour la production d'anticorps anti-eIF3f de poulet). Les résidus lysines encadrés en violet sont des résidus conservés entres espèces.

⟷ Région MOV 34

Nous avons également utilisé des contrôles positifs. Pour ceci, des cellules C2C12 (myoblastes de souris) ont été traitées ou non par du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), agent connu pour induire l'apoptose et activer la voie des caspases. Plus précisément, les cellules sont cultivées en multipuits à 37°C sous une atmosphère contrôlée (95% d'air et 5% CO_2) dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal. A partir de 70 à 80% de confluence, les cellules sont sevrées avec un milieu DMEM sans sérum pendant toute la nuit. Le lendemain les cellules sont traitées avec 0,5 ou 1 mM H_2O_2 pendant 1h. Les cellules cultivées dans un milieu DMEM sans H_2O_2 ont servi de contrôle négatif. Nous avons vérifié que les cellules traitées par H_2O_2 étaient bien apoptotiques en observant les modifications morphologiques par microscope à fluorescence après avoir traité les cellules avec du DAPI (Di Aminido Phenyl Indol).

Lors de l'AS, nos résultats montrent clairement des variations des E3 ligases et de manière concomitante et inversée, d'acteurs importants dans le contrôle de la traduction des ARNm en protéines. Par exemple, MuRF1 et surtout atrogin-1 sont surexprimés avec le régime P- *vs.* P+, alors que mTOR et ses effecteurs 4E-BP1, S6K1 et S6, connus pour contrôler la synthèse protéique, sont beaucoup plus phosphorylés avec le régime riche en protéines P+ *vs.* P-. Nous avons alors souhaité mieux comprendre les mécanismes contrôlant l'équilibre synthèse/dégradation des protéines dans le modèle d'alimentation séquentielle. L'idée était de tester en particulier l'implication potentielle de eIF3f dans la régulation de ces processus du fait de son rôle pivot dans les processus d'atrophie/hypertrophie (Csibi et al., 2009, 2010). Il n'existe pas à l'heure actuelle d'anticorps eIF3f commerciaux utilisables chez le poulet. Nous en avons testé plusieurs sans succès et nous avons donc décidé de produire un anticorps anti-eIF3f sur le centre INRA (Nouzilly-Tours). Une des raisons du manque de spécificité des anticorps testés est qu'ils reconnaissent des peptides correspondant à la partie la moins conservée de la protéine, soit la partie N-terminale. De manière générale, la séquence protéique de eIF3f de poulet présente une identité élevée avec celle des mammifères (identité moyenne de 92% en séquence protéique). A titre d'exemples, les séquences de eIF3f Homo sapiens (N° accession NP_003745.1), Pan troglodytes (chimpanzé ; N° accession NP_001104282.1), Bos taurus (bovins ; N° accession XP_591540.2), Mus musculus (souris ; N° accession NP_079620.1), Rattus norvegicus (rat ; N° accession NP_001099762.1) et Gallus gallus (poulet ; N° accession XP_421624.1) ont été comparées à l'aide d'un logiciel d'alignement multiple (MUSCLE, version 3,6) (**Figure 39**).

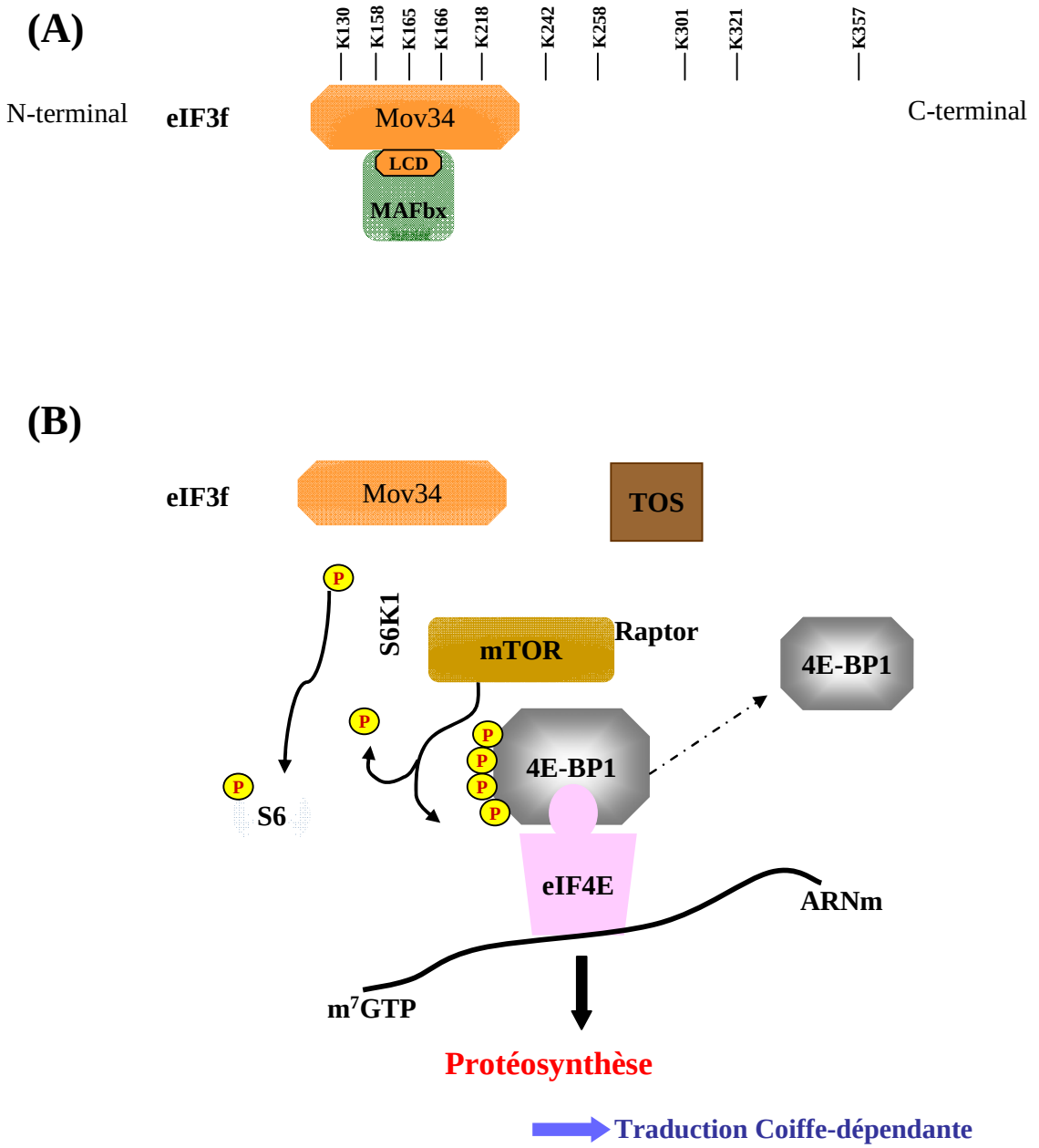


Figure 40. (A) Représentation schématique des résidus lysine de eIF3f, résidus responsables de son ubiquitinylation. (B) Rôle d'échafaudage du facteur eIF3f et implication dans le contrôle de la protéosynthèse (d'après Csibi, 2009).

- Mov34/MPN : Mpr1/Pad1 N-terminal
- TOS : TOR Signaling motif

De plus, la partie C-terminale de eIF3f (acides aminées 188 à 273 chez la souris et 159 à 244 chez le poulet) ainsi que le domaine Mov34/JAB (acides aminés 94 à 200 chez la souris et 65 à 171 chez le poulet sont fortement conservés (**Figure 39**). Ceci est en faveur d'une interaction possible de eIF3f avec mTOR et S6K1, qui reste à démontrer. Les résidus lysine, nécessaires à l'ubiquitination de la protéine et à sa dégradation, sont également conservés (**Figure 40**). La suppression de 29 acides aminés dans la partie N-terminale de eIF3f de poulet (région la moins conservée) ne détériore probablement pas la fonction de cette protéine sachant que la délétion des acides aminés 1 à 94 de la partie N-terminale de eIF3f de souris n'affecte pas son interaction avec MAFbx (Lagirand-Cantaloube et al., 2008).

Pour produire un anticorps utilisable chez le poulet, nous avons ciblé deux peptides dont les séquences ont été déterminées d'après la structure 3D de la protéine (**Figure 41**) et après avoir vérifié leur antigénicité.

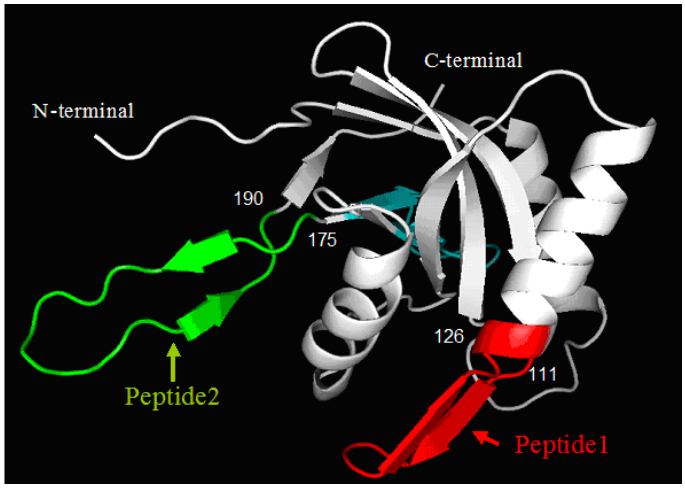


Figure 41. Structure tridimensionnelle de la protéine eIF3f et choix des peptides pour la production d'anticorps.

En collaboration avec Anne Poupon

INRA, UMR PRC, 37380 Nouzilly

Peptide 1 : 111-SVPHNESEDEVAVDME-126

Peptide 2 : 175-LTVDTSLQNGRMSIKA-190

Ces deux peptides de 16 acides aminés ont été choisis dans des domaines conservés qui permettent l'interaction avec mTOR et S6K1. Le peptide 1 (acides aminés 111 à 126) (rouge) a pour séquence SVPHNESEDEVAVDME et le peptide 2 (acides aminés 175 à 190) (vert), LTVDTSLQNSRMSIKA. Les deux peptides ont été couplés ou non à une protéine vecteur KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin), de poids moléculaire élevé et présentant une immunogénicité importante face aux systèmes immunitaires des mammifères ou des oiseaux. La KLH possède de nombreux groupes amines libres permettant le couplage avec l'antigène. La synthèse peptidique a été réalisée par Genosphere Biotechnologies. Pour augmenter nos chances de production d'un anticorps adéquat, nous avons immunisé 2 lapins femelles (White Néo-Zélandais) avec chacun des deux peptides (donc 4 lapines en tout), car la réponse immunitaire varie d'un animal à l'autre. Nous avons utilisé un protocole d'une durée de 4 mois avec 4 injections. Les réponses immunitaires ont été suivies tout au long du protocole qui devait être adapté si nécessaire (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Protocole de production des anticorps anti-eIF3f.

Date	***Interventions***
Deux mois avant la première injection	Mise en place des lapins Prises de sang (10ml) pour choix des animaux
J0	Prélèvement de sang (5ml) pour vérification des sérumspréimmuns juste avant injection. 1ère Injection en Intra Dermique Multipoint (IDM). Avec adjuvant complet de Freund
J21	Prélèvement de sang 5ml, puis 2ème injection IDM avec adjuvant incomplet de Freund
J40	Prélèvement de sang 5ml, puis 3ème injection IDM avec adjuvant incomplet de Freund
J70	Prélèvement de sang 20ml, 4ème injection « Boost » avec adjuvant incomplet de Freund
J82	Prélèvement de sang 3ml pour contrôle
J84	Exsanguination des lapins

La validation des anticorps est actuellement en cours. Brièvement, le peptide 2 n'a pas permis de produire un anticorps anti-eIF3f spécifique. En revanche, l'anticorps produit à partir du peptide 1 reconnait une protéine de la taille attendue (environ 50 kDa) dans des solubilisats de muscles de poulet ou de cellules aviaires. Nous envisageons de séquencer par spectrométrie de masse la protéine reconnue par l'anticorps anti-eIF3f.

III. Discussion

Les travaux précédents de Bouvarel et al. (2004, 2008a) ont permis de valider des modalités d'alimentation séquentielle aboutissant à une croissance et à des performances d'abattage similaires à celles obtenues avec une alimentation complète. Selon ces études, la distribution séquentielle des aliments de caractéristiques différentes en termes d'apport énergétique et/ou protéique, n'altère pas les performances lorsque le cycle de distribution est de 48 heures, à la différence de ce qui est observé avec un cycle de 24 heures. Il est également nécessaire de veiller à ce que la consommation des régimes distribués en séquentiel permette un ingéré total en énergie et en protéines similaire à celle obtenue avec le régime témoin distribué en continu. Des sous-consommations peuvent être liées à la présentation de l'aliment. Dans nos conditions expérimentales, l'augmentation de la teneur en énergie a été obtenue essentiellement par une augmentation de la part du maïs et de l'huile de colza au détriment du blé. L'augmentation de la teneur en protéines est obtenue par une augmentation de l'incorporation de tourteau de soja. Les teneurs en acides aminés essentiels ont été modifiés dans le même rapport. Par conséquent, les caractéristiques physiques de l'aliment sont différentes (différence de couleur et de dureté). L'aliment protéique et peu énergétique, présenté sous forme de granulés, présente une forte dureté, freinant la consommation dans le cas de granulés de longueur trop élevée. Il a été ainsi montré que la technique est valide quand la longueur des granulés est maîtrisée (4 à 5 mm) (Bouvarel, 2009).

Par ailleurs, l'aliment pauvre en énergie (E- et P+E-) est toujours distribué le premier jour du cycle pour éviter une réduction générale de la consommation qui se produit lorsque l'on commence par les régimes riches en énergie. En effet, il a été montré qu'à court (heure) et moyen termes (jour), le choix de consommation des animaux est guidé par les caractéristiques sensorielles des aliments énergétiques (Bouvarel et al., 2008b). Les poulets apprennent à reconnaître rapidement l'aliment le plus énergétique, et le surconsomment. La régulation de la balance énergétique ne s'effectue donc pas par une ingestion plus importante de l'aliment le moins énergétique, et plus faible de l'aliment le plus énergétique. Elle

s'effectue à l'inverse, ce qui est contraire à la théorie classiquement admise. La régulation est effective mais seulement à l'échelle d'un cycle de distribution (48 heures). Signalons que les poulets n'adaptent pas à court-terme leur ingestion en fonction de la teneur en protéines de l'aliment mais à moyen terme après une longue période (semaine), la durée d'apprentissage étant certainement plus longue que pour la teneur énergétique. Les poulets n'expriment de plus pas de préférence alimentaire vis à vis de la teneur en protéine de l'aliment.

L'utilisation d'un programme d'AS de 48 heures n'altère pas les performances de croissance et la capacité de synthèse des protéines au niveau du muscle *Pectoralis major*. Les alternances d'aliments variant par leur teneur en protéines et/ou en énergie induisent en revanche une importante régulation de l'expression d'atrogin-1 et de MuRF1, comme cela a été observé dans un autre modèle d'AS, avec variation de la teneur de l'aliment en lysine (Tesseraud et al., 2009). La portée de ces résultats est renforcée par le fait que les variations sont enregistrées avec des conditions expérimentales fortement différentes selon l'étude : après 2 cycles d'AS (présente étude) comme après 7 cycles (Tesseraud et al., 2009) ; avec des prélèvements réalisés 5 heures (présente étude) ou 24 heures (Tesseraud et al., 2009) après le changement d'aliment. Dans notre étude, la sur-expression des atrogènes MuRF1 et atrogin-1 ne se traduit pas par des changements majeurs des activités trypsine-like et chymotrypsine-like mesurées 5 heures après le changement des aliments. Ceci pourrait être expliqué par le fait qu'il faille peut être plus de 5 heures pour obtenir un effet exacerbé sur l'activité de ces peptidases.

Notons qu'à l'inverse des E3 ligases du système ubiquitine protéasome-dépendant, les expressions de la cathepsine B (système lysosomal) et de la m-calpaïne (système calcium-dépendant) ne sont pas modifiées en fonction du traitement (programme d'alimentation séquentielle). Les choix expérimentaux que nous avons faits et les limites de l'étude réalisée, en particulier l'absence de cinétique de prélèvement (voir la partie Matériel et Méthodes) font que certaines questions restent actuellement en suspens. Existe-t-il une régulation de l'expression d'acteurs impliqués dans les systèmes protéolytiques lysosomal et calcium-dépendant à d'autres temps après le changement d'aliment ? S'agit-il d'une régulation temps-dépendante de la protéolyse globale ou plus ciblée sur certains des systèmes protéolytiques ? Quelle est la contribution réelle de chaque système protéolytique ?

L'alternance du régime en protéines (P+ *vs*. P-) induit une régulation plus importante d'atrogin-1 par rapport à MuRF1 au niveau du muscle pectoral du poulet. L'alternance du régime riche en énergie (E+ *vs*. E-) est capable de réguler l'expression des deux atrogènes.

Dans ces conditions expérimentales, l'effet induit par la variation de la teneur en énergie du régime pourrait être lié à la sur-consommation du régime E+ et à la sous-consommation du régime E- par les poulets pendant les 15 premières minutes suivant le changement d'aliment (Bouvarel et al., 2008b). L'expression d'atrogin-1 est doublée avec le régime E+P- *vs.* E-P+ alors que celle de MuRF1 est inchangée. Il existe probablement des effets des protéines et de l'énergie puisque les niveaux d'ARNm codant MuRF1 sont 1,7 fois supérieurs à la fois avec P- comparé à P+, et avec E- comparé à E+. A l'inverse, pour atrogin-1, l'amplitude de stimulation est bien plus prononcée avec les variations cycliques en protéines (4,5 fois pour P- *vs.* P+) qu'avec celles en énergie (2,7 fois pour E- *vs.* E+). Ce fort impact des variations du régime en protéines, et ce spécifiquement sur atrogin-1 doit être souligné. Ceci pourrait être expliqué au moins en partie par l'augmentation de la concentration plasmatique en acides aminés qui contrôlent au moins *in vitro* cet atrogène (Tesseraud et al., 2007 ; Herningtyas et al., 2008 ; Bower et al., 2010).

Les E3 ubiquitine ligases sont régulées par des mécanismes impliquant les facteurs de transcription FoxO et la protéine kinase mTOR (Sandri et al., 2004 ; Smith et al., 2010; Herningtyas et al., 2008 ; Tesseraud et al., 2007), raisons pour lesquelles nous avons mesuré la phosphorylation de ces protéines au niveau du muscle *Pectoralis major*. Cinq heures après le changement de l'aliment, la phosphorylation des FoxO n'est pas significativement modifiée. La kinase mTOR est quant à elle clairement régulée par l'alternance du régime en protéines (plus faible phosphorylation avec P- *vs*. P+) et pourrait donc contribuer à moduler l'expression d'atrogin-1 dans ces conditions (sur-expression avec P- *vs.* P+). Les changements que nous observons dans l'expression d'atrogin-1 et dans la cascade de signalisation mTOR peuvent provenir des modifications au niveau de facteurs anaboliques comme les acides aminés connus pour les contrôler *in vitro* (Tesseraud et al., 2007 ; Herningtyas et al., 2008 ; Bower et al., 2010). Ce rôle des acides aminés est moins clair *in vivo* puisque par exemple atrogin-1 n'est pas régulé par la leucine, que ce soit dans des conditions où les concentrations en leucine plasmatiques ont été augmentées de façon aigüe ou chronique (Frost et al., 2007). Dans nos conditions expérimentales, nous ne pouvons pas exclure que les acides aminés aient pu agir en synergie avec l'insuline car il est probable que l'insulinémie ait augmenté transitoirement (avant le temps de 5 heures correspondant aux prélèvements), avec peut-être également des différences entre régimes, même si celles-ci ne sont plus visibles au temps de la mesure.

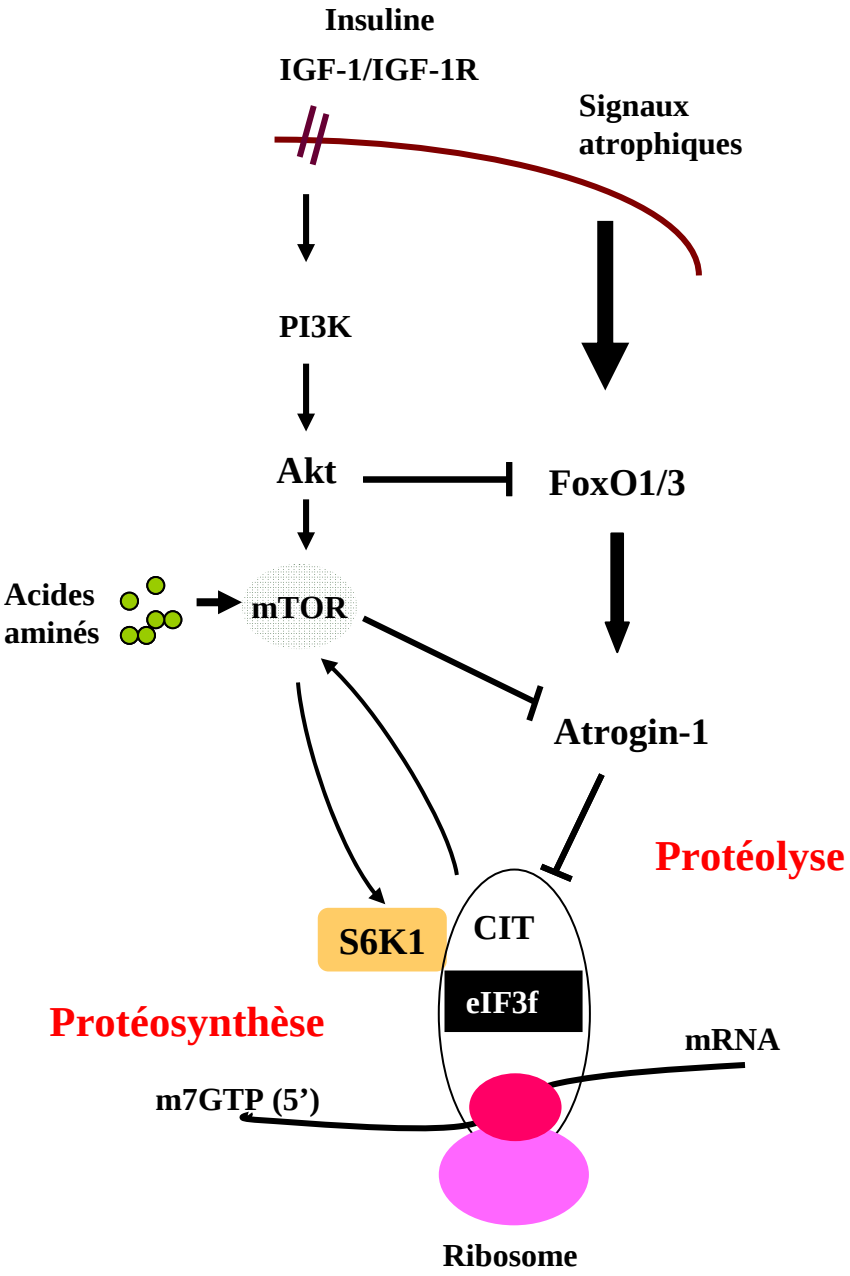


Figure 42. Régulation et rôle de eIF3f dans le contrôle de l'équilibre protéosynthèse/protéolyse (d'après Lagirand-Cantaloube et al., 2008).

CIT : Complexe d'initiation de la traduction

Comme nous venons de le voir, la régulation de mTOR par l'alternance du régime en protéines contribue certainement à moduler l'expression d'atrogin-1. Selon des études récentes, atrogin-1 exerce un rôle particulier et spécifique relié à la synthèse protéique via une régulation de cibles de mTOR (Csibi et al., 2009, 2010 ; Attaix & Baracos, 2010). Dans nos conditions expérimentales, il existe des changements des niveaux de phosphorylation des effecteurs de mTOR situés en aval de la cascade de signalisation (plus faible phosphorylation de S6K1, 4E-BP1 et S6 avec P- *vs*. P+). Nos résultats montrent ainsi des variations de l'E3 ligase atrogin-1 et de manière concomitante et inversée, de ces acteurs importants dans le contrôle de la traduction des ARNm en protéines (mTOR, S6K1, protéine ribosomale S6). Ceci indique très probablement une régulation à court-terme de l'équilibre protéosynthèse/protéolyse dans ces conditions. Ceci place potentiellement eIF3f au cœur de ces mécanismes contrôlant les processus d'atrophie/hypertrophie. En effet, la protéine eIF3f est une des cibles protéolytiques d'atrogin-1 (Lagirand-Cantaloube et al., 2008) (**Figure 42**). Atrogin-1 permet la polyubiquitinylation du facteur d'initiation eIF3f et sa dégradation par le protéasome. Rappelons que les données récentes de la littérature suggèrent que dans les cellules musculaires eIF3f agit comme une protéine d'échafaudage et coordonne l'activité des kinases S6K1 et mTOR pour promouvoir la traduction de messagers spécifiques impliqués dans la différenciation musculaire et l'hypertrophie (Csibi et al., 2010). Dans le but d'explorer davantage les mécanismes contrôlant l'équilibre protéosynthèse/protéolyse des protéines dans le modèle d'alimentation séquentielle, nous avons voulu tester l'implication potentielle de eIF3f. Dans mon travail de thèse, nous avons initié ce travail en cherchant dans un premier temps à nous doter d'un anticorps anti-eIF3f utilisable chez le poulet (voir paragraphe des données complémentaires).

Ainsi, l'étude des modifications à court-terme du métabolisme protéique musculaire ont permis de comprendre certains mécanismes d'adaptation du poulet à des variations d'apport alimentaire. D'autres travaux du laboratoire sur ce modèle d'AS montrent par ailleurs une régulation à court-terme des métabolismes énergétique et glucidique du poulet en fonction des alternances du régime en protéines et/ou en énergie. Dans ces travaux, il s'agissait en particulier d'explorer l'activation potentielle de voies de signalisation contrôlant l'utilisation du glucose par le muscle et donc régulant la croissance musculaire et la qualité des viandes (apport énergétique et stockage de glycogène). Ont été ciblées les voies Akt/GSK3 (voie déjà étudié dans notre premier modèle, l'exposition chronique à la chaleur) mais aussi la voie comprenant la kinase AMP-activated protein kinase (AMPK).

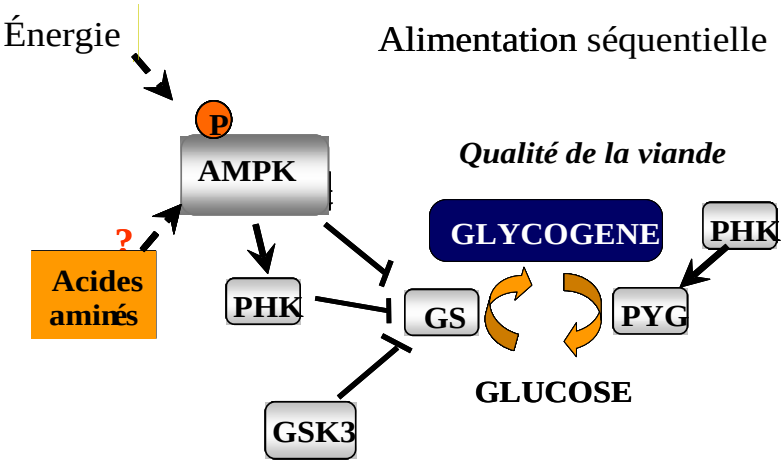


Figure 43. Voies de signalisation AMPK et GSK3 impliquées dans le métabolisme du glycogène.

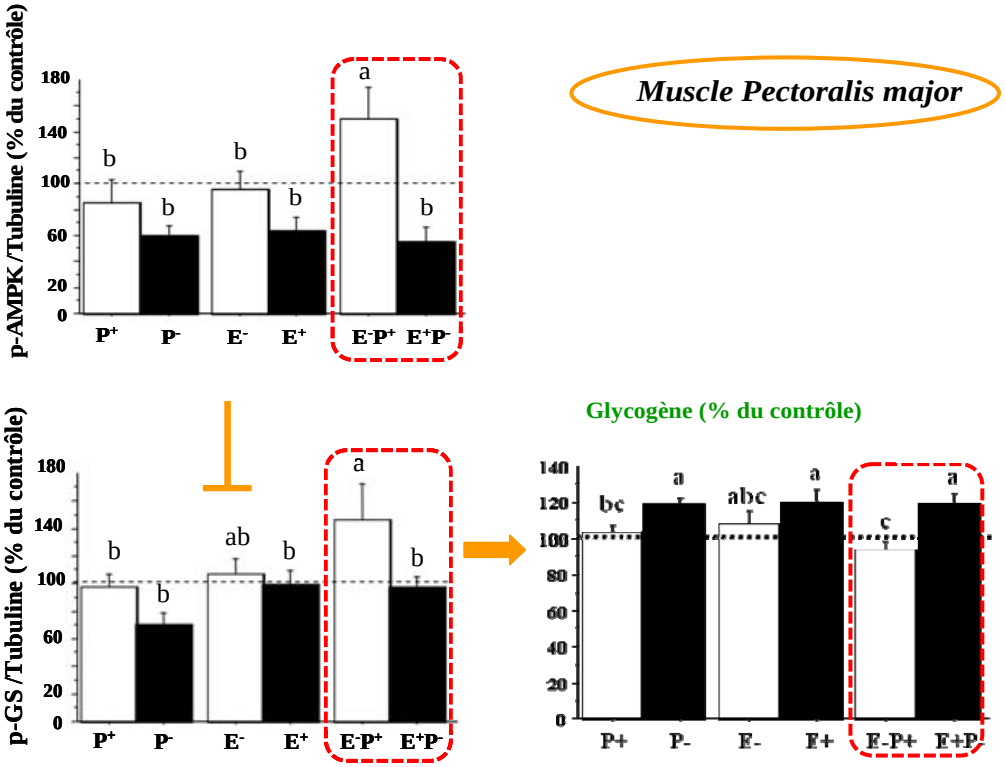


Figure 44. Régulation des niveaux de phosphorylation de p-AMPK et de p-GS ainsi que la teneur en glycogène par l'alimentation séquentielle (d'après Métayer-Coustard et al., 2010, ISEP, Parma).

L'AMPK est un senseur énergétique qui joue un rôle clé dans la régulation des métabolismes énergétique et glucidique. Les deux voies Akt/GSK3 et AMPK peuvent intervenir dans la régulation de la synthèse du glycogène, notamment en modifiant l'activité de la glycogène synthase (GS) (**Figure 43**).

Dans le modèle d'AS, la protéine Akt est plus phosphorylée avec le régime E+P- par rapport aux autres traitements et la phosphorylation la plus faible est obtenue avec le régime P+. Le même profil est observé pour la kinase GSK3, ce qui est logique car la protéine Akt, quand elle est activée par phosphorylation sur Ser473, induit la phosphorylation de la GSK3 sur résidus Ser21/9. Le profil est en revanche différent pour l'AMPK. L'alternance des régimes en protéines comme l'alternance des régimes en énergie ne modifie pas la phosphorylation de l'AMPK sur Thr172, alors que la kinase est fortement activée avec le régime E-P+ pauvre en énergie et riche en protéines. La phosphorylation de l'AMPK conduisant à son activation stimule ensuite la phosphorylation de la GS (état de phosphorylation de GS plus fort avec le régime E-P+) (**Figure 44**). La GS phosphorylée est alors inhibée ce qui conduit à une baisse de la synthèse de glycogène. Ceci est cohérent avec le stock de glycogène musculaire plus faible enregistré avec le régime E-P+ *vs.* E+P-. Ces résultats indiquent donc une régulation à court-terme du métabolisme du glycogène musculaire du poulet, avec une implication particulière de l'AMPK.

D'autres mesures ont porté sur l'intensité d'utilisation énergétique des nutriments énergétiques au niveau du muscle mais aussi au niveau du foie (incluant capacités oxydatives et marqueurs de la dépense énergétique). Les régimes P- et E+P- augmentent l'expression des ARNm codant la protéine découplante avUCP (impliquée dans la fonction mitochondriale) par rapport aux régimes P+ et E-P+, respectivement. Ceci pourrait limiter la génération mitochondriale des espèces réactives de l'oxygène quand les concentrations plasmatiques en T3 (triiodothyronine) sont fortes : valeurs deux fois plus fortes aves les régimes P- et E+P- comparés à P+ et E-P+. Par ailleurs, l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras, e.g. Hydroxyacyl déshydrogenase HAD, facteur de transcription «transcription factor PPARγ coactivator-1α » (PGC-1α), est stimulée dans le foie et, dans une moindre mesure dans le muscle, avec les régimes pauvres en énergie et/ou riches en protéines, suggérant une utilisation augmentée des acides gras dans ces séquences d'alimentation séquentielle. A l'opposé, l'expression hépatique du facteur de transcription « transcription factor Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 » (SREBP-1), stimulateur de la lipogenèse, est plus forte dans les régimes P- et E+P-. Ces données suggèrent que le poulet

régule son métabolisme énergétique musculaire et hépatique en fonction des séquences et des apports nutritionnels, ce qui pourrait permettre un stockage ou une utilisation rapide des substrats énergétiques en fonction de la composition du régime offert.

En conclusion, l'ensemble des résultats indique qu'il existe lors de l'utilisation de l'alimentation séquentielle des adaptations au niveau de l'utilisation et le stockage des nutriments (muscle/foie). Ces mécanismes permettent certainement à l'animal de valoriser des régimes déséquilibrés et donc de satisfaire ses besoins nutritionnels sur le long-terme. Le modèle que nous avons utilisé apporte des éléments d'informations essentiels pour maîtriser des systèmes d'alimentation utilisant le concept de chrononutrition.

DISCUSSION GENERALE –

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans ce travail de thèse portant sur les mécanismes d'adaptation environnementale, nous avons utilisé deux modèles de régulation du métabolisme, i.e. par la température ambiante et par des changements cycliques d'aliments. Ces deux modèles expérimentaux nous ont permis d'étudier le métabolisme musculaire dans des conditions très différentes, voire critiques pour l'animal (exposition à des températures élevées). Les différences reposent à la fois sur le facteur étudié (température ambiante ou alimentation séquentielle, AS), mais aussi sur les échelles de temps utilisées avec un effet à long-terme de la température ambiante dans le modèle d'exposition chronique à la chaleur, et un effet à court-terme des alternances d'aliments dans le modèle alimentation séquentielle. De plus, à l'inverse du modèle d'exposition à la chaleur, où des altérations des performances de croissance sont observées, le modèle d'AS a engendré des performances de croissance similaires au témoin. Cependant, quelles que soient ces conditions, le poulet montre des modifications hormonales (e.g. insulinémie) et métaboliques (e.g. paramètres du métabolisme protéique) qui peuvent traduire une certaine capacité d'adaptation physiologique et/ou métabolique. Les mécanismes impliqués dans l'adaptation du métabolisme protéique sont mal connus. Nos travaux ont permis d'approfondir les connaissances sur certains de ces mécanismes : voies de signalisation intracellulaires régulées par les facteurs anaboliques comme l'insuline et les acides aminés au niveau du muscle squelettique du poulet, expression des gènes en particulier ceux reliés à la protéolyse. Ils ouvrent aussi des pistes de réflexion sur l'adaptation métabolique.

I. Signalisation intracellulaire

Les travaux antérieurs de l'équipe croissance et métabolisme ont initié les études sur les voies de signalisation impliquées dans le contrôle du métabolisme protéique musculaire chez les espèces aviaires. Des approches *in vitro* et/ou *in vivo* ont alors permis de caractériser des protéines kinases contrôlant le métabolisme protéique et d'étudier leurs activations en utilisant différents modèles expérimentaux comme par exemple le jeûne et la réalimentation (Bigot et al., 2003 ; Duchêne et al., 2008). Les résultats obtenus étaient originaux sachant que le poulet présente une régulation insulinique particulière comparée aux mammifères, avec une absence de régulation des éléments précoces de la signalisation de l'insuline au niveau du muscle. Paradoxalement, les éléments en aval de la PI3K sont régulés par la réalimentation : activation et/ou augmentation d'activité des kinases telles que mTOR, S6K1, et de la protéine ribosomale S6. Dans nos conditions expérimentales, la cascade de signalisation S6K1 est

aussi modifiée par les variations de l'état nutritionnel (nourris *vs.* à jeun, modèle d'exposition à la chaleur). De manière tout à fait intéressante, elle est aussi sensible aux variations d'apport alimentaire (variations cycliques d'apport en énergie et en protéines, modèle d'AS). Dans un registre un peu similaire, il a été montré que l'état d'activation de la S6K1 musculaire ainsi que son activité spécifique dépendent de l'apport alimentaire chez le poussin (Bigot et al., 2003b). Le modèle alors utilisé, l'alimentation néonatale précoce ou différée dans le temps, a permis de mettre en évidence que la S6K1 musculaire est stimulée par le premier apport alimentaire chez le poussin nouveau né. La consommation précoce (premiers jours de vie) d'un régime enrichi en protéines active davantage la S6K1 avec des conséquences possibles en termes de croissance corporelle et musculaire (Everaert et al., 2010). Dans cette dernière étude, l'augmentation des protéines alimentaires de 23,2% (régime témoin) à 26,7% (niveau de protéines au-delà du besoin) accroit la phosphorylation de la S6K1, alors que dans les études de Frank et al. (2005, 2006), l'augmentation des protéines alimentaires au-delà du besoin n'accroit pas davantage la phosphorylation de la S6K1 dans le muscle du porcelet. Malgré ces nuances, il faut quand même souligner que l'activation de la S6K1 musculaire dépend des taux en protéines du régime à la fois chez le poussin nouveau-né et le porcelet. Ceci serait assez cohérent avec ce qui est observé dans un autre modèle, le poisson carnivore caractérisé par un fort besoin en protéines alimentaires : chez la truite, l'activation de la voie mTOR/S6K1 est fortement altérée lorsque l'on réduit le rapport protéines sur carbohydrates dans le régime (Seiliez et al., 2011). On peut cependant se poser la question de savoir si l'effet des apports alimentaires sur la cascade mTOR/S6K1 est généralisable ou valable uniquement dans ces modèles un peu particuliers : alimentation néonatale, alimentation d'animaux carnivores ou en ce qui nous concerne plus directement ici, alimentation séquentielle et encore, avec des nuances.

Dans le modèle d'AS, l'effet de l'énergie (avec une phosphorylation accrue de la protéine S6 avec le régime E+ par rapport à E-) semble inférieur à celui des protéines. De plus, il est possible qu'une partie de ce résultat puisse s'expliquer par le fait que les animaux surconsomment le régime E+ par apport à E- pendant les 15 premières minutes après le changement d'aliment. L'effet de l'exposition des animaux à la chaleur sur la signalisation S6K1 est un des points qui nous a également intéressé mais pour lequel les conclusions sont relativement difficiles à tirer. Le premier problème vient de l'analyse d'un effet à long-terme (une semaine d'exposition à la chaleur) sur la signalisation : dans ces conditions, il existe des contre-régulations possibles, des kinases peuvent avoir été phosphorylées puis

déphosphorylées. C'est en partie la raison pour laquelle nous avons plutôt comparé les réponses à des facteurs anaboliques en fonction de la température d'élevage. Même dans ces conditions, la régulation des kinases Akt et S6K1 ne semble pas fondamentalement altérée en conditions chaudes. Cependant, la protéine ribosomale S6 étant légèrement moins activée par le traitement glucose et arginine à 32°C comparé à 22°C, ceci pourrait contribuer à une diminution de l'efficacité de la traduction des ARNm en protéines au chaud.

Dans les conditions où la cascade de signalisation S6K1 est activée, quels sont les facteurs à l'origine de la transduction du signal ? Nous pouvons évoquer les facteurs anaboliques, insuline et/ou acides aminés, connus pour agir sur cette voie de signalisation chez le poulet comme chez les mammifères (Tesseraud et al., 2006 ; Metayer et al., 2008). Dans le modèle « retard d'alimentation du poussin nouveau né » par exemple, l'activité de la S6K1 est corrélée à l'insulinémie, suggérant une activation de la kinase au moins partiellement insulino-dépendante (Bigot et al., 2003). Dans le modèle d'exposition à la chaleur, la cascade de signalisation S6K1 est activée suite à l'administration de la solution de glucose et arginine *vs.* témoin. Sachant que l'insulinémie augmente fortement suite au traitement glucose et arginine, ceci suggère un effet insuline, plus éventuellement un effet acide aminé du fait de l'apport d'arginine (rôle possible mais non démontré de l'arginine en tant que nutriment signal).

Dans le modèle d'AS, les kinases de la voie de signalisation mTOR/S6K1/S6 sont beaucoup plus phosphorylées, donc activées, avec P+ comparé à P-. Le fait de consommer plus de protéines conduit à une aminoacidémie plus élevée dans l'organisme, ce qui est en faveur d'un effet majeur des acides aminés dans ces conditions. Un travail récent réalisé chez le rat montre une activation de mTOR dépendant de l'apport alimentaire en protéines (Luo et al., 2010), avec dans ce cas un changement du profil en acides aminés des protéines alimentaires qui induit des modifications des concentrations plasmatiques en acides aminés. Il est possible que l'accroissement des concentrations en leucine qui est alors trouvé avec un régime à base de zéine comparé à des régimes à base de caséine ou isolat de soja puisse contribuer à l'activation de la voie mTOR-dépendante. Cependant, le régime à base de zéine a profondément affecté les performances des animaux et retardé leur développement. Il est alors difficile de conclure quant à un effet propre des acides aminés puisque l'expression et l'état de phosphorylation des acteurs de la signalisation, comme la synthèse protéique musculaire, peuvent varier avec l'âge ou le développement de l'animal (Vaudin et al., 2006 ; Davis et al., 2008). Tout ceci ne veut pas dire non plus que, si les acides aminés permettent l'activation de

la voie S6K1, ils soient les seuls facteurs impliqués. Dans le cadre du modèle d'alimentation séquentielle, il est important de rappeler que nous ne pouvons pas exclure un effet de synergie entre acides aminés et insuline, l'insulinémie tendant à être plus forte pour P+ comparé à P-.

II. Protéolyse musculaire

Nous avons focalisé notre attention sur l'effet de la chaleur et des variations d'apports alimentaires sur le turnover protéique musculaire. Nous avons en particulier étudié l'expression de gènes reliés à la protéolyse musculaire dans les deux modèles d'étude. Comme des données préliminaires ou la littérature indiquaient que la chaleur (voir thèse de Temim, 2000) ou l'AS (modèle apport variable en lysine ; Tesseraud et al., 2009) pouvait exercer un effet significatif sur des éléments de la voie ubiquitine protéasome-dépendante, nous avons examiné les régulations au niveau de cette voie majeure de protéolyse dans le muscle tout en examinant aussi l'expression des gènes impliqués dans la régulation d'autres systèmes protéolytiques. Nos résultats ne corroborent pas vraiment cette hypothèse d'un impact conséquent sur certains acteurs majeurs de la protéolyse puisque la chaleur comme l'AS ne modifient pas l'expression de la sous-unité C2 du protéasome 20S (système protéolytique ubiquitine protéasome-dépendant), la cathepsine B (système protéolytique lysosomal)... Les phénomènes sont surement complexes puisque par exemple le niveau d'expression des ARNm codant la m-calpaïne (système calcium-dépendant) est réduit par la chaleur alors que l'expression de l'ubiquitine tend à être supérieure à 32°C comparé à 22°C (système protéolytique ubiquitine protéasome-dépendant). De ce fait, il est difficile de savoir s'il existe de réelles modifications de la protéolyse musculaire dans les modèles que nous avons étudiés. Il est en particulier impossible de déterminer *in vivo* la contribution de chacun des systèmes protéolytiques, sans oublier qu'ils ne sont pas indépendants et qu'ils peuvent interagir pour contrôler la masse musculaire. Dans le modèle d'AS, les conditions expérimentales utilisées (en particulier concernant le temps de prélèvement) ne nous ont pas non plus permis de révéler des variations majeures des activités trypsine-like et chymotrypsine-like rendant encore incertaine la régulation de la capacité de dégradation du protéasome.

Parmi les acteurs considérés comme importants dans le contrôle de la protéolyse musculaire figurent MuRF1 et atrogin-1 sur lesquels nous avons porté une attention toute particulière dans cette thèse. Ces E3-ubiquitine ligases appelées atrogènes sont surexprimées dans des conditions atrophiques. Elles sont impliquées dans l'ubiquitinylation des protéines

destinées à la dégradation protéasomale et leur régulation met en jeu des voies de signalisation stimulées par les hormones insuline et IGF-1 (Sandri et al., 2004). Les acides aminés régulent aussi l'expression de atrogin-1, au moins *in vitro* (Tesseraud et al., 2007 ; Herningtyas et al., 2008) (voir annexe 2). La régulation de MuRF1 et atrogin-1 dans les conditions physiologiques (et non physiopathologiques) reste encore peu connue. Nous montrons dans cette thèse que la chaleur n'affecte pas l'expression de MuRF1. En revanche, une sur-expression d'atrogin-1 est observée au chaud. Dans le modèle d'AS, l'expression de MurF1 et atrogin-1 est modifiée par l'alternance des régimes variant en protéines (sur-expression avec le régime P-) et en énergie (sous-expression avec le régime E+). Des modifications d'expression de ces atrogènes sont retrouvées dans l'alternance des régimes mixtes E-P+ et E+P- pour atrogin-1 mais pas pour MuRF1, pour lequel les effets P et E semblent se compenser. Il semble donc que dans nos deux modèles, atrogin-1 soit beaucoup plus sensible à nos facteurs de variation (température ambiante ou apports alimentaires variables dans le temps) que MuRF1. Des différences de régulation de l'expression de ces deux atrogènes impliqués dans le contrôle de la masse musculaire ont déjà été observées *in vivo*. Par exemple, l'administration d'IGF-1 chez le rat diminue préférentiellement les niveaux des ARNm codant atrogin-1 mais pas les niveaux des ARNm codant MuRF1 (Frost et al., 2007). Ce n'est cependant pas toujours le cas puisque, il n'existe pas de stimulation plus forte d'atrogin-1 comparée à MuRF1 suite à un changement du profil en acides aminés des protéines alimentaires (Luo et al., 2010) ou avec un modèle de variations journalières de l'apport en lysine dans le régime (Tesseraud et al., 2009).

Comment expliquer ces divergences entre études concernant la régulation des deux atrogènes MuRF1et atrogin-1 ? Eventuellement, par le facteur temps (après le début du traitement, ou après le changement d'un aliment, etc…), autrement dit en prenant en compte la nature transitoire des changements. En effet, il y a des évidences indiquant des différences de comportement de MuRF1et atrogin-1. Le sepsis induit ainsi une surexpression d'atrogin-1 pendant 72 heures alors que l'augmentation de l'expression de MuRF1 est plus transitoire, les valeurs n'étant plus différentes des valeurs contrôles après 24 heures (Frost et al., 2007). Il a été également montré que IGF-1 réduit rapidement l'expression d'atrogin-1, mais plus lentement celle de MuRF1 (Sacheck et al., 2004 ; Cleveland et Weber, 2010). Un autre facteur à considérer est le rôle possible des acides aminés. En effet, dans le modèle AS où il existe une aminoacidémie significativement supérieure avec P+ comparé à P-, nous pouvons postuler que le particulièrement fort impact des variations du régime en protéines sur

l'expression d'atrogin-1 est lié à l'augmentation de la concentration plasmatique en acides aminés. En effet, les acides aminés contrôlent *in vitro* cet atrogène (Tesseraud et al., 2007 ; Herningtyas et al., 2008 ; Bower et al., 2010 ; Cleveland et Weber, 2010) mais ne régulent pas forcément l'expression de MuRF1 (Cleveland et Weber, 2010). Il est cependant difficile d'étayer cette hypothèse d'un effet des acides aminés, et uniquement des acides aminés (c'est-à-dire sans effet synergique éventuel avec l'insuline), sur la base des données issues d'études *in vivo* : atrogin-1 n'est par exemple pas régulée par la leucine dans des expériences où les concentrations en leucine plasmatiques ont augmentées de façon aigüe comme de façon chronique (Frost et al., 2007). De même, suite à l'ingestion d'un repas après un jeûne chez la truite, atrogin-1 est inhibée avec une amplitude similaire que le régime soit riche ou pauvre en protéines (Seiliez et al., 2011). Enfin, comme indiqué dans la discussion de la partie expérimentale 2, même si MuRF1et atrogin-1 sont deux E3 ubiquitine ligases muscle-spécifiques, toutes deux surexprimées dans des conditions cataboliques, la spécificité de leurs substrats fait qu'elles jouent probablement des rôles différents dans le contrôle de la masse musculaire (Attaix & Baracos, 2010). MuRF1est impliqué dans la dégradation des protéines myofibrillaires alors qu'atrogin-1 agirait plutôt sur des processus en lien avec la différentiation et la synthèse protéique.

Connaissant le rôle joué par eIF3f dans les phénomènes d'atrophie et hypertrophie musculaire dans les modèles cellulaires ou murins (Csibi et al., 2009, 2010), il est possible que l'expression protéique d'eIF3f soit modifiée par l'alternance des régimes en protéines, du fait de sa dégradation plus ou moins intense par atrogin-1. Cette piste reste à explorer. Nous avons dans un premier temps cherché à nous doter d'un anticorps anti-eIF3f utilisable chez le poulet (voir la partie « Résultats et Discussion », résultats complémentaires). Il serait de plus pertinent d'approfondir le rôle de eIF3f pour mieux comprendre les mécanismes contrôlant la balance protéosynthèse/protéolyse dans notre modèle d'apport alimentaire variable dans le temps. Les associations de eIF3f avec différents partenaires pourraient être analysées en utilisant 2 stratégies complémentaires : 1) GST « pull-down » avec une protéine de fusion eIF3-f en présence de lysats de muscles de poulets soumis à différentes traitements (en particulier comparaison P+ *vs*. P-) ; 2) utilisation des techniques de co-immunoprécipitation avec probablement un cross-link préalable.

III. Adaptation métabolique

Dans les deux modèles que nous avons utilisés, le poulet montre des modifications physiologiques, métaboliques ou encore endocriniennes qui peuvent signifier une certaine capacité d'adaptation aux contraintes environnementales subies. Nous déclinerons les aspects d'adaptation métabolique sous quatre volets : métabolisme protéique, autres modifications physiologiques, importance du facteur temps et conséquences en termes de stratégies nutritionnelles et/ou pratiques d'élevage.

1. Métabolisme protéique

Les deux modèles étant fortement différents, ce ne sont pas forcément les mêmes modifications du turnover protéique qui sont enregistrées. Rappelons que l'effet de la température ambiante se traduit par une réduction de la croissance, une baisse de la rétention azotée et de l'intensité de protéosynthèse, avec en particulier une réduction du potentiel de synthèse musculaire. L'AS, dans les conditions testées, n'altère pas la croissance des poulets, ni le potentiel de synthèse au niveau du muscle *Pectoralis majo r*. En revanche, des régulations de la traduction des ARNm en protéines sont probables dans les deux modèles. Dans le modèle d'exposition chronique à la chaleur, l'efficacité traductionnelle est diminuée au chaud (Temim et al., 2001) et nous montrons dans notre première étude qu'il existe une légère altération de l'activation de la protéine ribosomale S6 par les facteurs anaboliques au chaud. Dans le modèle AS, la voie S6K1/S6 est clairement régulée par les alternances d'aliments, surtout lorsque l'apport en protéines varie. Les modifications de protéosynthèse pourraient résulter, dans les deux modèles, de variations des teneurs plasmatiques en acides aminés (modification des profils en acides aminés au chaud, Padilha, 1995 ; fluctuations des concentrations en acides aminés totaux entre P+ et P-, modèle AS). Notons que le rôle des acides aminés sur la protéosynthèse serait alors éventuellement double : nutriment 'signal' et substrat pour la synthèse protéique. Une action possible de l'insuline est enfin envisageable, même si dans l'état actuel des connaissances, aucune conclusion formelle ne peut être tirée.

Qu'en est-il de la protéolyse ? Au chaud, la protéolyse musculaire n'apparaît pas fortement modifiée. Nous avons en revanche pu approfondir les connaissances sur les mécanismes régulant la protéolyse dans l'autre modèle d'adaptation environnementale, l'AS. Les travaux précédents de Tesseraud et al. (2009) avaient indiqué une régulation de la protéolyse musculaire chez le poulet, dans un modèle d'alternance des apports en un seul

acide aminé, la lysine, avec des aliments iso-énergétiques et iso-protéiques. En particulier, la déficience transitoire du régime en lysine entraîne une sur-expression de l'expression des E3-ubiquitine ligases MuRF1 et atrogin-1 au niveau du muscle *Pectoralis major*. Ici, dans la deuxième étude, nous avons examiné la régulation de ces mêmes gènes reliés à la protéolyse musculaire dans un modèle plus complexe, avec des alternances des régimes en protéines et/en énergie, et ce sans perturbation de la croissance (à la différence du modèle lysine). Sans revenir sur les détails des résultats déjà présentés et discutés dans les parties précédentes, il est important de souligner l'existence au niveau du muscle pectoral de variations très importantes, d'un jour sur l'autre, de l'expression des 2 atrogènes. Il n'est pas possible de mesurer l'évolution de la masse protéique d'un muscle à l'échelle d'une journée. Cependant, nous pouvons supposer qu'il y a des évolutions au sein d'un cycle de 48 heures, avec un phénomène de « yoyo » au niveau du muscle *Pectoralis major*, alors que la croissance globale de l'animal est maintenue. Même si ce phénomène existe, plusieurs questions restent en suspens : trouverait-on la même chose quel que soit le muscle étudié ? est-ce généralisable à d'autres espèces que le poulet, voire dépendant de l'intensité de croissance des animaux (valable par exemple chez les poulets à croissance rapide comme ceux de l'étude mais peut-être pas chez des poulets à croissance lente comme les labels) ?

2. Autres modifications physiologiques

Dans les deux modèles testés, les modifications métaboliques ne se cantonnent pas au métabolisme protéique (variations du métabolisme énergétique en particulier), et ne portent pas seulement sur le muscle comme nous l'avons vu dans la discussion du modèle d'AS avec des travaux réalisés en parallèle au laboratoire (données non publiées). Même si pour explorer les mécanismes il est souvent nécessaire de focaliser sur des points particuliers, dans cette thèse sur la protéosynthèse / protéolyse, il ne faut pas oublier de considérer aussi l'animal plus globalement. À titre d'exemple, au chaud pour permettre le maintien de l'homéothermie, le poulet diminue sa thermogenèse et augmente la thermolyse. L'effet de la chaleur se traduit aussi par une baisse de l'ingéré alimentaire et probablement des modifications de l'utilisation digestive des aliments. Ce dernier paramètre est difficile à élucider au chaud car il dépend de plusieurs facteurs tels que l'ingéré alimentaire, la composition du régime, l'âge de l'animal et le génotype. Selon Padilha (1995), l'élévation de l'indice de consommation au chaud témoigne en partie une réduction de l'efficacité de transformation de l'aliment en gain de poids. Il est difficile de distinguer s'il s'agit d'un effet de la chaleur sur les capacités digestives de l'animal ou d'une modification de l'utilisation métabolique des nutriments. Par

ailleurs, le poulet au chaud montre également une augmentation de l'engraissement qui peut provenir d'une utilisation plus faible des réserves lipidiques pour la couverture des besoins énergétiques (Aïn Baziz, 1996). Dans cette thèse, nous avons aussi montré une forte réduction de l'expression musculaire du facteur de transcription PPARγ coactivator-1α (PGC-1α) au chaud. Rappelons que cette sous-expression de PGC-1α à 32°C est cohérente avec un engraissement accru (Aïn Baziz et al., 1996) et éventuellement un métabolisme oxydatif moins intense avec une réduction de production de la chaleur (Tesseraud & Temim, 1999 ; Collin et al., 2001).

Le modèle d'AS quant à lui permet de mettre en évidence un effet des variations d'apport alimentaire sur les métabolismes glucidiques et/ou énergétiques avec par exemple une régulation des cascades de signalisation impliquant Akt, GSK3, GS et AMPK. Il est intéressant de constater que ce ne sont pas les mêmes séquences d'AS qui induisent les activations des voies impliquées dans le contrôle du métabolisme protéique et du métabolisme glucidique. Par exemple, la voie AMPK n'est modifiée que par les régimes mixtes (variation probable du catabolisme des acides aminés comme l'attesteraient les mesures d'acide urique), alors que la voie mTOR/S6K1 est principalement affectée par les alternances des régimes différant par leur teneur en protéines. Enfin, d'autres résultats de l'équipe ont montré des modifications d'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse et dans l'oxydation des acides gras. Le poulet régule certainement son métabolisme énergétique musculaire et hépatique en fonction des séquences et des apports nutritionnels. Ceci lui permettrait un stockage ou une utilisation rapide des substrats énergétiques en fonction de la composition du régime offert.

3. Importance du facteur temps

Les phénomènes que nous avons étudiés dépendent clairement du facteur temps. Dans nos conditions expérimentales, ceci recouvre au moins deux notions : 1) la durée de l'effet testé avec les classifications « classiques » bien que relatives d'effets aigus ou chroniques, ou encore effets à court, moyen ou long-terme (dans la publication correspondant au premier modèle, nous avons préféré « exposition d'une semaine à la chaleur » plus précise que « exposition chronique à la chaleur ») ; 2) âge auquel le traitement est appliqué. Nous verrons successivement ces deux aspects dans ce paragraphe.

Il a été clairement démontré qu'un stress thermique aigu affecte la protéosynthèse avec des modifications au niveau de la transcription des gènes ribosomaux conduisant à l'altération

de la capacité de synthèse protéique (Jacob, 1995). Cependant, un traitement thermique prolongé pourrait conduire à un certain degré d'adaptation et par conséquent à une régulation différente de la protéosynthèse comme du métabolisme général. Les mécanismes impliqués dans l'altération de la synthèse protéique suite à une exposition prolongée à la chaleur ambiante sont encore très mal connus. Malgré tout, les données obtenues suite à l'exposition d'une semaine voire plus à la chaleur montrent toujours une altération du potentiel de synthèse. Il est à signaler que dans nos conditions, le poulet a été exposé à une température ambiante élevée constante. Il est possible que les réactions d'adaptation dans les conditions réelles, avec des variations de températures cycliques, soient différentes. Dans le modèle d'AS, la régulation testée serait plutôt dite à court-terme puisque l'étude a été réalisée 5 heures après le changement de l'aliment. Cependant, il ne faut pas ignorer que les prélèvements ont été effectués après deux cycles d'AS (i.e. 2 fois 48 heures), avec donc un éventuel effet à plus long-terme qui pourrait influencer les résultats observés sur le court-terme (i.e. 5 heures après le changement de l'aliment). Le fait que, dans cette stratégie alimentaire des cycles soient utilisés, signifie également que ce qui est observé à un moment donné dépend de l'aliment consommé le jour précédent. Les phénomènes sont un peu similaires pour l'ingestion : après plusieurs cycles de 48 heurs, une éventuelle adaptation de l'ingestion (si elle existe) pourrait aussi dépendre de ce qui a été consonné la veille. Des études cinétiques sur plusieurs cycles et différents temps de prélèvements paraissent nécessaires pour mieux appréhender les régulations et l'adaptation métabolique, comme ce qui a été fait pour approfondir le métabolisme lipidique chez des poulets de 7 à 28 jours d'âge soumis à la distribution alternée de deux régimes avec deux niveaux protéiques différents (Rosebrough et al., 2004, 2011).

Chez le poulet comme chez les mammifères, le métabolisme protéique musculaire comme sa régulation dépend de l'âge. Le phénomène le plus marquant est une réduction du taux de synthèse des protéines avec l'âge, plus ou moins marquée selon les tissus mais aussi la période considérée (pour revue Tesseraud et al., 1995 ; Tesseraud et al., 1996b). De plus, l'effet de facteurs anaboliques ou la stimulation postprandiale est beaucoup plus prononcé chez les très jeunes animaux, que l'on considère l'effet sur la synthèse protéique ou sur les voies de signalisation qui la contrôlent (Davis et al., 2008). Selon Guillet & Boirie (2005), les effets de l'apport en protéines sont aussi âge-dépendants, en incluant ici également le vieillissement. Les troubles de la régulation du métabolisme protéique chez la personne âgée qui conduisent à la diminution de la masse musculaire (sarcopénie) seraient liés en partie à un

défaut d'apport qualitatif et quantitatif en protéines mais également à une moindre activation de la protéine kinase S6K1 par le repas. Une activation du système ubiquitine protéasome-dépendant plus une augmentation de l'expression de FoxO ont été reportées au niveau du muscle des sujets âgés (Machida et al., 2004 ; Giresi et al., 2003). Sur la base de ces données, incluant la période particulière du vieillissement mais aussi la phase de croissance, on peut donc s'interroger sur l'impact de l'âge de l'animal ou du sujet sur les modifications métaboliques enregistrées. Il semble important de prendre ce facteur en considération pour pouvoir optimiser les stratégies alimentaires et/ou d'élevage.

4. Conséquences en termes de stratégies nutritionnelles et/ou pratiques d'élevage

Le modèle d'AS tel que testé dans l'étude 2 ne permet pas, à un instant donné, un apport nutritionnel adéquat. Pourtant, les poulets sont capables de valoriser les régimes déséquilibrés et de maintenir leur croissance. Quelles sont les limites de ce système d'alimentation séquentielle ? Nous n'avons pas la réponse mais il est essentiel de creuser les mécanismes d'adaptation métaboliques sous-jacents, afin de mieux adapter l'alimentation des poulets de chair (intérêt en aviculture) et explorer le concept de chrononutrition (applicable potentiellement beaucoup plus largement).

Il est connu que la régulation nutritionnelle du métabolisme, si elle inclut l'effet des quantités ingérées et de la composition du régime, dépend aussi du rythme d'apport des nutriments (Walrand & Boirie, 2005 ; Hocquette et al., 2007). Par exemple, l'ingestion de 80% des besoins protéiques au cours d'un seul repas en comparaison à un apport étalé sur la journée augmente l'efficacité de la rétention azotée chez la femme âgée (Arnal et al., 1999, 2000). De même, la synchronisation ou non des apports en nutriments au sein de la journée peut modifier le métabolisme énergétique de l'animal (Van den Borne et al., 2006). Le fait d'utiliser un rythme alimentaire plutôt qu'un autre, de cibler un apport en certains nutriments à des moments particuliers, comme ceux les plus pertinents de la journée, dépend certainement du stade physiologique (âge, animal en production…). Par exemple, chez la poule pondeuse, on peut pratiquer un programme d'AS avec une distribution du blé entier le matin et d'un complément l'après-midi. Le complément permet en particulier un apport en calcium au moment de la formation de la coquille. De plus, une amélioration des performances avec un bénéfice notable en termes d'efficacité alimentaire a été observée. Ceci peut s'expliquer principalement par l'apport fractionné de l'aliment mais également par le fait

de fournir du blé entier agissant sur les capacités digestives des poulets (voir thèse de Umar Faruk, 2010).

Les altérations métaboliques au chaud, associées à des modifications hormonales suggèrent des mécanismes d'adaptation environnementale assez complexes et posent certaines questions. Les modifications métaboliques observées au chaud sont elles efficaces pour une adaptation de l'animal à la chaleur ? Sont-elles alors compatibles avec un maintien des performances de croissance ? Faut-il alors se tourner vers des solutions génétiques (animaux résistants mieux à la chaleur) ou vers des solutions d'acclimatation précoces qui permettent d'améliorer la thermotolérance de l'animal ? Peut-on adapter et changer les systèmes d'alimentation au chaud ? Par exemple, l'alimentation séquentielle pourrait être utilisée pour compenser les effets négatifs d'un climat chaud chez le poulet de chair. Lozano et al. (2006) ont testé un programme d'AS qui permet de moins consommer un aliment pendant la journée, en distribuant le maïs concassé, et une forte consommation le soir en distribuant un aliment commercial. Cependant, l'utilisation d'un aliment enrichi en acides aminés pendant la nuit s'avère indispensable (Lozano et al., 2006).

En conclusion, les études entreprises au cours de ma thèse ont permis de mettre en évidence certains mécanismes impliqués dans la régulation environnementale de la synthèse et de la dégradation des protéines. Nos résultats suggèrent une forte altération de la protéosynthèse musculaire au chaud. La distribution séquentielle de régimes alimentaires de compositions différentes induit au niveau du muscle *Pectoralis m ajor* de poulet des régulations considérables de la voie de signalisation mTOR/S6K1/S6 impliquée dans le contrôle de la protéosynthèse (au moins pour les régimes variant par leur teneur en protéines). De manière intéressante, nous montrons que les ubiquitine ligases MuRF1 et atrogin-1 sont sensibles aux variations journalières d'apports alimentaires, pouvant contribuer aux modifications à court-terme de la protéolyse. Ceci indique également une régulation à court-terme de l'équilibre protéosynthèse/protéolyse, dont les mécanismes et les limites restent à caractériser.

Nos travaux ont apporté des données en faveur d'une implication des acides aminés (éventuellement en synergie avec l'insuline) dans la régulation des processus observés. Les mécanismes régulant le dépôt protéique musculaire lorsque les apports quantitatifs et qualitatifs d'acides aminés varient restent cependant mal connus. L'approfondissement de

leur étude permettra certainement de mieux raisonner la supplémentation en acides aminés et plus largement d'innover en matière de stratégies nutritionnelles.

Il apparait essentiel d'explorer dans nos modèles la dimension temps-dépendante. Pour l'alimentation séquentielle en particulier, il faudrait tester une éventuelle adaptation nutritionnelle à plus long-terme, en réalisant des études cinétiques (étude dans la journée et à plusieurs « stades » d'alimentation séquentielle). Il serait aussi intéressant de creuser les implications nutritionnelles de ce type de modèle, en mettant l'accent sur le concept de chrononutrition.

BIBLIOGRAPHIE

A

- **ABRAHAM, RT**. Lysosomal Rag-ulation of mTOR complex 1 activity, *Cell Metab* , 2010, 11(5):341-342.
- **ABRAHAMSON, M., ALVAREZ-FERNANDEZ, M., NATHANSON, C.M.** Cystatins, *Biochem Soc Symp,* 2003, (70):179-199.
- **ADAMS, J.** The proteasome: a suitable antineoplastic target, *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(5):349-360.
- **AHN, S.E., CHOI, J.W., RENGARAJ, D., SEO, H.W., LIM, W., HAN, J.Y., SONG, G.** Increased expression of cysteine cathepsins in ovarian tissue from chickens with ovarian cancer, *Reprod Biol Endocrinol*, 2010, 8:100.
- **AÏN BAZIZ, H.** *Effet d'une température ambiante élevée sur le métabolisme lipidique chez le poulet en croissance*. Thèse Doctorat de l'Université de Tours, Soutenue le 25/03/1996, 147p.
- **AÏN BAZIZ, H., GERAERT, P.A., PADILHA, J.C.F., GUILLAUMIN, S.** Chronic heat exposure enhances fat deposition and modifies muscle and fat partition in broiler carcasses. *Poult Sci*, 1996, 73:1441-1447.
- **ALGIRE, M.A., MAAG, D., LORSCH, J.R.** Pi release from eIF2, not GTP hydrolysis, is the step controlled by start-site selection during eukaryotic translation initiation, *Mol Cell* , 2005, 20(2):251-262.
- **ALNEMRI, E.S., LIVINGSTON, D.J., NICHOLSON, D.W., SALVESEN, G., THORNBERRY, N.A., WONG, W.W., YUAN, J.** Human ICE/CED-3 protease nomenclature, *Cell*, 1996, 87(2):171.
- **ALTAN, O., PABUCCUOGLU, A., ALTAN, A., KONYALIOGLU, S., BAYRAKTAR, H.** Effect of heat stress on oxidative stress, lipid peroxidation and some stress parameters in broilers, *Br Poult Sci*, (2003), 44(4):545-550.
- **ARDEN, K.C.** FoxO: linking new signaling pathways, *Mol Cell*, (2004), 14(4):416-418.
- **ARDLEY, H.C., ROBINSON, P.A.** E3 ubiquitin ligases, *Essays Biochem*, (2005), 41:15-30.
- **ASHMORE, C.R. and DOERR, L.** Comparative aspects of muscle fiber types in different species, *Exp Neurol*, 1971, 31:408-418.
- **ATTAIX, D, TAILLANDIER, D, TEMPARIS, S, LARBAUD, D, AUROUSSEAU, E, COMBARET, L, VOISIN, L.** Regulation of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis in muscle wasting. *Reprod Nutr Dev,* 1994, 34(6):583-597.
- **ATTAIX, D., AUROUSSEAU, E., COMBARET, L., KEE, A., LARBAUD, D., RALLIERE, C., SOUWEINE, B., TAILLANDIER, D., TILIGNAC, T.** Ubiquitin proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle, *Reprod Nutr Dev*, (1998), 38(2):153-165.
- **ATTAIX, D., VENTADOUR, S., CODRAN, A., BECHET, D., TAILLANDIER, D., COMBARET, L.** The ubiquitin-proteasome system and skeletal muscle wasting, *Essays Biochem*, (2005), 41:173-186.
- **ATTAIX, D. and BARACOS, V.E.** MAFbx/Atrogin-1 expression is a poor index of muscle proteolysis, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2010, 13(3):223-224.

B

- **BACKER, J.M.** The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34, *Biochem J,* 2008, 410:1-17.

- **BACOU, F. and VIGNERON, P.** Evolution périnatale des voies métaboliques glycolytiques et oxydatives de divers types de muscles squelettiques du lapin et du poulet, *Ann Biol A nim Biochi Biophys,* 1976, 16:675-686.
- **BAI, X., MA, D., LIU, A., SHEN, X., WANG, Q.J., LIU, Y., JIANG, Y.** Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38, *Science*, 2007, 318(5852):977-980.
- **BAI, X. and JIANG, Y.** Key factors in mTOR regulation, *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(2):239-253.
- **BALAGE, M., SINAUD, S., PROD'HOMME, M., DARDEVET, D., VARY, T.C., KIMBALL, S.R., JEFFERSON, L.S., GRIZARD, J.** Amino acids and insulin are both required to regulate assembly of the eIF4E. eIF4G complex in rat skeletal muscle, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001, 281(3):E565-574.
- **BALAGE, M., DUPONT, J., MOTHE-SATNEY, I., TESSERAUD, S., MOSONI, L., DARDEVET, D.** Leucine supplementation in rats induced a delay in muscle IR/PI3K signaling pathway associated with overall impaired glucose tolerance, *J Nutr Biochem*, 2011, 22(3):219-226.
- **BALLIF, B.A., ROUX, P.P., GERBER, S.A., MACKEIGAN, J.P., BLENIS, J., GYGI, S.P.** Quantitative phosphorylation profiling of the ERK/p90 ribosomal S6 kinase-signaling cassette and its targets, the tuberous sclerosis tumor suppressors, *Proc Natl Acad Sci U S A* , 2005, 102(3):667-672.
- **BAPTISTA, I.L., LEAL, M.L., ARTIOLI, G.G., AOKI, M.S., FIAMONCINI, J., TURRI, A.O., CURI, R., MIYABARA, E.H., MORISCOT, A.S.** Leucine attenuates skeletal muscle wasting via inhibition of ubiquitin ligases, *Muscle Nerve*, 2010, 41(6):800-888.
- **BARNARD, E.A.., LYLES, J.M., PIZZEY, J.A.,** Fibre types in chicken skeletal muscles and their changes in muscular dystrophy, *J Physiol*, 1982, 331:333-354.
- **BARNES, D.M., CALVERT, C.C., KLASING, K.C.** Methionine deficiency decreases protein accretion and synthesis but not tRNA acylation in muscles of chicks, *J Nutr,* 1995, 125(10):2623-2630.
- **BARTOLI, M. and RICHARD, I.** Calpains in muscle wasting, *Int J Bi ochem Cell Biol* , 2005, 37:2115-2133.
- **BÉCHET, D.M., FERRARA, M.J., MORDIER, S.B., ROUX, M.P., DEVAL, C.D., OBLED, A.** Expression of lysosomal cathepsin B during calf myoblast-myotube differentiation, Characterization of a cDNA encoding bovine cathepsin B. *J Biol Chem*, 1991, 266(21):14104-14112.
- **BÉCHET, D.M., DEVAL, C., ROBELIN, J., FERRARA, M.J., OBLED, A.** Developmental control of cathepsin B expression in bovine fetal muscles, *Arch Biochem Biophys* , 1996, 334(2):362-368.
- **BECHET, D., TASSA, A., TAILLANDIER, D., COMBARET L., ATTAIX D.** Lysosomal proteolysis in skeletal muscle, *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37(10):2098-2114.
- **BEDRANI, L., BERRI, C., GRASTEAU, S., JEGO, Y., YAHAV, S., EVERAERT, N., JLALI, M., JOUBERT, R., MÉTAYER-COUSTARD, S., PRAUD, C., TEMIM, S., TESSERAUD, S., COLLIN, A.** Effects of embryo thermal conditioning on thermotolerance, parameters of meat quality and muscle energy metabolism in heavy line of chicken. In: Proceedings of the 4th Workshop on Fundamental Physiology and Prenatal Development in Poultry, *WPSA; Bratislava, Slovak Republic,* 10-12/09/2009.
- **BERGER, E.M. and WOODWARD, M.P.** Small heat shock proteins in Drosophila may confer thermal tolerance. *Exp Cell Res*, 1983, 147:437-442.
- **BERLANGA, J.J., SANTOYO, J., DE HARO, C.** Characterization of a mammalian homolog of the GCN2 eukaryotic initiation factor 2alpha kinase, *Eur J Biochem*, 1999, 265(2):754-762.

- **BERLANGA, J.J., RIVERO, D., MARTÍN, R., HERRERO, S., MORENO, S., DE HARO, C.** Role of mitogen-activated protein kinase Sty1 in regulation of eukaryotic initiation factor 2alpha kinases in response to environmental stress in Schizosaccharomyces pombe, *Eukaryot Cell,* 2010, 9(1):194-207.
- **BERNABUCCI, U., RONCHI, B., LACETERA, N., NARDONE, A.** Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season, *J Dairy Sci*, 2002, 85(9):2173-2179.
- **BERRI, C., WACRENIER, N., MILLET, N., LE BIHAN-DUVAL, E.** Effect of selection for improved body composition on muscle and meat characteristics of broilers from experimental and commercial lines, *Poult Sci*, 2001, 80(7):833-838.
- **BERRI, C. and DUCLOS, M.** Typologie et ontogenèse des fibres musculaires chez les oiseaux, *INRA Prod Anim,* 2003, 16 (2):137-142.
- **BHASKAR, P.T. and HAY, N.** The two TORCs and Akt, *Dev Cell*, 2007, 12(4):487-502.
- **BIGOT, K., TAOUIS, M., TESSERAUD, S.** Refeeding and insulin regulate S6K1 activity in chicken skeletal muscles, *J Nutr*, 2003, 133(2):369-373.
- **BIONDI, R.M., KIELOCH, A., CURRIE, R.A., DEAK, M., ALESSI, D.R.** The PIF-binding pocket in PDK1 is essential for activation of S6K and SGK, but not PKB, *EMBO J*, 2001, 20(16):4380-4390.
- **BLOMMAART, E.F., LUIKEN, J.J., MEIJER, A.J.** Autophagic proteolysis:control and specificity, *Histochem,* 1997, 29(5):365-385.
- **BOCHTLER, M., DITZEL, L., GROLL, M., HARTMANN, C., HUBER, R.** The proteasome, *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1999, 28:295-317.
- **BODINE, S.C., LATRES, E., BAUMHUETER, S., LAI, V.K., NUNEZ, L., CLARKE, B.A. POUEYMIROU, W.T., PANARO, F.J., NA, E., DHARMARAJAN, K., PAN, Z.Q., VALENZUELA, D.M., DECHIARA, T.M., STITT, T.N., YANCOPOULOS, G.D., GLASS, D.J.** Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy, *Science*, 2001, 294:1704-1708.
- **BOGIN, E., AVIDAR, Y., PECH-WAFFENSCHMIDT, V., DORON, Y., ISRAELI, B.A., KEVKHAYEV, E.** The relationship between heat stress, survivability and blood composition of the domestic chicken, *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1996, 34(6):463-469.
- **BOIRIE, Y., GUILLET, C., ZANGARELLI, A., GRYSON, C., WELRAND, S.** Deterioration of protein metabolism during ageing. *Nutr clini métab,* 2005, 19:138-142.
- **BOIRIE, Y., GUILLET, C., CANO, N., WALRAND, S.** Signaux anaboliques et optimisation du métabolisme musculaire, *Nutr clini métab*, 2009, 23:72-75.
- **BOLSTER, D.R., JEFFERSON, L.S., KIMBALL, S.R.** Regulation of protein synthesis associated with skeletal muscle hypertrophy by insulin-, amino acidand exercise-induced signalling, *Proc Nutr Soc*, 2004, 63:351-356.
- **BROOKE, M.H. and KAISER, K.K.** Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol*, 1970, 23:369-379.
- **BROWN, E.J., ALBERS, M.W., SHIN, T.B., ICHIKAWA, K., KEITH, C.T., LANE, W.S., SCHREIBER, S.L.** A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex, *Nature*, 1994, 369(6483):756-758.
- **BRUHAT, A., CHÉRASSE, Y., CHAVEROUX, C., MAURIN, A.C., JOUSSE, C., FAFOURNOUX, P.** Amino acids as regulators of gene expression in mammals: molecular mechanisms, *Biofactors,* 2009, 35(3):249-257.

- **BRUNET, A., BONNI, A., ZIGMOND, M.J., LIN, M.Z., JUO, P., HU, L.S., ANDERSON, M.J., ARDEN, K.C., BLENIS, J., GREENBERG, M.E.** Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor, *Cell*, 1999, 96(6):857-868.
- **BRUNET, A.** Les multiples actions des facteurs de transcription FOXO, *Med Sci* , 2004, 20(10):856-859.
- **BRUNN, G.J., HUDSON, C.C., SEKULIĆ, A., WILLIAMS, J.M., HOSOI, H., HOUGHTON, P.J., LAWRENCE, J.C. JR., ABRAHAM, R.T.** Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin, *Science,* 1997, 277(5322):99-101.
- **BUYSE, J., ADELSOHN, D.S., DECUYPERE, E., SCANES, C.G.** Diurnal-nocturnal changes in food intake, gut storage of ingesta, food transit time and metabolism in growing broiler chickens: a model for temporal control of energy balance, *Br Poult Sci*, 1993, 34(4):699-709.
- **BYFIELD, M.P., MURRAY, J.T., BACKER, J.M.** hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase, *J Biol Chem*, 2005, 280(38):33076-33082.

C

- **CANTLEY, L.C.** The phosphoinositide 3-kinase pathway, *Science,* 2002, 296 (5573):1655–1657.
- **CAO, P.R., KIM, H.J., LECKER, S.H.** Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting, *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37:2088-2097.
- **CAPEAU, J.** Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance, *Med Sci* , 2003, 19(8-9):834-839.
- **CENTNER, T., YANO, J., KIMURA, E., MCELHINNY, A.S., PELIN, K., WITT, C.C., BANG, M.L., TROMBITAS, K., GRANZIER, H., GREGORIO, C.C., SORIMACHI, H., LABEIT, S.** Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain, *J Mol Biol*, 2001, 306(4):717-726.
- **CHANCE, B., SIES, H., BOVERIS, A.** Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol Rev*, 1979, 59(3):527-605.
- **CHEN, Z.J. and SUN, L.J.** Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling, *Mol Cell,* 2009, 33(3):275-286.
- **CLARK, K.A., MCELHINNY, A.S., BECKERLE, M.C., GREGORIO, C.C.** Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function, *Annu Rev Cell Dev Biol* , 2002, 18:637-706.
- **CLAVEL, S., COLDEFY, A.S., KURKDJIAN, E., SALLES, J., MARGARITIS, I., DERIJARD, B.** Atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1 are up-regulated in aged rat Tibialis Anterior muscle, *Mech Ageing Dev*, 2006, 127(10):794-801.
- **COLLIN, A., VAN MILGEN, J., DUBOIS, S., NOBLET, J.** Effect of high temperature and feeding level on energy utilization in piglets, *J Anim Sci*, 2001, 79(7):1849-1857.
- **COLLIN, A., VAZ, M.J., LE DIVIDICH, J.** Effects of high temperature on body temperature and hormonal adjustments in piglets, *Reprod Nutr Dev*, 2002, 42(1):45-53.
- **COLLIN, A., CASSY, S., BUYSE, J., DECUYPERE, E., DAMON, M.** Potential involvement of mammalian and avian uncoupling proteins in the thermogenic effect of thyroid hormones, *Dom Anim Endocrinol*, 2005a, 29(1):78-87.
- **COLLIN, A., PICARD, M., YAHAV, S.** The effect of duration of thermal manipulation during broiler chick embryogenesis on body weight and body temperature of post-hatched chicks, *Anim Res*, 2005b, 54:105-111.

- **COLLIN, A., SWENNEN, Q., SKIBA-CASSY, S., BUYSE, J., CHARTRIN, P., LE BIHAN-DUVAL, E., CROCHET, S., DUCLOS, M.J., JOUBERT, R., DECUYPERE, E., TESSERAUD, S.** Regulation of fatty acid oxidation in chicken (Gallus gallus): interactions between genotype and diet composition, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2009, 153(2):171-177.
- **COMBARET, L., DARDEVET, D., RIEU, I., POUCH, M.N., BÉCHET, D., TAILLANDIER, D., GRIZARD, J., ATTAIX, D.** A leucine-supplemented diet restores the defective postprandial inhibition of proteasome-dependent proteolysis in aged rat skeletal muscle, *J Physiol*, 2005, 569:489-499.
- **CONDE-AGUILERA, J. A., BAREA, R., LE FLOC'H, N., LEFAUCHEUR, L., VAN MILGEN, J.** A sulfur amino acid deficiency changes the amino acid composition of body protein in piglets, *Animal*, 2010, 4(8):1349-1358.
- **COOPER, M. and WASHBURN, K.** The relationships of body temperature to weight gain, feed consumption and feed utilization in broilers under heat stress, *Poult Sci*, 1998, 77:237-242.
- **COUX, O., TANAKA, K., GOLDBERG, A.L.** Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes, *Annu Rev Biochem*, 1996, 65:801-847.
- **COUX, O. and PIECHACZYK, M.** Le système ubiquitine/protéasome : un ensemble (de) complexe(s) pour dégrader les protéines, *Med Sci*, 2000, 16:623-629.
- **COTTIN, P., THOMPSON, V.F., SATHE, S.K., SZPACENKO, A., GOLL, D.E.** Autolysis of u- and m-calpain from bovine skeletal muscle, *Biol Chem*, 2001, 382(5):767-776.
- **CRAMB, G. and LANGSLOW, D.R.** The endocrine pancreas: control of secretions and actions of the hormones. In: *physiology and biochemistry of the domestic fowl. Academic Press in London, New York: FREEMAN, B.M.,* 1984, 5:94-124.
- **CRISCUOLO, F., GONZALEZ-BARROSO MDEL, M., LE MAHO, Y., RICQUIER, D., BOUILLAUD, F.** Avian uncoupling protein expressed in yeast mitochondria prevents endogenous free radical damage, *Proc Biol Sci*, 2005, 272(1565):803-810.
- **CROALL, D.E. and DEMARTINO, G.N.** Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function and regulation, *Physiol Rev*, 1991, 71(3):813-847.
- **CROW, M.T. and STOCKDALE, F.E.** Myosin expression and specialization among the earliest muscle fibers of the developing avian limb, *Dev Biol*, 1986, 113(1):238-254.
- **CSIBI, A.,** *Pivotal role of the eukaryotic initiation factor eIF3f in the antagonism atrophy/hypertrophy of skeletal muscles.* Thèse doctorat de l'université Montpellier II, soutenue le 09/12/2009, 252p.
- **CSIBI, A., LEIBOVITCH, M.P., CORNILLE, K., TINTIGNAC, L.A., LEIBOVITCH, S.A.** MAFbx/Atrogin-1 controls the activity of the initiation factor eIF3-f in skeletal muscle atrophy by targeting multiple C-terminal lysines, *J Biol Chem*, 2009, 284(7):4413-4421.
- **CSIBI, A., CORNILLE, K., LEIBOVITCH, M.P., POUPON, A., TINTIGNAC, L.A., SANCHEZ, A.M., LEIBOVITCH, S.A.** The translation regulatory subunit eIF3f controls the kinase-dependent mTOR signaling required for muscle differentiation and hypertrophy in mouse, *PLoS One*, 2010, 5(2):e8994.

D

- **DARDEVET, D., SORNET, C., TAILLANDIER, D., SAVARY, I., ATTAIX, D., GRIZARD, J.** Sensitivity and protein turnover response to glucocorticoids are different in skeletal muscle from adult and old rats. Lack of regulation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in aging, *J Clin Invest*, 1995, 96(5):2113-2119.

- **DARDEVET, D., SORNET, C., VARY, T., GRIZARD, J.** 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,* 1996, 137:4087-4094.
- **DARDEVET, D., SORNET, C., BAYLE, G., PRUGNAUD, J., POUYET, C., GRIZARD, J.** Postprandial stimulation of muscle protein synthesis in old rats can be restored by a leucine-supplemented meal, *J Nutr,* 2002, 132(1):95-100.
- **DAVIS, T.A., SURYAWAN, A., ORELLANA, R.A., NGUYEN, H.V., FIOROTTO, M.L.** Postnatal ontogeny of skeletal muscle protein synthesis in pigs, *J Anim Sci* , 2008, 86(14 Suppl):E13-8.
- **DE BASILIO, V. and PICARD, M.** La capacité de survie des poulets à un « coup de chaleur » est augmentée par une exposition précoce à une température élevée, *INRA P rod Anim* , 2002, 15:235-245.
- **DECUYPERE, E., HERMANS, S.C., MICHELS, H., KÜHN, E.R., VERHEYEN, J.** Thermoregulatory response and thyroid hormone concentrations after cold exposure in young chicks treated with iopanoic acid and saline, *Adv Physiol Sci*, 1981, 33:291-298.
- **DEEB, N. and CAHANER, A.** Genotype-by-environment interaction with broiler genotypes differing in growth rate. 3. Growth rate and water consumption of broiler progeny from weight-selected versus non-selected parents under normal and high ambient temperatures, *Poult Sci*, 2002, 81:293-301.
- **DEHOUX, M., VAN BENEDEN, R., PASKO, N., LAUSE, P., VERNIERS, J., UNDERWOOD, L., KETELSLEGERS, J.M., THISSEN, J.P.** Role of the insulin-like growth factor I decline in the induction of atrogin-1/MAFbx during fasting and diabetes, *Endocrinology*, 2004, 145(11):4806-4812.
- **DE MEYTS, P.** Insulin and its receptor: structure, function and evolution, *Bioessays,* 2004, 26 (12):1351-1362.
- **DE PALMA, L., MARINELLI, M., PAVAN, M., ORAZI, A.** Ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx in human skeletal muscle atrophy. *Joint Bone Spine*, 2007, 75(1):53-57.
- **DE PALMA, L., MARINELLI, M., PAVAN, M., ORAZI, A.** Ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx in human skeletal muscle atrophy, *Joint Bone Spine*, 2008, 75(1):53-57.
- **DESHMUKH, A., SALEHZADEH, F., METAYER-COUSTARD, S., FAHLMAN, R., NAIR, K.S., AL-KHALILI, L.** Post-transcriptional gene silencing of ribosomal protein S6 kinase 1 restores insulin action in leucine-treated skeletal muscle, *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(8):1457-1466.
- **DEVER, T.E.** Gene-specific regulation by general translation factorsj, *Cell,* (2002), 108(4):545-556.
- **DU, J., WANG, X., MIERELES, C., BAILEY, J.L., DEBIGARE, R., ZHENG, B., PRICE, S.R., MITCH, W.E.** Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions, *J Clin Invest*, 2004, 113(1):115-123.
- **DUCHÊNE, S., MÉTAYER, S., AUDOUIN, E., BIGOT, K., DUPONT, J., TESSERAUD, S.** Refeeding and insulin activate the AKT/p70S6 kinase pathway without affecting IRS1 tyrosine phosphorylation in chicken muscle, *Domest Anim Endocrinol*, 2008a, 34(1):1-13.
- **DUCHÊNE, S., AUDOUIN, E., BERRI, C., DUPONT, J., TESSERAUD, S.** Tissue-specific regulation of S6K1 by insulin in chickens divergently selected for growth, *Gen Com p Endocrinol,* 2008b, 156(1):190-198.
- **DUNLOP, E.A. and TEE, A.R.** Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms, *Cell Signal*, 2009, 21(6):827-835.

- **DUNLOP, E.A., DODD, K.M., SEYMOUR, L.A., TEE, A.R.** Mammalian target of rapamycin complex 1-mediated phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 requires multiple protein-protein interactions for substrate recognition, *Cell Signal* , 2009, 21(7):1073-1084.
- **DUPONT, J., DEROUET, M., SIMON, J., TAOUIS, M.** Effect of nutritional state on the formation of a complex involving insulin receptor IRS-1, the 52 kDa Src homology/collagen protein (Shc) isoform and phosphatidylinositol 3'-kinase activity, *Biochem J*, 1998a, 335:293-300.
- **DUPONT, J., DEROUET, M., SIMON, J., TAOUIS, M.** Nutritional state regulates insulin receptor and IRS-1 phosphorylation and expression in chicken, *Am J Physiol*, 1998b, 274(2 Pt 1):E309-316.
- **DUPONT, J., CHEN, J., DEROUET, M., SIMON, J., LECLERCQ, B., TAOUIS, M.** Metabolic differences between genetically lean and fat chickens are partly attributed to the alteration of insulin signaling in liver, *J Nutr*, 1999a, 129:1937-1944.
- **DUPONT, J., DEROUET, M., SIMON, J., TAOUIS, M.** Corticosterone alters insulin signaling in chicken muscle and liver at different steps, *J Endocrinol*, 1999b, 162:67–76.
- **DUPONT, J., DAGOU, C., DEROUET, M., SIMON, J., TAOUIS, M.** Early steps of insulin receptor signaling in chicken and rat: apparent refractoriness in chicken muscle, *Domest Anim Endocrinol*, 2004, 26:127-142.
- **DUPONT, J., FROMENT, P., RAMÉ, C., PIERRE, P., COYRAL-CASTEL, S., CHABROLLE, C.** Role of the fatty acids in ovarian functions: involvement of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) and adipokines. *Gynecol Obstet Fertil* , 2008, 36(12):1230-1238.
- **DUPONT, J., TESSERAUD, S., SIMON J.** Insulin signaling in chicken liver and muscle, *Gen Comp Endocrinol*, 2009, 163(1-2):52-57.

E

- **EBISUI, C., TSUJINAKA, T., MORIMOTO, T., FUJITA, J., OGAWA, A., ISHIDOH, K., KOMINAMI, E., TANAKA, K., MONDEN, M.** Changes of proteasomes and cathepsins activities and their expression during differentiation of C2C12 myoblasts, *J Biochem*, 1995, 117(5):1088-1094.
- **ECKHART, L., BALLAUN, C., UTHMAN, A., KITTEL, C., STICHENWIRTH, M., BUCHBERGER, M., FISCHER, H., SIPOS, W., TSCHACHLER, E.** Identification and characterization of a novel mammalian caspase with proapoptotic activity, *J Biol Chem*, 2005, 280(42):35077-35080.
- **EDSTRÖM, E., ALTUN, M., HÄGGLUND, M., ULFHAKE, B.** Atrogin-1/MAFbx and MuRF1 are downregulated in aging-related loss of skeletal muscle, *J Gerontol A Bi ol Sci M ed Sci*, 2006, 61:663-674.
- **ELLIS, H.M. and HORVITZ, H.R.** Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans, *Cell*, 1986, 44(6):817-829.
- **ENGELMAN, J.A., LUO, J., CANTLEY, L.C.** The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism, *Nat Rev Genet*, 2006, 7(8):606-619.
- **EVANGELISTA, A.M., RAO, V.S., FILO, A.R., MAROZKINA, N.V., DOCTOR, A., JONES, D.R., GASTON, B., GUILFORD, W.H.** Direct regulation of striated muscle myosins by nitric oxide and endogenous nitrosothiols, *PLoS One,* 2010, 5(6):e11209.

- **EVERAERT, N., SWENNEN, Q., COUSTARD, S.M., WILLEMSEN, H., CAREGHI, C., BUYSE, J., BRUGGEMAN, V., DECUYPERE, E., TESSERAUD, S.** The effect of the protein level in a pre-starter diet on the post-hatch performance and activation of ribosomal protein S6 kinase in muscle of neonatal broilers, *Br J Nutr*, 2010, 103(2):206-211.

F

- **FADDEN, P., HAYSTEAD, T.A., LAWRENCE, J.C. Jr.** Identification of phosphorylation sites in the translational regulator, PHAS-I, that are controlled by insulin and rapamycin in rat adipocytes, *J Biol Chem*, 1997, 272(15):10240-10247.
- **FALASCA, M., HUGHES, W.E., DOMINGUEZ, V., SALA, G., FOSTIRA, F., FANG, M.Q., CAZZOLLI, R., SHEPHERD, P.R., JAMES, D.E., MAFFUCCI, T.** The role of phosphoinositide 3-kinase C2alpha in insulin signaling, *J Biol Chem* , 2007, 282(38):28226-28236.
- **FANG, Y., VILELLA-BACH, M., BACHMANN, R., FLANIGAN, A., CHEN, J.** Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling, *Science,* 2001, 294:1942-1945.
- **FEDER, M.E. and HOFMANN, G.E.** Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology, *Annu Rev Physiol,* 1999, 61:243-282.
- **FIELITZ, J., KIM, M.S., SHELTON, J.M., LATIF, S., SPENCER, J.A., GLASS, D.J., RICHARDSON, J.A., BASSEL-DUBY, R., OLSON, E.N.** Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle RING finger 1 and 3, *J Clin Invest*, 2007, 117(9):2486-2495.
- **FINK, A.L.** Chaperone-mediated protein folding, *Physiol Rev*, 1999, 79(2):425-449.
- **FINDLAY, G.M., YAN, L., PROCTER, J., MIEULET, V., LAMB, R.F.** A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signalling, *Biochem J,* 2007, 403(1):13-20.
- **FOSTER, F.M., TRAER, C.J., ABRAHAM, S.M., FRY, M.J.** The phosphoinositide (PI) 3-kinase family, *J Cell Sci*, 2003, 116:3037-3040.
- **FOSTER, K.G. and FINGAR, D.C.** Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony, *J Biol Chem*, 2010, 285(19):14071-14077.
- **FOSTER, K.G., ACOSTA-JAQUEZ, H.A., ROMEO, Y., EKIM, B., SOLIMAN, G.A., CARRIERE, A., ROUX, P.P., BALLIF, B.A., FINGAR, D.C.** Regulation of mTOR complex 1 (mTORC1) by raptor Ser863 and multisite phosphorylation, *J Biol Chem* , 2010, 285(1):80-94.
- **FRANCH, H.A. and PRICE, S.R.** Molecular signaling pathways regulating muscle proteolysis during atrophy, *Curr Opin Clin Nutr Metab*, 2005, Care 8:271-275.
- **FRANK, J.W., ESCOBAR, J., SURYAWAN, A., KIMBALL, S.R., NGUYEN, H.V., JEFFERSON, L.S., DAVIS, T.A.** Protein synthesis and translation initiation factor activation in neonatal pigs fed increasing levels of dietary protein, *J Nutr*, 2005, 135(6):1374-1381.
- **FRANK, J.W., ESCOBAR, J., SURYAWAN, A., NGUYEN, H.V., KIMBALL, S.R., JEFFERSON, L.S., DAVIS, T.A.** Dietary protein and lactose increase translation initiation factor activation and tissue protein synthesis in neonatal pigs, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006, 290(2):E225-233.
- **FRANKE, T.F., KAPLAN, D.R., CANTLEY, L.C.** PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis, *Cell*. (1997), 88(4):435-437.

- **FREEMAN, B.** Body temperature and thermoregulation. In: *Physio Biochem Domes Fowl*. (1987), Academic Press, London, 4:365-377.
- **FRIAS, M.A., THOREEN, C.C., JAFFE, J.D., SCHRODER, W., SCULLEY, T., CARR, S.A., SABATINI, D.M.** mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s, *Curr Biol*, 2006, 16(18):1865-1870.
- **FROST, R.A., NYSTROM, G.J., JEFFERSON, L.S., LANG, C.H.** Hormone, cytokine, and nutritional regulation of sepsis-induced increases in atrogin-1 and MuRF1 in skeletal muscle, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 292(2):E501-512.

G

- **GARLICK, P.J. and GRANT, I.** Amino acid infusion increases the sensitivity of muscle protein synthesis in vivo to insulin. Effect of branched-chain amino acids, *Biochem J* , 1988, 254(2):579-584.
- **GERAERT, P.A.** Climat chaud et coups de chaleur en élevage avicoles : des solutions ? *INRA Prod Anim*. 1991, 4(3):257-267.
- **GÉRAERT, P.A., PADILHA, J.C.F., GUILLAUMIN, S.** Metabolic and endocrine changes induced by chronic exposure in broiler chickens: Growth performance, body composition and energy retention, *Br J Nutr,* 1996a, 75:195-204.
- **GÉRAERT, P.A., PADILHA, J.C.F., GUILLAUMIN, S.** Metabolic and endocrine changes induced by chronic heat exposure in broiler chickens: Biological and endocrinological variables, *Br J Nutr*, 1996b, 75:205-216.
- **GINGRAS, A.C., KENNEDY, S.G., O'LEARY, M.A., SONENBERG, N., HAY, N.** 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway, *Genes Dev*, 1998, 12(4):502-513.
- **GINGRAS, A.C., GYGI, S.P., RAUGHT, B., POLAKIEWICZ, R.D., ABRAHAM, R.T., HOEKSTRA, M.F., AEBERSOLD, R., SONENBERG, N.** Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism, *Genes Dev*, 1999, 13(11):1422-1437.
- **GINGRAS, A.C., RAUGHT, B., GYGI, S.P., NIEDZWIECKA, A., MIRON, M., BURLEY, S.K., POLAKIEWICZ, R.D., WYSLOUCH-CIESZYNSKA, A., EBERSOLD, R., SONENBERG, N.** Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1, *Genes Dev*, 2001, 15(21):2852-2864.
- **GLASS, DJ.** Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy, *Nat Cell Biol*. 2003, 5:87-90.
- **GLASS, D.J.** Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways, *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37:1974-1984.
- **GOBERTHAN, D.C.I., and WILSONC, C.** PTEN: Tumor suppressor, multifunctional growth regulator and more. *Hum. Mol. Genet*, 2003, 12: 239-248.
- **GOGLIA, F., SILVESTRI, E., LANNI, A.** Thyroid hormones and mitochondria, *Biosci Rep* , 2002, 22(1):17-32.
- **Goldspink, G. and Yang, S.Y.** Muscle structure, development and growth. In: *Poultry Meat Science*. Poultry Science Symposium Series (Richardson RI and Mead CG eds.), 1999, 3-18.
- **GOLL, D.E., THOMPSON, V.F., LI, H., WEI, W., CONG, J.** The calpain system, *Physiol Rev*, 2003, 83(3):731-801.
- **GOLL, D.E., NETI, G., MARES, S.W., THOMPSON, V.F.** Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains, *J Anim Sci*, 2008, 86(14 Suppl):E19-35.

- **GOMES, M.D., LECKER, S.H., JAGOE, R.T., NAVON, A., GOLDBERG, A.L.** Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy, *Proc Natl Acad Sc i*. (2001). 98:14440-14445.
- **GREENE, M.W., SAKAUE, H., WANG, L., ALESSI, D.R., ROTH, R.A.** Modulation of insulin-stimulated degradation of human insulin receptor substrate-1 by serine 312 phosphorylation, *J Biol Chem,* 2003, 278:8199–8211.
- **GREER, E.L. and BRUNET, A.** FOXO transcription factors in ageing and cancer, *Acta Physiol* (Oxf). 2008, 192(1):19-28.
- **GRIZARD, J., DARDEVET, D., PAPET, I., MOSONI, L., PATUREAU-MIRAND, P., ATTAIX, D., TAUVERON, I., BONIN, D., ARNAL, M.** Nutrient regulation of skeletal muscle protein metabolism in animals. The involvement of hormones and substrates, *Nutr Research Rev*, 1995, 8:67-91.
- **GRIZARD, J., DARDEVET, D., BALAGE, M., LARBAUD, D., SINAUD, S., SAVARY, I., GRZELKOWSKA, K., ROCHON, C., TAUVERON, I., OBLED, C.** Insulin action on skeletal muscle protein metabolism during catabolic states, *Reprod Nutr Dev*, 1999, 39(1):61-74.
- **GUAL, P., LE MARCHAND-BRUSTEL, Y., TANTI, J.F.** Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation, *Biochimie*, 2005, 87(1):99-109.
- **GUERTIN, D.A., STEVENS, D.M., THOREEN, C.C., BURDS, A.A., KALAANY, N.Y., MOFFAT, J., BROWN, M., FITZGERALD, K.J., SABATINI D.M.** Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1, *Dev Cell*, 2006, 11(6):859-871.
- **GUIBERT, J.M.** Alimentation des pondeuses en climat chaud : volailles de Tunisie, *Bulletin d'Information en Aviculture,* 2005, 35, 2p.
- **GULATI, P., GASPERS, L.D., DANN, S.G., JOAQUIN, M., NOBUKUNI, T., NATT, F., KOZMA, S.C., THOMAS, A.P., THOMAS, G.** Amino acids activate mTOR complex 1 via Ca2+/CaM signaling to hVps34, *Cell Metab*, 2008, 7(5):456-465.
- **GUO, F. and CAVENER, D.R.** The GCN2 eIF2alpha kinase regulates fatty-acid homeostasis in the liver during deprivation of an essential amino acid, *Cell Metab*, 2007, 5(2):103-114.
- **GUROFF G.** A neutral calcium activated proteinase from the soluble fraction of rat brain, *J Biol Chem*, 1964, 239:149-155.
- **GUSTAFSON, T.A., HE, W., CRAPARO, A., SCHAUB, C.D., O'NEILL, T.J.** Phosphotyrosine-dependent interaction of SHC and insulin receptor substrate 1 with the NPEY motif of the insulin receptor via a novel non-SH2 domain, *Mol Cell Biol* , 1995, 15(5):2500-2508.

H

- **HAJDUCH, E., LITHERLAND, G.J., HUNDAL, H.S.** Protein kinase B (PKB/Akt)--a key regulator of glucose transport? *FEBS Lett,* 2001, 492(3):199-203.
- **HANADA, M., FENG, J., HEMMINGS, B.A.** Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target, *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1697(1-2):3-16.
- **HANDSCHIN, C. and SPIEGELMAN, BM.** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism, *Endocr Rev* , 2006, 27(7):728-735.

- **HARA, K., MARUKI, Y., LONG, X., YOSHINO, K., OSHIRO, N., HIDAYAT, S., TOKUNAGA, C., AVRUCH, J., YONEZAWA, K.** Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action, *Cell,* 2002, 110(2):177-189.
- **HARDING, H.P., ZHANG,Y., ZENG, H., NOVOA, I., LU, P.D., CALFON, M., SADRI, N., YUN, C., POPKO, B., PAULES, R., STOJDL, D.F., BELL, J.C., HETTMANN, T., LEIDEN, J.M., RON, D.** An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress, *Mol Cell,* 2003, 11(3):619-63.
- **HAVENSTEIN, G.B., FERKET, P.R., QURESHI, M.A.** Carcass composition and yield of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets, *Poult Sci* , 2003, 82:1509-1518.
- **HAY, N. and SONENBERG, N.** Upstream and downstream of mTOR, *Genes Dev* , 2004, 18(16):1926-1945.
- **HEINEMEYER, W., FISCHER, M., KRIMMER, T., STACHON, U., WOLF, D.H.** The Active Sites of the Eukaryotic 20S Proteasome and Their Involvement in Subunit Precursor Processing, *J Biol Chem,* 1997, *272*(40):25200-25209.
- **HELLIWELL, S.B., WAGNER, P., KUNZ, J., DEUTER-REINHARD, M., HENRIQUEZ, R., HALL, M.N.** TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast, *Mol Biol Cell*, 1994, 5(1):105-118.
- **HERNANDEZ, G., ALTMANN, M., LASKO, P.** Origins and evolution of the mechanisms regulating translation initiation in eukaryotes, *Trends Biochem Sci,* 2010, 35(2):63-73.
- **HERNINGTYAS, E.H., OKIMURA, Y., HANDAYANINGSIH, A.E., YAMAMOTO, D., MAKI, T., IIDA, K., TAKAHASHI, Y., KAJI, H., CHIHARA K.** Branched-chain amino acids and arginine suppress MaFbx/atrogin-1 mRNA expression via mTOR pathway in C2C12 cell line, *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1780(10):1115-1120.
- **HOCQUETTE, J.F., TESSERAUD, S., CASSAR-MALEK, I., CHILLIARD, Y., ORTIGUES-MARTY, I.** Responses to nutrients in farm animals: implications for production and quality, *Animal*, 2007, 1(9):1297–1313.
- **HOLZ, M.K., BALLIF, B.A., GYGI, S.P., BLENIS, J.** mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events, *Cell*, 2005, 123(4):569-580.
- **HORTON, H. ROBERT, M.A.L., OCHS RAYMOND, S., RAWN, J., SCRIMGEOUR, K.** Principles of biochemistry*, Third Edition*, 1992, A Pearson Company ed. 2002.
- **HOWIE, J.A., TOLKAMP, B.J., AVENDANO, S., KYRIAZAKIS, I.** A novel flexible method to split feeding behaviour into bouts, *Appl Anim Behav Sc,* 2008, 116:101-109.
- **HU, Z., LEE, I.H., WANG, X., SHENG, H., ZHANG, L., DU, J., MITCH, W.E.** PTEN expression contributes to the regulation of muscle degradation in diabetes, *Diabetes*, 2007, 56:2449-2456.
- **HUANG, J. and FORSBERG, N.E.** Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation, *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 95(21):12100-12105.
- **HUANG, S. and HOUGHTON, P.** Mechanisms of resistance to rapamycins, *Drug Resist Updat*, 2001, 4(6):378-391.

I

- **IJIRI, D, KANAI, Y, HIRABAYASHI, M.** Possible roles of myostatin and PGC-1alpha in the increase of skeletal muscle and transformation of fiber type in cold-exposed chicks:

expression of myostatin and PGC-1alpha in chicks exposed to cold, *Domest Anim Endocrinol*, 2009, 37(1):12-22.

- **INOKI, K., LI, Y., ZHU, T., WU, J., GUAN, K.L.** TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling, *Nat Cell Biol*, 2002, 4(9):648-657.
- **INOKI, K. and GUAN, K.L.** Tuberous sclerosis complex, implication from a rare genetic disease to common cancer treatment *Hum Mol Genet*, 2009, 18(R1):R94-100.

J

- **JACINTO, E., LOEWITH, R., SCHMIDT, A., LIN, S., RÜEGG, M.A., HALL, A., HALL, M.N.** Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive, *Nat Cell Biol*, 2004, 6(11):1122-1128.
- **JAGOE, R.T., REDFERN, C.P., ROBERTS, R.G., GIBSON, G.J., GOODSHIP, T.H.** Skeletal muscle mRNA levels for cathepsin B, but not components of the ubiquitin-proteasome pathway, are increased in patients with lung cancer referred for thoracotomy, *Clin Sci (Lond)*, 2002, 102(3):353-361.
- **JEFFERSON, L.S. AND KIMBALL, S.R**. Amino acids as regulators of gene expression at the level of mRNA translation, *J Nutr*, 2003, 133(6 Suppl 1):2046S-2051S.

K

- **KAMEI, Y., MIZUKAMI, J., MIURA, S., SUZUKI, M., TAKAHASHI, N., KAWADA, T., TANIGUCHI, T., EZAKI, O.** A forkhead transcription factor FKHR up-regulates lipoprotein lipase expression in skeletal muscle, *FEBS Lett,* 2003, 536(1-3):232-236.
- **KATO, H., OKUBO, Y., MATSUMURA, Y., ROBERTS, C.T. J.R., SUGAHARA, K., LEROITH, D.** The tyrosine kinase activity of the chicken insulin receptor is similar to that of the human insulin receptor, *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(4):903-906.
- **KEDAR, V., MCDONOUGH, H., ARYA, R., LI, H.H., ROCKMAN, H.A., PATTERSON, C.** Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(52):18135-18140.
- **KEE, A.J., COMBARET, L., TILIGNAC, T., SOUWEINE, B., AUROUSSEAU, E., DALLE, M., TAILLANDIER, D., ATTAIX, D.** Ubiquitin-proteasome-dependent muscle proteolysis responds slowly to insulin release and refeeding in starved rats, *J Physiol*, 2003, 546:765-776.
- **KETTELHUT, I.C., WING, S.S., GOLDBERG, A.L.** Endocrine regulation of protein breakdown in skeletal muscle, *Diabetes Metab Rev*, 1988, 4(8):751-772.
- **KIM, E., GORAKSHA-HICKS, P., LI, L., NEUFELD, T.P., GUAN, K.L.** Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response, *Nat Cell Biol*, 2008, 10(8):935-945.
- **KIM, D.H., SARBASSOV, D.D., ALI, S.M., KING, J.E., LATEK, R.R., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., SABATINI, D.M.** mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery, *Cell*, 2002, 110(2):163-175.
- **KIMBALL, S.R., KARINCH, A.M., FELDHOFF, R.C., MELLOR, H., JEFFERSON, L.S.** Purification and characterization of eukaryotic translational initiation factor eIF-2B from liver, *Biochim Biophys Acta,* 1994, 1201(3):473-481.
- **KIMBALL, S.R., FARRELL, P.A., JEFFERSON, L.S.** Invited Review: Role of insulin in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by amino acids or exercise, *J Appl Physiol*, 2002, 93(3):1168-1180.

- **KIMBALL, S.R. and JEFFERSON, L.S.** Regulation of global and specific mRNA translation by oral administration of branched-chain amino acids, *Biochem Biophys Res Commun,* 2004, 313(2):423-427.
- **KINO, K. and OKUMURA, J.** Improvement of body weight and nitrogen balance of chicks fed histidine-free or lysine-free diets with supplementation of graded levels of sulfur-containing amino acids, *Poult Sci*, 1986, 65(9):1736-1740.
- **KIRSCHKE, H., and BARRETT, A.J.** Cathepsin L, a lysosomal cysteine proteinase, *Prog Clin Biol Res,* 1985, 180:61-69.
- **KITA, K., MURAMATSU, T., OKUMURA, J.** Effect of dietary protein and energy intakes on whole-body protein turnover and its contribution to heat production in chicks, *Br J Nutr,* 1993, 69(3):681-688.
- **KOK, K., GEERING, B., VANHAESEBROECK, B.** Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease, *Trends Biochem Sci*, 2009, 34(3):115-127.
- **KOPS, G.J., DANSEN, T.B., POLDERMAN, P.E., SAARLOOS, I., WIRTZ, K.W., COFFER, P.J., HUANG, T.T., BOS, J.L., MEDEMA, R.H., BURGERING, B.M.** (2002). Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress, *Nature,* 419(6904):316-321.
- **KOVACINA, K.S., PARK, G.Y., BAE, S.S., GUZZETTA, A.W., SCHAEFER, E., BIRNBAUM, M.J., ROTH, R.A.** Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner, *J Biol Chem,* 2003, 278(12):10189-10194.
- **KOYAMA, S., HATA, S., WITT, C.C., ONO, Y., LERCHE, S., OJIMA, K., CHIBA, T., DOI, N., KITAMURA, F., TANAKA, K., ABE, K., WITT, S.H., RYBIN V., GASCH, A., FRANZ, T., LABEIT, S., SORIMACHI, H.** Muscle RING-finger protein-1 (MuRF1) as a connector of muscle energy metabolism and protein synthesis, *J Mol Biol*, 2007, 376(5):1224-1236.
- **KOZAK, M.** The scanning model for translation: an update, *J Cell Biol*, 1989, 108(2):229-241.
- **KWIATKOWSKI, D.J. and MANNING, B.D.** Tuberous sclerosis: a GAP at the crossroads of multiple signaling pathways, *Hum Mol Genet,* 2005, 14 Spec No. 2:R251-258.

L

- **LAGIRAND-CANTALOUBE, J., OFFNER, N., CSIBI, A., LEIBOVITCH, M.P., BATONNET-PICHON, S., TINTIGNAC, L.A., SEGURA, C.T., LEIBOVITCH, S.A.** The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy, *EMBO J*, 2008, 27(8):1266-1276.
- **LAGIRAND-CANTALOUBE, J., CORNILLE, K., CSIBI, A., BATONNET-PICHON, S., LEIBOVITCH, M.P., LEIBOVITCH, S.A.** Inhibition of atrogin-1/MAFbx mediated MyoD proteolysis prevents skeletal muscle atrophy in vivo, *PLoS One*, 2009, 4(3):e4973.
- **LAPLANTE, M. and SABATINI, D.M.** mTOR signaling at a glance, *J Cell Sci*, 2009, 122(Pt 20):3589-3594.
- **LARBAUD, D., DEBRAS, E., TAILLANDIER, D., SAMUELS, S.E., TEMPARIS, S., CHAMPREDON, C., GRIZARD, J., ATTAIX, D.** Euglycemic hyperinsulinemia and hyperaminoacidemia decrease skeletal muscle ubiquitin mRNA in goats, *Am J Physiol*, 1996, 271(3 Pt 1):E505-512.
- **LATRES, E., AMINI, A.R., AMINI, A.A., GRIFFITHS, J., MARTIN, F.J., WEI, Y., LIN, H.C., YANCOPOULOS, G.D., GLASS, D.J.** Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely

regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway, *J Biol Chem*, 2005, 280:2737-2744.

- **LE BIHAN-DUVAL, E., MILLET, N., REMIGNON, H.** Broiler meat quality: effect of selection for increased carcass quality and estimates of genetic parameters, *Poult Sci*, 1999, 78(6):822-826.
- **LE BIHAN-DUVAL, E., BERRI, C., BAEZA, E., MILLET, N., BEAUMONT, C.** Estimation of the Genetic Parameters of Meat Characteristics and of their Genetic Correlations with Growth and Body Composition in an Experimental Broiler Line, *Poultry Sci,* 2001, 80:839-843.
- **LECKER, S.H., JAGOE, R.T., GILBERT, A., GOMES, M., BARACOS, V., BAILEY, J., PRICE, S.R., MITCH W.E., GOLDBERG AL.** Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression, *FASEB J*, 2004, 18(1):39-51.
- **LECLERCQ, B., GUY, G., RUDEAUX, F.** Thyroid hormones in genetically lean or fat chickens: effects of age and triiodothyronine supplementation, *Reprod Nutr Develop*, 1988, 28:931-937.
- **LECLERCQ, B., HERMIER, D., GUY, G.** Metabolism of very low density lipoproteins in genetically lean or fat lines of chickens *Reprod Nutr Develop* 1990, 30:701-715.
- **LÉCUREUIL, C., TESSERAUD, S., KARA, E., MARTINAT, N., SOW, A., FONTAINE, I., GAUTHIER, C., REITER, E., GUILLOU, F., CRÉPIEUX, P.** Follicle-stimulating hormone activates p70 ribosomal protein S6 kinase by protein kinase A-mediated dephosphorylation of Thr 421/Ser 424 in primary Sertoli cells, *Mol Endocrinol* , 2005, 19(7):1812-1820.
- **LEE, H.L., SANTÉ-LHOUTELLIER, V., VIGOUROUX, S., BRIAND, Y., BRIAND, M.** Calpain specificity and expression in chicken tissues, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2007, 146(1):88-93.
- **LEE, M.Y., JO, S.D., LEE, J.H., HAN, H.J.** L-leucine increases [3H]-thymidine incorporation in chicken hepatocytes: involvement of the PKC, PI3K/Akt, ERK1/2, and mTOR signaling pathways, *J Cell Biochem*, 2008, 105(6):1410-1419.
- **LEEVERS, S.J., VANHAESEBROECK, B., WATERFIELD, M.D.** Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage, *Curr Opin Cell Biol*, 1999, 11(2):219-225.
- **LI, H.H., KEDAR, V., ZHANG, C., MCDONOUGH, H., ARYA, R., WANG, D.Z., PATTERSON, C.** Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex, *J Clin Invest* , 2004, 114(8):1058-1071.
- **LIN, H., DECUYPERE, E., BUYSE, J.** Oxidative stress induced by corticosterone administration in broiler chickens (Gallus gallus domesticus) 2. Short-term effect, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2004, 139(4):745-751.
- **LIN, H., DECUYPERE, E., BUYSE, J.** Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens, *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2006, 144(1):11-17.
- **LIN, K., DORMAN, J.B., RODAN, A., KENYON, C.** An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of Caenorhabditis elegans, *Science,* 1997, 278: 1319-1322.
- **LINDMO, K. and STENMARK, H.** Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases, *J Cell Sci*, 2006, 119(Pt 4):605-614.
- **LOBLEY, G.E.** Nutritional and hormonal control of muscle and peripheral tissue metabolism in farm species, *Livestock Prod Sci*, 1998, 56(2):91-114.

- **LOBLEY, G.E., BREMNER, D.M., NIETO, R., OBITSU, T., MOORE, A.H., BROWN, D.S.** 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*, 1998, 80(4):371-379.
- **LODITH, H. BERK, A., MATSUDAIRA, P., KAISER, C.A., KRIEGER, M., SCOTT, M.P., ZIPURSKY, S.L., DARNELL, J.** *Biologie molé culaire de la cellule* , 2005, Louvain-la-Neuve, Belgique.
- **LOUARD, R.J., BHUSHAN, R., GELFAND, R.A., BARRETT, E.J., SHERWIN, R.S.** Glucocorticoids antagonize insulin's antiproteolytic action on skeletal muscle in humans, *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 79(1):278-284.
- **LUTHER, P.K.** The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling, *J Muscle Res Cell Motil*, 2009, 30(5-6):171-185.

M

- **MA, X.M. and BLENIS, J.** Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(5):307-318.
- **MACLEOD, M.G.** Energy and nitrogen intake, expenditure and retention at 32 degrees in growing fowl given diets with a wide range of energy and protein contents, *Br J Nutr*, 1992, 67(2):195-206.
- **MACQUEEN, D.J., DELBRIDGE, M.L., MANTHRI, S., JOHNSTON, I.A.** A newly classified vertebrate calpain protease, directly ancestral to CAPN1 and 2, episodically evolved a restricted physiological function in placental mammals, *Mol Bi ol Evol* , 2010, 27(8):1886-1902.
- **MAMMUCARI, C., SCHIAFFINO, S., SANDRI, M.** Downstream of Akt: FoxO3 and mTOR in the regulation of autophagy in skeletal muscle, *Autophagy*, 2008, 4(4):524-526.
- **MAROUN, C.R., NAUJOKAS, M.A., HOLGADO-MADRUGA, M., WONG, A.J., PARK, M.** The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for sustained activation of extracellular signal-regulated kinase and epithelial morphogenesis downstream from the met receptor tyrosine kinase, *Mol Cell Biol*, 2000, 20(22):8513-8525.
- **MATHEWS, M. B.** Lost in translation, *Trends Biochem Sci*, 2002, 27(5):267-269.
- **MAURIN, A.C., JOUSSE, C., AVEROUS, J., PARRY, L., BRUHAT, A., CHERASSE, Y., ZENG, H., ZHANG, Y., HARDING, H.P., RON, D., FAFOURNOUX, P.** The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores, *Cell Metab*, 2005, 1(4):273-277.
- **MAZÈRES, G., LELOUP, L., DAURY, L., COTTIN, P., BRUSTIS, J.J.** Myoblast attachment and spreading are regulated by different patterns by ubiquitous calpains, *Cell Motil Cytoskeleton*, 2006, 63(4):193-207.
- **MCELHINNY, A.S., KAKINUMA, K., SORIMACHI, H., LABEIT, S., GREGORIO, C.C.** Muscle-specific RING finger-1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein-1, *J Cell Biol*, 2002, 157(1):125-136.
- **MCELHINNY, A.S., KAZMIERSKI, S.T., LABEIT, S., GREGORIO, C.C.** Nebulin: the nebulous, multifunctional giant of striated muscle, *Trends Cardiovasc Med*, 2003, 13(5):195-201.
- **MCMORRIS, T., SWAIN, J., SMITH, M., CORBETT, J., DELVES, S., SALE, C., HARRIS, R.C., POTTER, J.** Heat stress, plasma concentrations of adrenaline, noradrenaline, 5-

hydroxytryptamine and cortisol, mood state and cognitive performance, *Int J Psychophysiol*, 2006, 61(2):204-215.

- **MÉTAYER, S., SEILIEZ, I., COLLIN, A., DUCHÊNE, S., MERCIER, Y., GERAERT, P.A., TESSERAUD, S.** Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status, *J Nutr Biochem*, 2008, 19(4):207-215.
- **MILLWARD, D.J.** Metabolic demands for amino acids and the human dietary requirement: Millward and rRvers (1988) revisited, *J Nutr*, 1998, 128:2563S-2576S.
- **MILLWARD, D.J.** Optimal intakes of protein in the human diet, *Proc Nutr Soc,* 1999, 58(2):403-413.
- **MIZUSHIMA, N. and KLIONSKY, D.J.** Protein turnover via autophagy: implications for metabolism, *Annu Rev Nutr*, 2007, 27:19-40.
- **MOGK, A., SCHMIDT, R., BUKAU, B.** The N-end rule pathway for regulated proteolysis: prokaryotic and eukaryotic strategies, *Trends Cell Biol*, 2007, 17(4):165-172.
- **MOSONI, L., VALLUY, M.C., SERRURIER, B., PRUGNAUD, J., OBLED, C., GUEZENNEC, C.Y.** Altered response of protein synthesis to nutritional state and endurance training in old rats, *Am J Physiol*, 1995, 268:E328-E335.
- **MOYEN, C., GOUDENEGE, S., POUSSARD, S., SASSI, A.H., BRUSTIS, J.J., COTTIN, P.** Involvement of micro-calpain (CAPN 1) in muscle cell differentiation, *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(4):728-743.
- **MOZO, J., EMRE, Y., BOUILLAUD, F, RICQUIER, D, CRISCUOLO, F.** Thermoregulation: what role for UCPs in mammals and birds? *Biosci Rep*, 2005, 25(3-4):227-249.
- **MROSEK, M., LABEIT, D., WITT, S., HEERKLOTZ, H., VON CASTELMUR, E., LABEIT, S., MAYANS, O.** Molecular determinants for the recruitment of the ubiquitin-ligase MuRF-1 onto M-line titin, *FASEB J,* 2007, 21(7):1383-1392.
- **MUJAHID, A., SATO, K., AKIBA, Y., TOYOMIZU, M.** Acute heat stress stimulates mitochondrial superoxide production in broiler skeletal muscle, possibly via downregulation of uncoupling protein content, *Poult Sci*, 2006, 85(7):1259-1265.
- **MURAMATSU, T., KITA, K., TASAKI, I., OKUMURA, J. Influence of dietary protein intake on whole-body protein turnover in chicks**, *Br Poult Sci*, 1987, 28(3):471-482.
- **MURAMATSU, T.** Nutrition and whole-body protein turnover in the chicken in relation to mammalian species, *Nutr Res Rev*, 1990, 3:211-228.
- **MUSNIER, A., HEITZLER, D., BOULO, T., TESSERAUD, S., DURAND, G., LÉCUREUIL, C., GUILLOU, H., POUPON, A., REITER, E., CRÉPIEUX, P.** Developmental regulation of p70 S6 kinase by a G protein-coupled receptor dynamically modelized in primary cells, *Cell Mol Life Sci,* 2009, 66(21):3487-3503.

N

- **NADER, G.A.** Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together, *Int J Biochem Cel Biol*, 2005, 37:1985-1996.
- **NAGASAWA, T., KIDO, T., YOSHIZAWA, F., ITO, Y., NISHIZAWA, N.**. Rapid suppression of protein degradation in skeletal muscle after oral feeding of leucine in rats, *J Nutr Biochem*, 2002, 13:121-127.
- **NAÏMI, M. and VAN OBBERGHEN, E.** Nuclear FoxO1 as a bridge between metabolism and mitogenesis. *Med Sci (Paris),*(2008, 24(6-7):635-639.

- **NAKASHIMA, K., YAKABE, Y., YAMAZAKI, M., ABE, H.** Effects of fasting and refeeding on expression of atrogin-1 and Akt/FOXO signaling pathway in skeletal muscle of chicks, *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70:2775-2778.
- **NAKASHIMA, K., YAKABE, Y., ISHIDA, A., YAMAZAKI, M., ABE, H.** Suppression of myofibrillar proteolysis in chick skeletal muscles by alpha-ketoisocaproate, *Amino Acids* , 2007, 33(3):499-503.
- **NAPOLIONI, V and CURATOLO, P.** Genetics and molecular biology of tuberous sclerosis complex, *Curr Genomics*. 2008, 9(7):475-487.
- **NAVÉ, B.T., OUWENS, M., WITHERS, D.J., ALESSI, D.R., SHEPHERD, P.R.** Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation, *Biochem J*, 1999, 344:427-431.
- **NETI, G., NOVAK, S.M., THOMPSON, V.F., GOLL, D.E.** Properties of easily releasable myofilaments: are they the first step in myofibrillar protein turnover? *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 296(6):C1383-1390.
- **NIKAWA, T., ISHIDOH, K., HIRASAKA, K., ISHIHARA, I., IKEMOTO, M., KANO, M., KOMINAMI, E., NONAKA, I., OGAWA, T., ADAMS, G.R., BALDWIN, K.M., YASUI, N., KISHI, K., TAKEDA, S.** Skeletal muscle gene expression in space-flown rats, *FASEB J*, 2004, 18:522-524.
- **NOBUKUNI, T., JOAQUIN, M., ROCCIO, M., DANN, S.G., KIM, S.Y., GULATI, P., BYFIELD, M.P., BACKER, J.M., NATT, F., BOS, J.L., ZWARTKRUIS, F.J., THOMAS, G.** Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase, *Proc Natl Acad Sci U S A,* 2005, 102(40):14238-14243.
- **NOJIMA, H., TOKUNAGA, C., EGUCHI, S., OSHIRO, N., HIDAYAT, S., YOSHINO, K., HARA, K., TANAKA, N., AVRUCH, J., YONEZAWA, K.** The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif, *J Biol Chem*, 2003, 278(18):15461-1544.

O

- **OHANNA, M., SOBERING, A.K., LAPOINTE, T., LORENZO, L., PRAUD, C., PETROULAKIS, E., SONENBERG, N., KELLY, P.A., SOTIROPOULOS, A., PENDE, M.** Atrophy of S6K1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control, *Nat Cell Biol*, 2005, 7(3):286-294.
- **ORLOWSKI, M., CARDOZO, C., MICHAUD, C.** Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids, *Biochemistry*, 1993, 32(6):1563-1572.

P

- **PADILHA, J.F.C.** Influence de la chaleur sur le métabolisme énergétique et sa régulation chez les poulets en croissance, *Thèse de Doctorat de l'Université de Tours*, 1995, 205 p.
- **PAGEL-LANGENICKEL, I., BAO J., JOSEPH, J.J., SCHWARTZ, D.R., MANTELL, B.S., XU, X., RAGHAVACHARI, N., SACK, M.N.** PGC-1alpha integrates insulin signaling, mitochondrial regulation, and bioenergetic function in skeletal muscle, *J Biol Chem* , 2008, 283(33):22464-22472.

- **PARKER, P.J. and PARKINSON, S.J.** AGC protein kinase phosphorylation and protein kinase C, *Biochem Soc Trans*, 2001, 29(Pt 6):860-863.
- **PATTI, M.E., BUTTE, A.J., CRUNKHORN, S., CUSI, K., BERRIA, R., KASHYAP, S., MIYAZAKI, Y., KOHANE, I., COSTELLO, M., SACCONE, R., LANDAKER, E.J., GOLDFINE, A.B., MUN, E., DEFRONZO, R., FINLAYSON, J., KAHN, C.R., MANDARINO, L.J.** Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1, *Proc Natl Acad Sci U S A* , 2003, 100(14):8466-8471.
- **PAUSE, A., BELSHAM, G.J., GINGRAS, A.C., DONZÉ, O., LIN, T.A., LAWRENCE, J.C., SONENBERG, N.** Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function, 1994, *Nature*. 371(6500):762-767.
- **PAYNE, C.M., STERN, L.Z., CURLESS, R.G., HANNAPEL, L.K.** Ultrastructural fiber typing in normal and diseased human muscle, *J Neurol Sci*, 1975, 25:99-108.
- **PEEL, A.L, RAO, R.V., COTTRELL, B.A., HAYDEN, M.R., ELLERBY, L.M., BREDESEN, D.E.** Double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR, binds preferentially to Huntington's disease (HD) transcripts and is activated in HD tissue, *Hum Mol Genet*, 2001, 10(15):1531-1538.
- **PESTOVA, T.V., BORUKHOV, S.I., HELLEN, C.U.** Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons, *Nature*, 1998, 394(6696):854-859.
- **PETER, J.B., BARNARD, R.J., EDGERTON, V.R., GILLESPIE, C.A., STEMPLE, K.E.** Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits, *Biochemistry,* 1972, 11: 2627-2633.
- **PETERSON, T.R., LAPLANTE, M., THOREEN, C.C., SANCAK, Y., KANG, S.A., KUEHL, W.M., GRAY, N.S., SABATINI, D.M.** DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival, *Cell*, 2009, 137(5):873-886.
- **PETTE, D. and STARON R.S.** Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibres, *Rev Physiol Bioche Pharmacol*, 1990, 116:1-75.
- **PICARD, B., JURIE, C., CASSAR-MALEK, I., HOCQUETTE, J.F.** Typologie et ontogenèse des fibres musculaires chez différentes espèces d'intérêt agronomique, *INRA Prod Anim,* 2003, 16(2): 117-123.
- **PISAREV, A.V., UNBEHAUN, A., HELLEN, C.U., PESTOVA, T.V.** Assembly and analysis of eukaryotic translation initiation complexes, *Methods Enzymol*, 2007, 430:147-177.
- **PUIGSERVER, P.** Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1-alpha, *Int J Obes (Lond),* 2005, 29 Suppl 1:S5-9.
- **PULLEN, N. and THOMAS, G.** The modular phosphorylation and activation of p70s6k, *FEBS Lett*, 1997, 410(1):78-82.

Q

- **QIU, H., DONG, J., HU, C., FRANCKLYN, C.S., HINNEBUSCH, A.G.** The tRNA-binding moiety in GCN2 contains a dimerization domain that interacts with the kinase domain and is required for tRNA binding and kinase activation, *EMBO J,* 2001, 20(6):1425-1438.

R

- **RAMASWAMY, S., NAKAMURA, N., SANSAL, I., BERGERON, L., SELLERS, W.R.** A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR, *Cancer Cell*, 2002, 2(1):81-91.
- **RATHMELL, J.C. and THOMPSON, C.B.** The central effectors of cell death in the immune system, *Annu Rev Immunol*, 1999, 17:781-828.
- **REEDS, P.J. and FULLER, M.F.** Nutrient intake and protein turnover, *Proc Nutr Soc* , 1983, 42(3):463-471.
- **REEDS, P.J. FULLER, M.F., CADENHEAD, A., LOBLEY, G.E., MCDONALD, J.D.** Effects of changes in the intakes of protein and non-protein energy on whole-body protein turnover in growing pigs, *Br J Nutr*, 1981, 45(3):539-546.
- **REYNOLDS, T.H. 4TH, BODINE, S.C., LAWRENCE, J.C. Jr.** Control of Ser2448 phosphorylation in the mammalian target of rapamycin by insulin and skeletal muscle load, *J Biol Chem*, 2002, 277(20):17657-17662.
- **RHOADS, R.E.** Signal transduction pathways that regulate eukaryotic protein synthesis, *J Biol Chem*, 1999, 274(43):30337-30340.
- **RICHARD, P., VILARINO, M., FAURE, J.M., LEON, A., PICARD, M.** Etude du comportement du poulet de chair dans un élevage tropical au Vénézuela, *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays tropicaux*, 1997, 50(1):65-74.
- **ROLLET, E.J., LAVOIE, J., TANGUAY, R.M.** Expression of Drosophila's 27 kDa heat shock protein into rodent cells confers thermal resistance, *Biochem Bi ophys Res Commun* , 1992, 185:116-120.
- **RONCHI, V.P., GIUDICI, A.M., MENDIETA, J.R., CABALLERO, V.J., CHISARI, A.N., SANLLORENTI, P.M., CONDE, R.D.** Oxidative stress in mouse liver caused by dietary amino acid deprivation: protective effect of methionine, *J Physiol Biochem* , 2010, 66(2):93-103.
- **ROOYACKERS, O.E. and NAIR, K.S.** Hormonal regulation of human muscle protein metabolism, *Annu Rev Nutr*, 1997, 17:457-485.
- **ROTONDA, J., NICHOLSON, D.W., FAZIL, K.M., GALLANT, M., GAREAU, Y., LABELLE, M., PETERSON, E.P., RASPER, D.M., RUEL, R., VAILLANCOURT, J.P., THORNBERRY, N.A., BECKER, J.W.** (1996). The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis, *Nat Struct Biol*, 3(7):619-625.
- **ROUX, P.P., BALLIF, B.A., ANJUM, R., GYGI, S.P., BLENIS, J.** Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(37):13489-13494.

S

- **SACHECK, J.M., OHTSUKA, A., MCLARY, S.C., GOLDBERG, A.L.** IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 287(4):E591-601.
- **SACHECK, J.M., HYATT, J.P., RAFFAELLO, A., JAGOE, R.T., ROY, R.R., EDGERTON, V.R., LECKER, S.H., GOLDBERG, A.L.** Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases, *FASEB J*, 2007, 21(1):140-155.
- **SALTIEL, A.R. and KAHN, C.R.** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism, *Nature*, 2001, 414(6865):799-806.

- **SAMUELS, S.E., MCALLISTER, T.A., THOMPSON, J.R.** Skeletal and heart muscle protein turnover during long-term exposure to high environmental temperatures in young rats, *Can J Physiol Pharmacol*, 2000, 78(7):557-564.
- **SANCAK, Y., THOREEN, C.C., PETERSON, T.R., LINDQUIST, R.A., KANG, S.A., SPOONER, E., CARR, S.A., SABATINI, D.M.** PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase, *Mol Cell*, 2007, 25(6):903-915.
- **SANCAK, Y., PETERSON, T.R., SHAUL, Y.D., LINDQUIST, R.A., THOREEN, C.C., BAR-PELED, L., SABATINI, D.M.** The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1, *Science*, 2008, 320(5882):1496-1501.
- **SANCAK, Y. and SABATINI, DM.** Rag proteins regulate amino-acid-induced mTORC1 signalling, *Biochem Soc Trans*, 2009, 37(Pt 1):289-290.
- **SANDOW, A.** Skeletal muscle, *Annu Rev Physiol,* 1970, 32:87-138.
- **SANDRI, M., SANDRI, C., GILBERT, A., SKURK, C., CALABRIA, E., PICARD, A., WALSH, K., SCHIAFFINO, S., LECKER, S.H., GOLDBERG, A.L.** Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy, *Cell*, 2004, 117(3):399-412.
- **SANDRI, M., LIN, J., HANDSCHIN, C., YANG, W., ARANY, Z.P., LECKER, S.H., GOLDBERG, A.L., SPIEGELMAN, B.M.** PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(44):16260-16265.
- **SANTELLA, L., KYOZUKA, K., HOVING, S., MUNCHBACH, M., QUADRONI, M., DAINESE, P., ZAMPARELLI, C., JAMES P., CARAFOLI, E.** Breakdown of cytoskeletal proteins during meiosis of starfish oocytes and proteolysis induced by calpain, *Exp Cell Res*, 2000, 259(1):117-126.
- **SARBASSOV, D., ALI, S., KIM, D., GUERTIN, D., LATEK, R., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., SABATINI, D.** Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton, *Curr Biol*, 2004, 14:1296-1302.
- **SARBASSOV, D., GUERTIN, D., ALI, S., SABATINI, D.** Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex, *Science*, 2005, 307:1098-1101.
- **SAVARY, I., DEBRAS, E., DARDEVET, D., SORNET, C., CAPITAN, P., PRUGNAUD, J., MIRAND, P.P., GRIZARD, J.** Effect of glucocorticoid excess on skeletal muscle and heart protein synthesis in adult and old rats, *Br J Nutr*, 1998, 79(3):297-304.
- **SCHALM, S.S. and BLENIS, J.** Identification of a conserved motif required for mTOR signalin, *Curr Biol*, 2002, 12(8):632-639.
- **SCHOENHEIMER, R.** The dynamic state of body constituents, 1942, Cambridge: Harvard University Press.
- **SCORNIK, O.A., HOWELL, S.K., BOTBOL, E.** Protein depletion and replenishment in mice: different roles of muscle and liver, *Am J Physiol*, 1997, 273:E1158-1167.
- **SEILIEZ, I., PANSERAT, S., SKIBA-CASSY, S., FRICOT, A., VACHOT, C., KAUSHIK, S., TESSERAUD, S.** Feeding status regulates the polyubiquitination step of the ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) muscle, *J Nutr*, 2008, 138(3):487-491.
- **SEILIEZ, I, PANSERAT, S, LANSARD, M, POLAKOF, S, PLAGNES-JUAN, E, SURGET, A, DIAS, K, LARQUIER, M, KAUSHIK, S, SKIBA-CASSY, S**. Dietary carbohydrate-to-protein ratio affects TOR signaling and metabolism-related gene expression in the liver and

muscle of rainbow trout after a single meal, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011, 300(3):R733-743.

- **SEKULIĆ, A., HUDSON, C.C., HOMME, J.L., YIN, P., OTTERNESS, D.M., KARNITZ, L.M., ABRAHAM, R.T.** A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells, *Cancer Res*, 2000, 60(13):3504-3513.
- **SERRANO, K. and DEVINE, D.V.** Vinculin is proteolyzed by calpain during platelet aggregation: 95 kDa cleavage fragment associates with the platelet cytoskeleton, *Cell Motil Cytoskeleton*, 2004, 58(4):242-252.
- **SHABARCHIN, A.A. and TSATURYAN, A.K.** Proposed role of the M-band in sarcomere mechanics and mechano-sensing: a model study, *Biomech Model Mechanobiol*, 2010, 9(2):163-175.
- **SIMON, J., FREYCHET, P., ROSSELIN, G.** A study of insulin binding sites in the chicken tissues, *Diabetologia*, 1977, 13:219-228.
- **SMITH, L.F.** Species variation in the amino acid sequence of insulin, *Am J Med*, 1966, 40:662-666.
- **SMITH, I.J., ALAMDARI, N., O'NEAL, P., GONNELLA, P., AVERSA, Z., HASSELGREN, P.O.** Sepsis increases the expression and activity of the transcription factor Forkhead Box O 1 (FOXO1) in skeletal muscle by a glucocorticoid-dependent mechanism, *Int J Biochem Cell Biol,* 2010, 42(5):701-711.
- **SONENBERG, N. and HINNEBUSCH, A.G.** Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets, *Cell*, 2009, 136(4):731-745.
- **SONG, Y.H., GODARD, M., LI Y., RICHMOND, S.R., ROSENTHAL, N., DELAFONTAINE, P.** Insulin-like growth factor I-mediated skeletal muscle hypertrophy is characterized by increased mTOR-p70S6K signaling without increased Akt phosphorylation, *J Investig Med*, 2005, 53(3):135-142.
- **SORIMACHI, H., KINBARA, K., KIMURA, S., TAKAHASHI, M., ISHIURA, S., SASAGAWA, N., SORIMACHI, N., SHIMADA, H., TAGAWA, K., MARUYAMA, K.** Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94-specific sequence, *J Biol Chem*, 1995, 270(52):31158-31162.
- **STEIN, R.C.** Prospects for phosphoinositide 3-kinase inhibition as a cancer treatment, *Endocr Relat Cancer*, 2001, 8:237-248.
- **STILBORN, H.L., HARRIS, G.C., BOTTJE, W.G., WALDROUP, P.W.** Ascorbic acid and acetylsalic acid (aspirin) in the diet of broilers maintened under stress conditions, *Poult Sci*, 1988, 67:1183-1187.
- **STITT, T.N., DRUJAN, D., CLARKE, B.A., PANARO, F., TIMOFEYVA, Y., KLINE, W.O., GONZALEZ, M., YANCOPOULOS, G.D., GLASS, D.J.** The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors, *Mol Cell*, 2004, 14(3):395-403.
- **SULLIVAN, J.A., SHIRASU, K., DENG, X.W.** The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants, *Nat Rev Genet*, 2003, 4(12):948-958.
- **SUN, Y. and CHEN, J.** mTOR signaling: PLD takes center stage, *Cell Cycle*, 2008, 7(20):3118-3123.
- **SURYAWAN, A. and DAVIS, T.A.** The Abundance and Activation of mTORC1 Regulators in Skeletal Muscle of Neonatal Pigs Are Modulated by Insulin, Amino Acids, and Age, *J Appl Physiol,* 2010, 109(5):1448-1454.

- **SZEWCZYK, N.J. and JACOBSON, L.A.** Signal-transduction networks and the regulation of muscle protein degradation, *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37:1997-2011.

T

- **TAILLANDIER, D, AUROUSSEAU, E, MEYNIAL-DENIS, D, BECHET, D, FERRARA, M, COTTIN, P, DUCASTAING, A, BIGARD, X, GUEZENNEC, CY, SCHMID, HP.** Coordinate activation of lysosomal, Ca 2+-activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle, *Biochem J,* 1996, 316 (Pt1):65-72.
- **TANIGUCHI, CM, EMANUELLI, B, KAHN, CR.** Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(2):85-96.
- **TAO, X., ZHANG, Z.Y., DONG, H., ZHANG, H., XIN, H.** Responses of thyroid tormones of market-size broilers to thermoneutral constant and warm cyclic temperatures, *Poult Sci,* 2006, 85:1520-1528.
- **TAOUIS, M., DEROUET, M., CHEVALIER, B., SIMON, J.** Corticosterone effect on insulin receptor number and kinase activity in chicken muscle and liver, *Gen Comp Endocrinol*, 1993, 89:167-175.
- **TAOUIS, M., DUPONT, J., GILLET, A., DEROUET, M., SIMON, J**Insulin receptor substrate 1 antisense expression in an hepatoma cell line reduces cell proliferation and induces overexpression of the Src homology 2 domain and collagen protein (SHC), *Mol Cell Endocrinol,* 1998, 137(2):177-186.
- **TAUVERON, I., CHARRIER, S., CHAMPREDON, C., BONNET, Y., BERRY, C., BAYLE, G., PRUGNAUD, J., OBLED, C., GRIZARD, J., THIÉBLOT, P.** Response of leucine metabolism to hyperinsulinemia under amino acid replacement in experimental hyperthyroidism, *Am J Physiol*, 1995, 269(3 Pt 1):E499-507.
- **TAWA, N.E., Jr, ODESSEY, R., GOLDBERG, A.L.** Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles, *J Clin Invest,* 1997, 100:197-203.
- **TEMIM, S., CHAGNEAU, A.M., GUILLAUMIN, S., MICHEL, J., PERESSON, R., GERAERT, P.A., TESSERAUD, S.** Effects of chronic heat exposure and protein intake on growth performance, nitrogen retention and muscle development in broiler chickens, *Reprod Nutr Dev*, 1999, 39(1):145-156.
- **TEMIM, S.** Effet de l'exposition chronique à la chaleur et de l'ingéré protéique sur le métabolisme protéique du poulet de chair en finition. *Thèse de doctorat de l'université Aix-Marseille,* soutenue le 10/02/2000.
- **TESSERAUD, S.** Métabolisme protéique chez le poulet en croissance. Effet des protéines alimentaires. *INRA Prod Anim*, 1995, 8:197-212.
- **TESSERAUD, S., PERESSON, R., LOPES, J., CHAGNEAU, A.M.** Dietary lysine deficiency greatly affects muscle and liver protein turnover in growing chickens, *Br J Nutr* , 1996a, 75(6):853-865.
- **TESSERAUD, S., PERESSON, R., CHAGNEAU, A.M**. Age-related changes of protein turnover in specific tissues of the chick, *Poult Sci*, 1996b, 75(5):627-631.
- **TESSERAUD, S., LE BIHAN-DUVAL, E., PERESSON, R., MICHEL, J., CHAGNEAU, A.M.** Response of chick lines selected on carcass quality to dietary lysine supply: live performance and muscle development, *Poult Sci*, 1999, 78(1):80-84.
- **TESSERAUD, S. and TEMIM, S.** Modifications métaboliques chez le poulet de chair en climat chaud : conséquences nutritionnelles, *INRA Prod Anim*, 1999, 12:353-363.

- **TESSERAUD, S., TEMIM, S., LE BIHAN-DUVAL, E., CHAGNEAU, A.M.** Increased responsiveness to dietary lysine deficiency of pectoralis major muscle protein turnover in broilers selected on breast development, *J Anim Sci,* 2001, 79(4):927-933.
- **TESSERAUD, S., BIGOT, K., TAOUIS, M.** Amino acid availability regulates S6K1 and protein synthesis in avian insulin-insensitive QM7 myoblasts, *FEBS Lett*, 2003, 540(1-3):176-180.
- **TESSERAUD, S., ABBAS, M., DUCHENE, S., BIGOT, K., VAUDIN, P., DUPONT, J.** Mechanisms involved in the nutritional regulation of mRNA translation: features of the avian model, *Nutr Res Rev,* 2006, 19(1):104-116.
- **TESSERAUD, S., MÉTAYER, S., DUCHÊNE, S., BIGOT, K., GRIZARD, J., DUPONT, J.** Regulation of protein metabolism by insulin: value of different approaches and animal models. *Domest Anim Endocrinol,* 2007a, 33(2):123-142.
- **TESSERAUD, S., METAYER-COUSTARD, S., BOUSSAID, S., CROCHET, S., AUDOUIN, E., DEROUET, M., SEILIEZ, I.** Insulin and amino acid availability regulate atrogin-1 in avian QT6 cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 2007b, 357(1):181-186.
- **TESSERAUD, S., BOUVAREL, I., COLLIN, A., AUDOUIN, E., CROCHET, S., SEILIEZ, I., LETERRIER, C.** Daily variations in dietary lysine content alter the expression of genes related to proteolysis in chicken pectoralis major muscle, *J Nutr*, 2009a, 139(1):38-43.
- **TESSERAUD, S., MÉTAYER-COUSTARD, S., COLLIN, A., SEILIEZ, I.** Role of sulfur amino acids in controlling nutrient metabolism and cell functions: implications for nutrition, *Br J Nutr*, 2009b, 101(8):1132-1139.
- **THEDIECK, K., POLAK, P., KIM, M.L., MOLLE, K.D., COHEN, A., JENÖ, P., ARRIEUMERLOU, C., HALL, M.N.** PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis, *PLoS One,* 2007, 2(11):e1217.
- **TINTIGNAC, L.A., LAGIRAND, J., BATONNET, S., SIRRI, V., LEIBOVITCH, M.P., LEIBOVITCH, S.A.** Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase, *J Biol Chem*, 2005, 280(4):2847-2856.
- **TRAN, H., BRUNET, A., GRIFFITH, E.C., GREENBERG, M.E.** The many forks in FOXO's road. *Sci STKE*, 2003, (172):RE5.
- **TREMBLAY, F., LAVIGNE, C., JACQUES, H., MARETTE, A.** Defective insulin-induced GLUT4 translocation in skeletal muscle of high fat-fed rats is associated with alterations in both Akt/protein kinase B and atypical protein kinase C (zeta/lambda) activities, *Diabetes*, 2001, 50(8):1901-1910.
- **TREMBLAY, F., JACQUES, H., MARETTE, A.** Modulation of insulin action by dietary proteins and amino acids: role of the mammalian target of rapamycin nutrient sensing pathway, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2005, 8(4):457-462.
- **TREMBLAY, F., BRÛLÉ, S., HEE UM, S., LI, Y., MASUDA, K., RODEN, M., SUN, X.J., KREBS, M., POLAKIEWICZ, R.D., THOMAS, G., MARETTE, A.** Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(35):14056-14061.
- **TYERS, M. and JORGENSEN, P.** Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy, *Curr Opin Genet Dev*, 2000, 10(1):54-64.
- **TZATSOS, A.** Raptor binds the SAIN (Shc and IRS-1 NPXY binding) domain of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) and regulates the phosphorylation of IRS-1 at Ser-636/639 by mTOR, *J Biol Chem*, 2009, 284(34):22525-22534.

U

- **UEDA, M, WATANABE, K, SATO, K, AKIBA, Y, TOYOMIZU, M.** Possible role for avPGC-1alpha in the control of expression of fiber type, along with avUCP and avANT mRNAs in the skeletal muscles of cold-exposed chickens, *FEBS Lett*, 2005, 579(1):11-17.
- **UM, S.H., D'ALESSIO, D., THOMAS, G.** Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1, *Cell Metab*, 2006, 3(6):393-402.
- **UMAR FARUK, M.**, L'évaluation de l'alimentation mélangée et séquentielle à base de matières premières localement disponibles sur les performances des poules pondeuses en France et au Nigeria. *Doctorat de Scien ces de la Vie et de la Santé de l'université François Rabelais de Tours*, soutenue le 25/08/2010.
- **URDANETA-RINCON, M. and LEESON, S.** Muscle (pectoralis major) protein turnover in young broiler chickens fed graded levels of lysine and crude protein, *Poult Sci* , 2004, 83(11):1897-903.

V

- **VAGNER, S., GALY, B., PYRONNET, S.** Irresistible IRES. Attracting the translational machinery to internal ribosome entry sites, *EMBO Rep*, 2001, 2:893-898.
- **VALANCONY, H., BELAINE, L., TAVAREZ, M.** Utilisation d'un système de brumisation haute pression, *Sci tech Avic,* 1999, 27:12-16.
- **VAN DEN BORNE, J.J., VERSTEGEN, M.W., ALFERINK, S.J., GIEBELS, R.M., GERRITS, W.J.** Effects of feeding frequency and feeding level on nutrient utilization in heavy preruminant calves, *J Dairy Sci,* 2006, 89(9):3578-86.
- **VANHAESEBROECK, B., LEEVERS, S.J., PANAYOTOU, G., WATERFIELD, M.D.** Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers, *Trends Biochem Sci,* 1997, 22(7):267-272.
- **VANHAESEBROECK, B. and WATERFIELD, M.D.** Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases*, Exp Cell Res*, 1999, 253:239-254.
- **VANHAESEBROECK, B. and ALESSI, D.R.** The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB, *Biochem J,* 2000, 346 Pt 3:561-576.
- **VIVANCO, I. and SAWYERS, C.L.** The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(7):489-501.
- **VOGES, D., ZWICKL, P., BAUMEISTER, W.** The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis, *Annu Rev Biochem*, 1999, 68:1015-1068.
- **VOLPI, E., LUCIDI, P., CRUCIANI, G., MONACCHIA, F., REBOLDI, G., BRUNETTI, P., BOLLI, G.B., DE FEO, P.** Contribution of amino acids and insulin to protein anabolism during meal absorption, *Diabetes,* 1996, 45(9):1245-1252.
- **VON DER HAAR, T., GROSS, J.D., WAGNER, G., MCCARTHY, J.E.** The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression, *Nat Struct Mol Biol,* 2004, 11(6):503-511.
- **VON LENGERKEN, G., MAAK, S., WICKE. M.** Muscle metabolism and meat quality of bigs and poultry. ISSN 1392-2130, *Veterinarija ir zootechnika,* 2002, 20: 82-86.

W

- **WALLIS, I.R. and BALNAVE, D.** The influence of environmental temperature, age and sex on the digestibility of amino acids in growing broiler chickens, *Br Poult Sci*, 1984, 25:401-407.

- **WANG, S. and EDENS, F.W.** Heat-stress response of broiler cockerels to manipulation of the gonadal steroids, testosterone and estradiol, *Comp Biochem Physiol*, 1993, 106:629-633.
- **WERNER, E.D., BRODSKY, J.L., MCCRACKEN, A.A.** Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate, *Proc Natl Acad Sci U S A,* 1996, 93(24):13797-13801.
- **WOLF, D.H. and HILT, W.** The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal, *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1695(1-3):19-31.
- **WITT, C.C., WITT, S.H., LERCHE, S., LABEIT, D., BACK, W., LABEIT, S.** Cooperative control of striated muscle mass and metabolism by MuRF1 and MuRF2, *EMBO J* , 2008, 27(2):350-360.
- **WRAY, C.J., MAMMEN, J.M., HERSHKO, D.D., HASSELGREN, P.O.** Sepsis upregulates the gene expression of multiple ubiquitin ligases in skeletal muscle, *Int J Biochem Cell Biol* , 2003, 35(5):698-705.
- **WOLFENSON, D.** Blood flow through arteriovenous anastomoses and its thermal function in the laying hen, *J Physiol*, 1983, 334:395-407.
- **WEEKS, C.A., DANBURY, T.D., DAVIES, H.C., HUNT, P., KESTIN, S.C.** The behaviour of broiler chickens and its modification by lameness, *Appl Anim B ehav Sci* , 2000, 67(1-2):111-125.
- **WHITE, M.F.** IRS proteins and the common path to diabetes, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 283:E413-422.
- **WATSON, R.T., KANZAKI, M., PESSIN, J.E.** Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes*, Endocr Rev*, 2004, 25(2):177-204.
- **WELSH, G.I., MIYAMOTO, S., PRICE, N.T., SAFER, B., PROUD, C.G.** T-cell activation leads to rapid stimulation of translation initiation factor eIF2B and inactivation of glycogen synthase kinase-3, *J Biol Chem,* 1996, 271(19):11410-11413.
- **WATT, P.W., CORBETT, M.E., RENNIE, M.J.** Stimulation of protein synthesis in pig skeletal muscle by infusion of amino acids during constant insulin availability, *Am J Physiol* , 1992, 263(3 Pt 1):E453-460.
- **WULLSCHLEGER, S., LOEWITH, R., HALL, M.** TOR signaling in growth and metabolism, *Cell*, 2006, 124 (3):471-484.

X

- **XIONG, Y.L., CANTOR, A.H., PESCATORE, A.J., BLANCHARD, S.P., STRAW, M.L.** Variations in muscle chemical composition, pH, and protein extractability among eight different broiler crosses, *Poult Sci*, 1993, 72(3):583-588.

Y

- **YAHAV, S., GOLDFELD, S., PLAVNIK, I.** Relative humidity during exposure to high ambient temperature, *J Therm Biol*, 1995, 20:245-253.
- **YAHAV, S. and HURWITZ, S.** Induction of thermotolerance in male broiler chickens by temperature conditioning at early age, *Poult Sci*, 1996, 75:402-406.
- **YAMAN, M.A., KITA, K., OKUMURA, J.I.** Various macronutrient intakes additively stimulate protein synthesis in liver and muscle of food-deprived chicks, *J Nutr,* 2000, 130(1):70-76.

- **YAN, L., MIEULET, V., BURGESS, D., FINDLAY, G.M., SULLY, K., PROCTER, J., GORIS, J., JANSSENS, V., MORRICE, N.A., LAMB, R.F.** PP2A T61 epsilon is an inhibitor of MAP4K3 in nutrient signaling to mTOR, *Mol Cell*, 2010, 37(5):633-642.
- **YAN, W., FRANK, C.L., KORTH, M.J., SOPHER, B..L, NOVOA, I., RON, D., KATZE, M.G.** Control of PERK eIF2alpha kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(25):15920-15925.
- **YAN, Y., FLINN, R.J., WU, H., SCHNUR, R.S., BACKER, J.M.** hVps15, but not Ca2+/CaM, is required for the activity and regulation of hVps34 in mammalian cells, *Biochem J,* 2009, 417(3):747-755.
- **YOAKIM, M., HOU, W., SONGYANG, Z., LIU, Y., CANTLEY, L., SCHAFFHAUSEN, B**.Genetic analysis of a phosphatidylinositol 3-kinase SH2 domain reveals determinants of specificity, *Mol Cell Biol*, 1994, 14 (9): 5929-5938.
- **YOSHIZAWA, F., NAGASAWA, T., NISHIZAWA, N., FUNABIKI, R.** Protein synthesis and degradation change rapidly in response to food intake in muscle of food-deprived mic,. *J Nutr*, 1997, 127(6):1156-1159.
- **YOSHIZAWA, F., KIMBALL, S.R., VARY, T.C., JEFFERSON, L.S.** Effect of dietary protein on translation initiation in rat skeletal muscle and liver, *Am J Physiol*, 1998, 275(5 Pt 1):E814-820.
- **YOSHIZAWA, F., SEKIZAWA, H., HIRAYAMA, S., YAMAZAKI, Y., NAGASAWA, T., SUGAHARA, K.** Tissue-specific regulation of 4E-BP1 and S6K1 phosphorylation by alpha-ketoisocaproate, *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo),* 2004, 50(1):56-60.
- **YUAN, J., SHAHAM, S., LEDOUX, S., ELLIS, H.M., HORVITZ, H.R.** The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme, *Cell,* 1993, 75(4):641-652.
- **YUNIANTO, V.D., HAYASHI, K., KANEDA, S., OHTSUKA, A., TOMITA, Y.** Effect of environmental temperature on muscle protein turnover and heat production in tube-fed broiler chickens, *Br J Nutr*, 1997, 77:897-909.

Z

- **ZHANG, P., MCGRATH, B.C., REINERT, J., OLSEN, D.S., LEI, L., GILL, S., WEK, S.A., VATTEM, K.M., WEK, R.C., KIMBALL, S.R., JEFFERSON, L.S., CAVENER, D.R.** The GCN2 eIF2alpha kinase is required for adaptation to amino acid deprivation in mice, *Mol Cell Biol*, 2002, 22(19):6681-6688.
- **ZHAO, J.P., JIAO, H.C., SONG, Z.G., LIN, H.** Effects of L-arginine supplementation on glucose and nitric oxide (NO) levels and activity of NO synthase in corticosterone-challenged broiler chickens (Gallus gallus), *Comp Biochem Physiol C Toxicol Phar macol*, 2009, 150(4):474-480.
- **ZHOU, W. and YAMAMOTO, S.** Effects of environmental temperature and heat production due to food intake on abdominal temperature, shank skin temperature and respiration rate of broilers, *Br Poult Sci*, 1997, 38:107-114.

ANNEXES

Annexe 1

Communication au congrès *XIIIth European Poultry Conference, August 23-27, 2010.*

Daily Variations in Dietary Protein and Energy Content Regulate Protein Metabolism in Chicken Skeletal Muscle

Sourour Boussaid-Om Ezzine[1*], Hamza Mameri[1], Sonia Métayer-Coustard[1], Anne Collin[1], Estelle Cailleau-Audouin[1], Sabine Crochet[1], Anne-Marie Chagneau[1], Isabelle Bouvarel[2,] Iban Seiliez[3], Christine Leterrier[4], Sophie Tesseraud[1]

[1]INRA, UR83 Recherches Avicoles, 37380 Nouzilly, France
[2]ITAVI, 37380 Nouzilly, France
[3]INRA, UMR1067 NuAGe, 64310 St Pée-sur-Nivelle, France
[4]INRA, UMR85 PRC, 37380 Nouzilly, France.

Cyclic feeding programs with daily variations in lysine content modulate the expression of the E3 ubiquitin ligases MAFbx (also called atrogin-1) and MuRF1 in chicken skeletal muscle (Tesseraud *et al.*, 2009). These E3 ligases mediate the ubiquitination of proteins that are then targeted for proteolysis. To further explore the technique of sequential feeding, we used an applied model without altered growth performance (Bouvarel *et al.*, 2008). We thus studied the effects of daily variations in dietary energy [2800 (E-) and 3200 kcal/kg (E+)], protein [230 (P+) and 150 g CP/kg (P-)] or both (E+P- and E-P+) on muscle protein metabolism in 2-week-old male chickens. The *Pectoralis major* muscles were sampled during the third 48h-cycle. Measurements included mRNA expressions (q-PCR) and phosphorylations of proteins involved in the mammalian Target of Rapamycin (mTOR) cascade (Western blot).

Atrogin-1 and MuRF1 expressions were changed by alternation of diets varying in protein (over-expression with P- *vs.* P+) and in energy (under-expression with E+ *vs.* E-). Within mixed diets, the expression of atrogin-1 was regulated (increase in E+P- *vs.* E-P+) but not that of MuRF1. The drastic effect of daily variations in protein content on atrogin-1 expression is consistent with *in vitro* data demonstrating the control of this E3 ligase by amino acids (Tesseraud *et al.*, 2007). Such regulation may involve mTOR, which was more phosphorylated in P+ *vs.* P-, and in E-P+ *vs.* E+P-. The mTOR downstream targets p70S6 kinase (S6K1) and ribosomal proteins S6, known as controlling protein synthesis, were also highly activated by increased protein content (P+

***vs.* P-). The mechanisms coordinating the balance protein synthesis/proteolysis remain to be characterized.**

Abbreviated title: Sequential feeding regulates protein metabolism

Keywords: sequential feeding; proteolysis; signaling; chicken; muscle

Introduction

Protein metabolism is regulated by nutrients such as amino acids and fatty acids (for a review see Hocquette *et al*., 2007). The nutritional regulation of protein metabolism also involves a major factor, i.e. the timing of nutrient delivery. In particular, there is evidence that the timing of protein feeding regulates protein metabolism. For example, protein pulse feeding was shown to improve protein retention in elderly women and to restore stimulation of muscle protein synthesis during the feeding period in old rats (Arnal *et al*., 1999; 2002). Cyclical dietary treatments with daily variations in lysine affected the expression of two important genes controlling the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway, i.e. E3 ubiquitin ligases Muscle Atrophy F box (MAFbx, also called atrogin-1) and Muscle Ring Finger-1 (MuRF1) in chicken muscle (Tesseraud *et al*., 2009). This study supports the contribution of the Forkhead transcription factor (FoxO) signaling in such regulation in agreement with data obtained during muscle atrophy (Sandri *et al*., 2004). The mammalian Target of Rapamycin (mTOR) known as regulating protein synthesis may also participate to the regulation of atrogin-1 (Tesseraud *et al*., 2007; Herningtyas *et al*., 2008). Nevertheless, little is known about the mechanisms controlling the balance protein synthesis/proteolysis in response to cyclical changes in dietary nutrients. The 48h-cycle sequential feeding program with diets varying in protein and energy contents used by Bouvarel *et al*., (2008) represents an interesting model to further explore mechanisms controlling protein synthesis and proteolysis in skeletal muscle of broiler chickens.

Thus, the aim of the present study was to explore the potential changes in protein metabolism and signaling in chickens submitted to sequential feeding with diets varying in protein and energy contents.

Materials and methods

Nine hundred 1-d old male broiler chicks were randomly distributed into 45 pens in conventional environmentally controlled poultry shed at the Poultry Research Centre in Nouzilly, France. The lighting schedule was 24h of light for the first 2 d, 14h light/10h dark from the age of 2 d and was then increased to 16h light/8h dark at the age of 7 d. Environmental temperature was progressively reduced from 32°C to 23°C. Feed was provided *ad libitum*. All the chickens received the same starter diet (2900 kcal ME/kg, 21% CP). From the age of 10 d, chickens were given either control (C) or sequential treatments.

Seven diets were used during the sequential feeding period as previously described (Bouvarel *et al.,* 2008). The control treatment was complete feed C (3000 kcal/kg ME, 19.5% CP). Two diets were isoenergetic with differences in protein and essential amino acid contents: the high-protein diet (P+ = 23.4% CP) and the low-protein diet (P-= 15.6% CP). Two diets were isoproteic with differences in metabolizable energy content: the low-energy feed (E-= 2800 kcal ME/kg) and the high-energy feed (E+= 3200 kcal ME/kg). Two diets had differences in both protein and energy contents: the high-protein and low-energy feed (P+E-) and the low-protein and high-energy feed (P-E+). Sequential feeding was carried out during 48h-cycles. Three sequential feeding treatments were used: 1) alternation of diets varying in crude protein (SP: P+ followed by P-), 2) in energy (SE: E- followed by E+), and 3) in protein and energy contents (SEP: E-P+ followed by E+P-). Since Bouvarel *et al*. (2007) observed a lower feed intake when the cycle started with high-energy feed, the low-energy feed was always given the first day of the cycle to avoid a reduction in the feed intake.

On days 14 and 15, chickens were sacrificed by decapitation. The *Pectoralis major* muscles were removed, quickly ground in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. For analyzing the signaling pathways potentially involved in protein turnover regulation, muscle lysates were subjected to western blotting using the appropriate antibodies. Measurements of mRNA expressions (e.g. atrogin-1 and MuRF1) were carried out by real time PCR after total RNA extraction. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA, Statview) to detect significant intergroup differences. The means were compared by Fisher's least significant difference test in case of a significant effect. $P<0.05$ was considered statistically significant.

Results and discussion

This study was designed to explore the short-term regulation of muscle protein turnover and signaling in response to daily variations in dietary protein and energy contents. The 48h-cycle sequential feeding used here did not modify body weight gain compared to control treatment (40.65 *vs*. 39.65 g/d). This is consistent with previous experiments in which 48h-cycles had no negative effect on growth performance when the consumption of the sequential feeds provided an energy and amino acid intake similar to the control diet (Bouvarel *et al.,* 2004; 2008). There was no difference between treatments in skeletal muscle RNA and protein contents of chickens that were fed the complete diet and the three sequential feeding treatments $S_{P,}$ S_E and S_{EP}. Ribosomal capacity (i.e. protein synthesis capacity related to the number of ribosomes) was not either changed whatever the treatment (17 mg RNA/g protein ± 0.7).

We then investigated the skeletal muscle mRNA expression of two genes related to proteolysis, the E3 ubiquitin ligases atrogin-1 and MuRF1. Atrogin-1 and MuRF1 were over-expressed by 357% and 56%, respectively with low-protein diet (P-) as compared to high-protein diet (P+). They were under-expressed by -63% and -43%, respectively with high-energy diet (E+) as compared to low-energy diet (E-). Within mixed diets, the expression of atrogin-1 was increased by 113% in E+P- *vs.* E-P+ but not that of MuRF1. The drastic effect of daily variations in protein content on atrogin-1 expression is consistent with data demonstrating the control of this E3 ligase by amino acids *in vitro* (Tesseraud *et al.,* 2007; Herningtyas *et al.,* 2008; Bower *et al*., 2010) and *in vivo* (Tesseraud *et al.,* 2009).

Because the transcriptional regulation of atrogin-1 during muscle wasting is controlled by the action of FoxO 1/3 (Sandri *et al.,* 2004), the changes that we observed in atrogin-1 expression may involve the FoxO pathway. However, in our conditions, the phosphorylation of FoxO1 and FoxO3 was only few altered by dietary changes in protein and energy contents. The regulation of atrogin-1 also involves the mTOR pathway (Herningtyas *et al.,* 2008; Tesseraud *et al.,* 2007). mTOR was more phosphorylated with P+ and E-P+ diets as compared to P- and E+P- diets, respectively ($P<0.05$). mTOR phosphorylates the ser/thr ribosomal protein S6 kinase (S6K1) that plays a critical role in controlling mRNA translation into proteins (see Kimball and Jefferson, 2005 for a review). S6K1 and its downstream target ribosomal protein S6 (rpS6) were also highly activated by increased protein content (P+ *vs.* P-) ($P<0.05$).

Conclusion

Forty-eight-hour cycle sequential feeding varying in protein, energy contents, or both did not alter the capacity for muscle protein synthesis (i.e. no change in ribosome content) compared to the control treatment. We demonstrated that the E3 ubiquitin ligases MurF1 and atrogin-1 were regulated by the cyclical dietary treatments, particularly with the alternation of diets varying in protein content. The consequences on the activity of the ubiquitin-proteasome-dependent system need to be determined. Besides, the mTOR/S6K1/rpS6 pathway was regulated in our experimental conditions indicating regulation of the translational process. However, the mechanisms coordinating protein synthesis and proteolysis remain to be characterized. The 48h-cycle sequential feeding represents an interesting model to investigate the metabolic adaptation to variations in dietary protein and energy supplies with the aim to develop new nutritional strategies in poultry.

References

ARNAL, M.A., MOSONI, L., BOIRIE, Y., HOULIER, M.L., MORIN, L., VERDIER, E., RITZ, P., ANTOINE, J.M., PRUGNAUD, J., BEAUFRÈRE, B. and MIRAND, P.P. (1999) Protein pulse feeding improves protein retention in elderly women. *The American Journal of Clinical Nutrition* **69:** 1202-1208.

ARNAL, M.A., MOSONI, L., DARDEVET, D., RIBEYRE, M.C., BAYLE, G., PRUGNAUD, J. and PATUREAU MIRAND, P. (2002) Pulse protein feeding pattern restores stimulation of muscle protein synthesis during the feeding period in old rats. *The Journal of Nutrition* **132:** 1002-1008.

BOUVAREL, I., BARRIER-GUILLOT, B., LARROUDE, P., BOUTTEN, B., LETERRIER, C., MERLET, F., VILARIÑO, M., ROFFIDAL, L., TESSERAUD, S., CASTAING, J. and PICARD M. (2004) Sequential feeding programs for broiler chickens: twenty-four- and forty-eight-hour cycles. *Poultry Science* **83:** 49-60.

BOUVAREL, I., CHAGNEAU, A.M., VILARIÑO, M., JUIN, H., LESCOAT, P., METAYER, J.P., LESSIRE, M., CREPON, K., ETAVE, G., TESSERAUD, S. and LETERRIER, C. (2007) Reactions of Ross chickens to sequential feeding. *XVIth European Symposium on Poultry Nutrition.*

BOUVAREL, I., CHAGNEAU, A.M., LESCOAT, P., TESSERAUD, S. and LETERRIER, C. (2008) Forty-eight-hour cycle sequential feeding with diets varying in

protein and energy contents: adaptation in broilers at different ages. *Poultry Science* **87:** 196-203.

BOWER, N.I., DE LA SERRANA, D.G. and JOHNSTON, I.A. (2010) Characterisation and differential regulation of MAFbx/Atrogin-1 alpha and beta transcripts in skeletal muscle of Atlantic salmon (Salmo salar). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **396:** 265-271.

HERNINGTYAS, E.H., OKIMURA, Y., HANDAYANINGSIH, A.E., YAMAMOTO, D., MAKI, T., IIDA, K., TAKAHASHI, Y., KAJI, H. and CHIHARA, K. (2008) Branched-chain amino acids and arginine suppress MaFbx/atrogin-1 mRNA expression via mTOR pathway in C2C12 cell line. *Biochimica et Biophysica Acta* **1780:** 1115-1120.

HOCQUETTE, J.F., TESSERAUD, S., CASSAR-MALEK, I., CHILLIARD, Y. and ORTIGUES-MARTY, I. (2007) Responses to nutrients in farm animals: implications for production and quality. *Animal* **1:** 1297-1313.

KIMBALL, S.R. and JEFFERSON, L.S. (2005) Role of amino acids in the translational control of protein synthesis in mammals. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **16:** 21-27.

SANDRI, M., SANDRI, C., GILBERT, A., SKURK, C., CALABRIA, E., PICARD, A., WALSH, K., SCHIAFFINO, S., LECKER, S.H. and GOLDBERG, A.L. (2004) Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* **117:** 399-412.

TESSERAUD, S., METAYER-COUSTARD, S., BOUSSAID, S., CROCHET, S., AUDOUIN, E., DEROUET, M. and SEILIEZ, I. (2007) Insulin and amino acid availability regulate atrogin-1 in avian QT6 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **357:** 181-186.

TESSERAUD, S., BOUVAREL, I., COLLIN, A., AUDOUIN, E., CROCHET, S., SEILIEZ, I. and LETERRIER, C. (2009) Daily variations in dietary lysine content alter the expression of genes related to proteolysis in chicken pectoralis major muscle. *The Journal of Nutrition* **139:** 38-43.

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Biochemical and Biophysical Research Communications 357 (2007) 181–186
BBRC
www.elsevier.com/locate/ybbrc

Insulin and amino acid availability regulate atrogin-1 in avian QT6 cells

Sophie Tesseraud [a,*], Sonia Métayer-Coustard [a], Sourour Boussaid [a], Sabine Crochet [a], Estelle Audouin [a], Michel Derouet [a], Iban Seiliez [b]

[a] INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France
[b] INRA, UMR1067 Nutrition Aquaculture et Génomique, F-64310 St Pée-sur-Nivelle, France

Received 15 March 2007
Available online 30 March 2007

Abstract

New evidence has demonstrated that the expression of major genes, termed atrogenes, controls the ubiquitin–proteasome proteolytic pathway. The present work aimed to study the impact of insulin and amino acids on the expression of one of these atrogenes, the E3 ubiquitin ligase Muscle Atrophy F box (MAFbx, also called atrogin-1), in quail muscle (QT6) fibroblasts. First, we characterized atrogin-1 in QT6 cells and demonstrated the insulin sensitivity of these cells. Second, we showed that insulin reduced atrogin-1 mRNA via the phosphatidylinositol-3′kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB or AKT)/target of rapamycin (TOR) pathway. Atrogin-1 expression also depended on the availability of an individual amino acid, i.e., methionine. Moreover, the amino acid-induced reduction of atrogin-1 was inhibited by rapamycin, indicating the involvement of the TOR pathway in such regulation. In conclusion, expression of the ubiquitin ligase atrogin-1 is regulated by both insulin and amino acids through the TOR pathway.
© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Atrogin-1; Insulin; Methionine; AKT/TOR pathway; Avian fibroblasts

Signaling pathways that regulate muscle protein metabolism have been intensively studied in the last 10 years. One of the most explored is the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway, in which TOR integrates signals from nutrients such as amino acids, and mitogenic and growth factors, i.e., insulin/insulin-like growth factors (IGF) [1–7]. The signaling cascade initiated by growth factors is mediated by a complex pathway involving the tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate (IRS) proteins and activation of several intracellular kinases such as phosphatidylinositol-3′kinase (PI3K), protein kinase B (PKB or AKT) and TOR. The amino acid-induced signaling cascade also originates from TOR. The AKT/TOR pathway affects the phosphorylation of some major effectors involved in the regulation of translation initiation, e.g., p70 S6 kinase (S6K1) in mammals as in birds [1,5–9].

The PI3K pathway has been reported to be also involved in the insulin-induced inhibition of muscle proteolysis [10]. New evidence has demonstrated that AKT can regulate the expression of two important genes for controlling the ubiquitin–proteasome proteolytic pathway, i.e., E3 ubiquitin ligases Muscle Atrophy F box (MAFbx, also called atrogin-1) and Muscle Ring Finger-1 (MurRF-1) [11–14]. These two muscle specific E3 ligases have been shown to be overexpressed in atrophic conditions including diabetes, cancer, fasting but also following disuse [15–18]. They are regulated by growth factors such as IGF-1 via mechanisms involving the AKT/Forkhead box-O transcription factors (FOXO) and the AKT/TOR pathways [19–21]. Despite these interesting findings, the mechanisms by which AKT and TOR inhibit proteolysis are not completely understood. Moreover, it has not to date been established whether nutrient signal amino acids can be involved in the regulation of E3 ligases or not. The aim of the present study was therefore to clarify the signal transduction pathway involved in the ubiquitin–proteasome-dependent proteolysis and the potential role of

* Corresponding author. Fax: +33 2 47 42 77 78.
E-mail address: tesserau@tours.inra.fr (S. Tesseraud).

0006-291X/$ - see front matter © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bbrc.2007.03.131

amino acids by exploring the regulation of atrogin-1 in the avian QT6 fibroblasts. The QT6 cell line has been developed by Antin and Ordahl [22] from methylcholanthrene-induced *Pectoralis* fibrosarcomas of Japanese quail *Coturnix coturnix* japonica.

Materials and methods

Chemicals. Anti-phospho-S473 AKT/PKB, anti-phospho-S235/S263 S6, and anti-AKT antibodies, as LY294002 and rapamycin inhibitors were obtained from Cell Signaling Technology (Beverlt, MA, USA). Anti-vinculin and McCoy medium were from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). All culture additives were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) and Eurobio (Les Ulis, Courtaboeuf, France). RPMI media were from Dutscher SA (Brumath, France). Human insulin was from LILLY France S.A.S. (Suresnes, France).

Cell culture and treatments. QT6 fibroblast cells were grown in McCoy medium supplemented with 10% fetal calf serum and 1% chicken serum to 90–100% confluence, fasted 16 h in serum-free medium, washed once with complete RPMI medium and incubated in the same medium for 2 h before treatments (0.1 μM insulin or amino acids). Complete RPMI medium or RPMI medium without methionine was used to test the effect of amino acid availability. In some studies, inhibitory treatments were performed using LY294002 at 20 μM and rapamycin at 25 nM (diluted in DMSO) for 30 min before stimulation by 0.1 μM insulin or amino acids for 5 h. All cultures were performed under a water-saturated atmosphere of 95% air/5% CO_2 at 37 °C.

RNA isolation and RT-PCR. To our knowledge, no information was available on insulin signaling in QT6 fibroblasts. Consequently, we characterized insulin receptor (IR), AKT, and atrogin-1 in these cells. Total RNA was extracted using RNA Now (Biogentec, Seabrook, TX, USA) from QT6 fibroblasts according to the manufacturer's recommendations. 2.5 μg RNA was reverse transcribed using Super Script II RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in the presence of Random Primers (Promega, Charbonnieres-les-Bains, France). The resulting cDNAs were submitted to PCR in the presence of UptiTherm DNA polymerase (Interchim, Montluçon, France) and primers designed to amplify parts of IR, AKT, and atrogin-1 as described in Table 1.

To quantify atrogin-1 mRNA, real-time RT-PCR was performed as previously described [23] using an ABI Prism 7000 apparatus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Atrogin-1 mRNA levels were estimated on the basis of PCR efficiency and threshold cycle (C_t) deviation of an unknown sample versus a control as previously described [23]. Runs were performed in duplicates. 18S ribosomal RNA was chosen as the reference gene.

Western blotting. Cell lysates were prepared as previously described [24]. QT6 lysates (40 μg of protein) were subjected to SDS–PAGE gel electrophoresis (10%) and Western blotting using the appropriate antibody. After washing, membranes were incubated with an Alexa Fluor secondary antibody (Molecular Probes, Interchim, Montluçon, France). Bands were visualized by Infrared Fluorescence by the Odyssey® Imaging System (LI-COR Inc. Biotechnology, Lincoln, NE, USA) and quantified by Odyssey infrared imaging system software (Application software, version 1.2).

Statistical analysis. Values are means ± SEM from at least 2–3 independent experiments. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA, Statview Software program; SAS Institute, Cary, NC) to detect significant intergroup differences.

Results and discussion

Atrogin-1, IR and AKT characterization, and insulin response

Using the sequence of gallus gallus atrogin-1 available in the GenBank database at the NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov; NM_001030956), we characterized chicken atrogin-1 by RT-PCR and sequencing of the purified amplicons (data not shown). In addition, IR and AKT have been totally or partially sequenced in chickens [25–27]. Since no information was available on insulin signaling in QT6 fibroblasts, we investigated the presence of atrogin-1, IR, and AKT in these cells by RT-PCR analysis. Fig. 1A shows the amplification of cDNAs corresponding to fragments of atrogin-1 (152 bp), IR (235 bp), and AKT (440 bp), demonstrating atrogin-1, IR, and AKT gene expression in quail QT6 fibroblasts.

In mammals and birds, insulin induces AKT phosphorylation on S473 [28]. To further characterize insulin response in QT6 fibroblasts, cells were thus incubated with 0.1 μM insulin for 15 min or 5 h, and the phosphorylation of AKT on S473 was examined. Insulin treatment significantly increased the phosphorylation of AKT on S473 whatever the time of treatment (Fig. 1B). These findings demonstrate that QT6 fibroblasts are insulin sensitive, conversely to QM7 cells derived from the QT6 cell line which are lacking insulin receptors [8]. We next investigated the potential regulation of atrogin-1 by insulin in QT6 fibroblasts. Fig. 1C indicates that insulin treatment for 5 h clearly inhibited atrogin-1 expression ($P < 0.001$). The reduction of atrogin-1 mRNA levels by insulin is in good agreement with data obtained in mammalian C2C12 myotube cell cultures [20].

Table 1
Oligonucleotide primer sequences

Primer	Sequence	Accession No.	Product size (bp)
Atrogin-1			
Sense	5′-GACGCGCTTTCTCGATGAG-3′	NM_001030956	152
Antisense	5′-CCTTGTTATTCAGTAGGTCTTTTTTCCT-3′		
IR			
Sense	5′-TGCCACCACGTGGTTCGCCT-3′	XM_418250	235
Antisense	5′-GCCAGGTCTCTGTGAACAAA-3′		
AKT			
Sense	5′-CCGCGACATCAAGCTGGAGA-3′	AF181260	440
Antisense	5′-CCGCGACATCAAGCTGGAGA-3′		

The sequences of atrogin-1, insulin receptor (IR), and AKT are present in the GenBank database at the NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

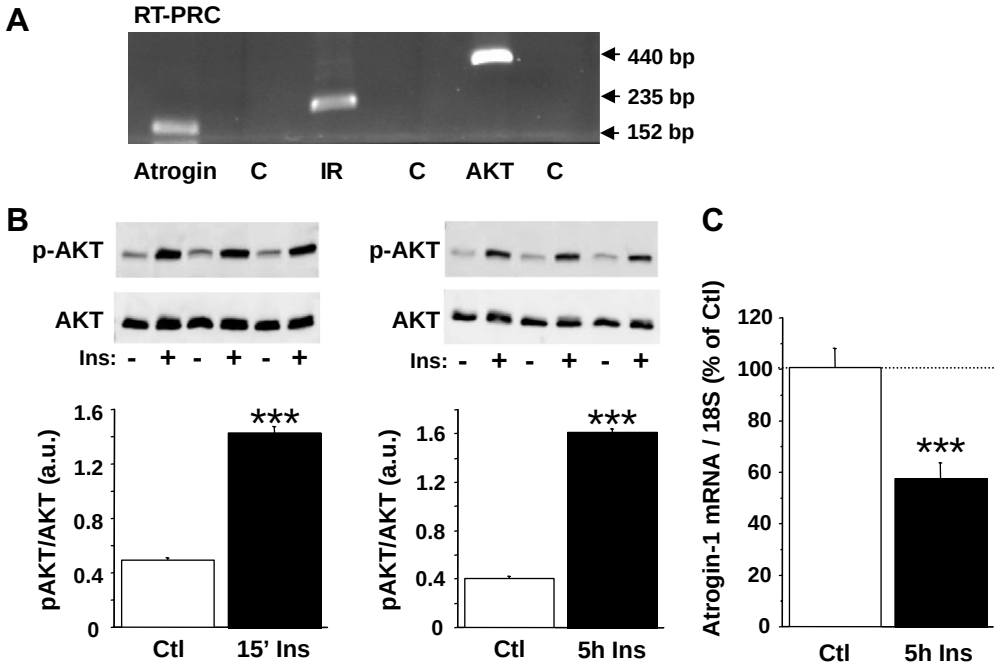


Fig. 1. Atrogin-1, IR and AKT characterization, and insulin response. (A) Atrogin-1, IR and AKT transcripts. RT-PCR analyses were performed using total RNA extracted from QT6 cells. C, negative controls (H_2O). (B) AKT phosphorylation. QT6 cells were stimulated or not by insulin for 15 min (Ins 15′) or 5 h (Ins 5 h). Representative Western blots. Blots were quantified and the ratio phospho-AKT/AKT was determined. (C) Atrogin-1 expression. RNA of QT6 cells stimulated or not by insulin for 5 h were prepared and subjected to real-time RT-PCR. The results were expressed as the atrogin-1 mRNA/18S RNA ratio ($n = 6$–9). $^{***}P < 0.001$ vs. Control (Ctl).

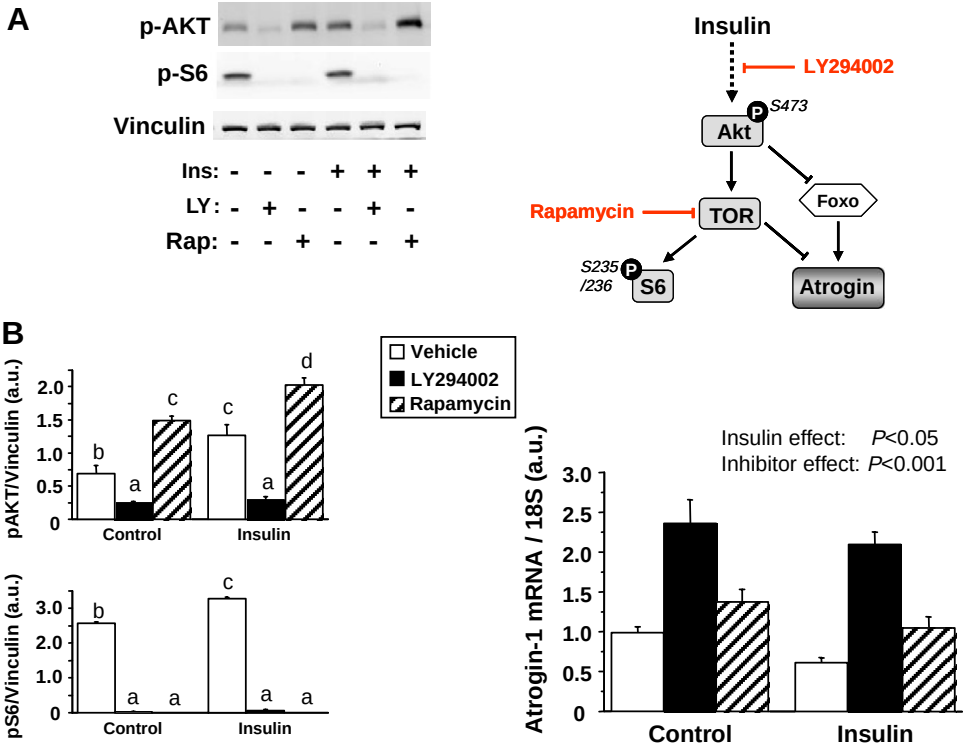


Fig. 2. Effect of insulin in QT6 cells incubated with or without LY294002 or rapamycin. QT6 cells were stimulated or not by insulin for 5 h. (A) Representative Western blots of phospho-AKT, phospho-S6, and vinculin as a loading control. A representation of the AKT/TOR/atrogin pathway is shown on the right; the inhibitors of PI3K/AKT and TOR signaling (LY294002 and rapamycin, respectively) are indicated. Controls with the diluent of the inhibitors were performed for these experiments. (B) On the left, AKT and S6 phosphorylation normalized with vinculin ($n = 3$). Different letters indicate significant differences between treatments at $P < 0.05$. On the right, atrogin-1 expression presented as the atrogin-1 mRNA/18S RNA ratio ($n = 10$). Results of two-way ANOVA are shown as the P-values associated with main effects (no significant interaction observed).

Signaling pathways involved in the insulin-related inhibition of atrogin-1 expression

To explore the signaling pathways involved in insulin-induced atrogin-1 inhibition, QT6 cells were incubated with or without 20 μM LY294002 or 25 nM rapamycin. LY294002 is an inhibitor of the PI3 K/AKT pathway as indicated by dephosphorylation of AKT in cells incubated with or without insulin (Fig. 2A and B). As a consequence, LY294002 drastically increased atrogin-1 mRNA levels by approximately twofold compared to control cells ($P < 0.001$). Higher levels of atrogin-1 mRNA were previously found with LY294002 treatments by Sacheck et al. [20]. These findings can be explained by lower AKT phosphorylation in LY294002-treated cells, suggesting a key role of the PI3 K/AKT pathway in the inhibition of atrogin-1 expression in avian as in mammalian models.

Rapamycin is a specific inhibitor of the TOR pathway as indicated by the dephosphorylation of protein ribosomal S6, a downstream target of TOR, in cells incubated with or without insulin (Fig. 2A and B). Rapamycin, which acts downstream of AKT, did not block the phosphorylation of AKT, but in contrast increased it. This feedback regulation of AKT signaling has been previously observed in various mammal cell models [29–31] and generated increasing interest in the last few years (see [32–34] for reviews). However, the precise mechanisms and consequences of this feedback regulation are so far poorly defined. In this regard, we showed here that rapamycin increased atrogin-1 expression ($P < 0.05$) in both insulin treated and untreated cells although to a lesser extent than LY294002 (Fig. 2B). The concomitant increase of AKT phosphorylation and atrogin-1 gene expression suggests that a mechanism independent of the inhibition of FOXO transcription factors is required in such regulation. Our results therefore demonstrate that TOR pathway is involved in the insulin control of the E3 ubiquitin ligase atrogin-1 in QT6 fibroblasts, as found in C2C12 myotubes [21].

Effect of amino acid availability

Since amino acids act on TOR signaling [1,5–7] that is involved in atrogin-1 control in avian QT6 fibroblasts (Fig. 2), we next studied the regulation of atrogin-1 by amino acids. We have previously demonstrated in avian myoblasts that the availability of individual amino acids such as methionine regulates S6K1, a downstream target of TOR [8]. Consequently, QT6 cells were incubated in RPMI media with or without methionine for two

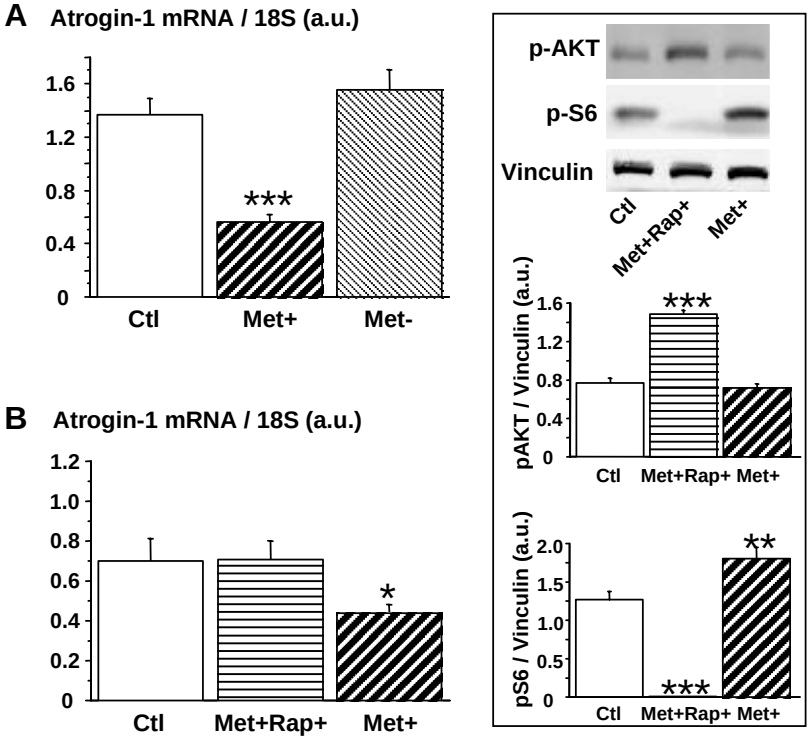


Fig. 3. Effect of amino acid and rapamycin. QT6 cells were incubated in RPMI media with or without methionine (Met) for two periods of 5 h. (A) Effect of amino acid availability on atrogin-1 expression presented as the atrogin-1 mRNA/18S RNA ratio ($n = 12$). Ctl, control cells maintained in complete RPMI medium; Met+, cells deprived of Met for 5 h to which the deprived Met was returned for 5 h; Met−, cells maintained in complete RPMI medium then deprived of Met for 5 h. (B) Effect of amino acid and rapamycin on atrogin-1 expression presented as the atrogin-1 mRNA/18S RNA ratio ($n = 8$). Ctl, control cells maintained in complete RPMI medium; Met+Rap+, cells deprived of Met for 5 h to which the deprived Met was returned for 5 h in the presence of rapamycin; Met+, cells deprived of Met for 5 h to which the deprived Met was returned for 5 h. Results of AKT and S6 phosphorylation are shown in the insert ($n = 4$). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$ vs. Control (Ctl).

successive periods of 5 h. Atrogin-1 expression was not significantly modified by methionine deprivation for 5 h as compared to cells cultured in the complete medium containing amino acids (Fig. 3A). Conversely, re-supplying methionine after a period of deprivation clearly reduced the levels of atrogin-1 mRNA ($P < 0.001$). The present study is the first to provide evidence that methionine is able to modulate atrogin-1 expression. To our knowledge, the only two studies in which the potential effects of amino acids have been tested failed to support the hypothesis of an atrogin-1 control by nutrients [35,36]. These studies were performed using the branched-chain amino acid leucine clearly recognized as a nutrient signal regulator of mRNA translation and proteolysis [37–39]. However, under the experimental conditions used, muscle atrogin-1 was unresponsive to leucine. To determine how methionine influenced atrogin-1 expression, QT6 cells were then incubated with or without treatment with 25 nM rapamycin. Inhibiting TOR by rapamycin for 5 h as indicated by the results of AKT and S6 phosphorylation (Fig. 3B) abolished the amino acid-related decrease in atrogin-1 expression. Thus, our results indicate that atrogin-1 is regulated by growth factors but also amino acids in QT6 fibroblasts via mechanisms that imply TOR.

In conclusion, atrogin-1 is expressed in the quail muscle (QT6) cell line. This E3 ubiquitin ligase is regulated by insulin through signal transduction pathways involving AKT and TOR. In this study, we demonstrate for the first time that atrogin-1 is also regulated by amino acid availability through the TOR signaling pathway. Additional studies are needed to better understand the potential effects of amino acids in controlling the ubiquitin–proteasome-dependent proteolysis.

Acknowledgments

The authors thank Dr. C. Denesvre (INRA, Nouzilly, France) for providing the QT6 cell line. This work was supported by Research Grants from INRA.

References

[1] S.G. Dann, G. Thomas, The amino acid sensitive TOR pathway from yeast to mammals, FEBS Lett. 580 (2006) 2821–2829.
[2] J. Rohde, J. Heitman, M.E. Cardenas, The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth, J. Biol. Chem. 276 (2001) 9583–9586.
[3] S. Oldham, E. Hafen, Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control, Trends Cell Biol. 13 (2003) 79–85.
[4] H. Stocker, T. Radimerski, B. Schindelholz, F. Wittwer, P. Belawat, P. Daram, S. Breuer, G. Thomas, E. Hafen, Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in *Drosophila*, Nat. Cell Biol. 5 (2003) 559–565.
[5] S. Wullschleger, R. Loewith, M.N. Hall, TOR signaling in growth and metabolism, Cell 124 (2006) 471–484.
[6] S.R. Kimball, L.S. Jefferson, Molecular mechanisms though which amino acids mediate signaling though the mammalian target of rapamycin, Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 7 (2004) 39–44.
[7] S.R. Kimball, L.S. Jefferson, New functions for amino acids: effects on gene transcription and translation, Am. J. Clin. Nutr. 83 (2006) 500S–507S.
[8] S. Tesseraud, K. Bigot, M. Taouis, Amino acid availability regulates S6K1 and protein synthesis in avian insulin-insensitive QM7 myoblasts, FEBS Lett. 540 (2003) 176–180.
[9] S. Tesseraud, M. Abbas, S. Duchene, K. Bigot, P. Vaudin, J. Dupont, Mechanisms involved in the nutritional regulation of mRNA translation: features of avian model, Nutr. Res. Rev. 19 (2006) 104–116.
[10] D. Dardevet, C. Sornet, T. Vary, J. Grizard, 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 (1996) 4087–4094.
[11] G.A. Nader, Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together, Int. J. Biochem. Cell. Biol. 37 (2005) 1985–1996.
[12] D.J. Glass, Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways, Int. J. Biochem. Cell. Biol. 37 (2005) 1974–1984.
[13] H.A. Franch, S.R. Price, Molecular signaling pathways regulating muscle proteolysis during atrophy, Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 8 (2005) 271–275.
[14] N.J. Szewczyk, L.A. Jacobson, Signal-transduction networks and the regulation of muscle protein degradation, Int. J. Biochem. Cell. Biol. 37 (2005) 1997–2011.
[15] M.D. Gomes, S.H. Lecker, R.T. Jagoe, A. Navon, A.L. Goldberg, Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001) 14440–14445.
[16] S.H. Lecker, R.T. Jagoe, A. Gilbert, M. Gomes, V. Baracos, J. Bailey, S.R. Price, W.E. Mitch, A.L. Goldberg, Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression, FASEB J. 18 (2004) 39–51.
[17] J.M. Sacheck, J.P. Hyatt, A. Raffaello, R.T. Jagoe, R.R. Roy, V.R. Edgerton, S.H. Lecker, A.L. Goldberg, Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases, FASEB J. 21 (2007) 140–155.
[18] K. Nakashima, Y. Yakabe, M. Yamazaki, H. Abe, Effects of fasting and refeeding on expression of atrogin-1 and Akt/FOXO signaling pathway in skeletal muscle of chicks, Biosci. Biotechnol. Biochem. 70 (2006) 2775–2778.
[19] M. Sandri, C. Sandri, A. Gilbert, C. Skurk, E. Calabria, A. Picard, K. Walsh, S. Schiaffino, S.H. Lecker, A.L. Goldberg, Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy, Cell 117 (2004) 399–412.
[20] J.M. Sacheck, A. Ohtsuka, S.C. McLary, A.L. Goldberg, IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 287 (2004) E591–E601.
[21] E. Latres, A.R. Amini, A.A. Amini, J. Griffiths, F.J. Martin, Y. Wei, H.C. Lin, G.D. Yancopoulos, D.J. Glass, Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway, J. Biol. Chem. 280 (2005) 2737–2744.
[22] P.B. Antin, C.P. Ordahl, Isolation and characterization of an avian myogenic cell line, Dev. Biol. 143 (1991) 111–121.
[23] C. Chabrolle, L. Tosca, S. Crochet, S. Tesseraud, J. Dupont, Expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in chicken ovary: potential role in ovarian steroidogenesis, Domest. Anim. Endocrinol. (2006), Sep 18; [Epub ahead of print].
[24] S. Duchene, E. Audouin, S. Crochet, M.J. Duclos, J. Dupont, S. Tesseraud, Involvement of the ERK1/2 MAPK pathway in insulin-induced S6K1 activation in avian cells, Domest. Anim. Endocrinol. (2006), Nov 29; [Epub ahead of print].
[25] H. Kato, Y. Okubo, Y. Matsumura, C.T. Jr Roberts, K. Sugahara, D. LeRoith, The tyrosine kinase activity of the chicken insulin receptor is similar to that of the human insulin receptor, Biosci. Biotechnol. Biochem. 64 (2000) 903–906.
[26] A.L. Johnson, J.T. Bridgham, J.A. Swenson, Activation of the Akt/protein kinase B signaling pathway is associated with granulosa cell survival, Biol. Reprod. 64 (2001) 1566–1574.
[27] P. Vaudin, J. Dupont, S. Duchene, E. Audouin, S. Crochet, C. Berri, S. Tesseraud, Phosphatase PTEN in chicken muscle is regulated during ontogenesis, Domest. Anim. Endocrinol. 31 (2006) 123–140.

[28] M. Hanada, J. Feng, B.A. Hemmings, Structure, regulation and function of PKB/AKT—a major therapeutic target, Biochim. Biophys. Acta 1697 (2004) 3–16.
[29] K.E. O'Reilly, F. Rojo, Q.B. She, D. Solit, G.B. Mills, D. Smith, H. Lane, F. Hofmann, D.J. Hicklin, D.L. Ludwig, J. Baselga, N. Rosen, mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt, Cancer Res. 66 (2006) 1500–1508.
[30] S.Y. Sun, L.M. Rosenberg, X. Wang, Z. Zhou, P. Yue, H. Fu, F.R. Khuri, Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated mammalian target of rapamycin inhibition, Cancer Res. 65 (2005) 7052–7058.
[31] F. Tremblay, M. Krebs, L. Dombrowski, A. Brehm, E. Bernroider, E. Roth, P. Nowotny, W. Waldhausl, A. Marette, M. Roden, Overactivation of S6 kinase 1 as a cause of human insulin resistance during increased amino acid availability, Diabetes 54 (2005) 2674–2684.
[32] L.S. Harrington, G.M. Findlay, R.F. Lamb, Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane, Trends Biochem. Sci. 30 (2005) 35–42.
[33] B.D. Manning, Balancing Akt with S6K: implications for both metabolic diseases and tumorigenesis, J. Cell Biol. 167 (2004) 399–403.
[34] D.D. Sarbassov, S.M. Ali, D.M. Sabatini, Growing roles for the mTOR pathway, Curr. Opin. Cell Biol. 17 (2005) 596–603.
[35] R.A. Frost, G.J. Nystrom, L.S. Jefferson, C.H. Lang, Hormone, cytokine, and nutritional regulation of sepsis-induced increases in atrogin-1 and MuRF1 in skeletal muscle, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 292 (2007) E501–E512.
[36] C.H. Lang, D. Huber, R.A. Frost, Burn-induced increase in atrogin-1 and MuRF-1 in skeletal muscle is glucocorticoid independent but downregulated by IGF-I, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 292 (2007) R328–R336.
[37] S.R. Kimball, L.S. Jefferson, Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis, J. Nutr. 136 (2006) 227S–231S.
[38] F. Yoshizawa, Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids in vivo, Biochem. Biophys. Res. Commun. 313 (2004) 417–422.
[39] K. Nakashima, A. Ishida, M. Yamazaki, H. Abe, Leucine suppresses myofibrillar proteolysis by down-regulating ubiquitin–proteasome pathway in chick skeletal muscles, Biochem. Biophys. Res. Commun. 336 (2005) 660–666.

Annexe 3

doi:10.1017/S0043933911000274

Manipulating tissue metabolism by amino acids

S. TESSERAUD[1]*, N. EVERAERT[2], S. BOUSSAID-OM EZZINE[1], A. COLLIN[1], S. MÉTAYER-COUSTARD[1] and C. BERRI[1]

[1]INRA, UR83 Recherches Avicoles, 37380 Nouzilly, France; [2]Department of Biosystems, KU Leuven, 3001 Leuven, Belgium
***Corresponding author: sophie.tesseraud@tours.inra.fr**

Protein metabolism is considered to be regulated by amino acids, with major consequences on tissue development. There is evidence that lysine greatly affects carcass composition and muscle growth. In particular, a drastic effect of dietary provision of lysine has been observed on breast muscle development in chickens. Other essential amino acids, such as threonine and valine, do not have as pronounced an effect as lysine on body composition. Increasing lysine can also improve chicken breast muscle quality by increasing its ultimate pH and water holding capacity, but the underlying mechanisms are still unknown. Studies conducted over the last ten years indicate that, in addition to being substrates for protein synthesis, amino acids act as modulators of signal transduction pathways that control metabolism and cell functions. For instance, certain amino acids can modulate the activity of the intracellular protein kinases involved in the control of mRNA translation. Interestingly, enhanced responses to amino acids have been reported during the neonatal period, suggesting that early protein nutrition impacts on the development of broiler chicks. Methionine and cysteine have a very significant place among amino acids because they have several additional roles: they are precursors of essential molecules, for example cysteine is used for the synthesis of the antioxidant glutathione, and thus participates in the control of oxidative status, methionine is a source of the methyl groups needed for all biological methylation reactions, including methylation of DNA and histones, etc. These findings together indicate the importance of optimizing amino acid nutrition and providing a rationale for nutritional advice.

Keywords: amino acids; nutrient metabolism; signalling; oxidative stress; methylation process

Introduction

Amino acids have a major effect on the control of protein metabolism. Provision of the different essential amino acids is a prerequisite for maintenance of optimal rates of

© World's Poultry Science Association 2011
World's Poultry Science Journal, Vol. 67, June 2011
Received for publication September 7, 2010
Accepted for publication November 17, 2010

protein synthesis, and this is an unquestionable major concept in protein nutrition. In other words, amino acids are substrates for protein synthesis and the lack of even a single essential amino acid causes a decrease in protein synthesis. Amino acid availability affects not only protein synthesis rates, but also proteolysis and amino acid oxidation, thus modulating the different pathways involved in protein metabolism. Moreover, studies conducted during the last ten years indicate that amino acids act as regulators of metabolic pathways, with for instance an effect targeted on mRNA translation into proteins.

Amino acids exert their action in various tissues and organs, and in particular they are able to regulate muscle development. The regulation of protein metabolism by amino acids has been studied extensively in skeletal muscle in order to improve muscle growth and meat quality in animal production, and to reduce muscle wasting in some physiological (*e.g.* early lactation) and physiopathological situations (*e.g.* ageing, infections, etc). Indeed, due to the differences between the amino acid composition of acute-phase proteins synthesized during catabolic states and that of muscle proteins, a considerable amount of muscle protein has to be degraded to provide the amino acids used in the acute-phase response (Reeds *et al.*, 1994). This review aims to address the important question of how protein nutrition, *i.e.* provision of amino acids, may contribute to the optimisation of metabolic efficiency and product quality. It also describes the general effects of amino acids with implications for body composition and meat quality. It also highlights the role of amino acids as nutrient signals, which appears to be important for cell functions and metabolic pathways. The last part of this review focuses on sulphur amino acids and their role in controlling oxidative status and the methylation process.

Body composition and muscle quality

Amino acids are known as anabolic factors, which induce protein gain by stimulating protein synthesis while inhibiting proteolysis. These effects on protein turnover have been clearly demonstrated both in mammals and in avian species (Hocquette *et al.*, 2007; Muramatsu, 1990; Tesseraud *et al.*, 2006 for reviews). Protein-deficient diets cause inhibition of protein synthesis, whereas the effect on proteolysis seems to depend on the severity of the deficiency. Hyperaminoacidemia induced by intravenous infusion of amino acids increases muscle protein synthesis, at least when measurements are performed using the constant infusion of labelled amino acids (Watt *et al.*, 1992; Tesseraud *et al.*, 1993). Amino acids are essential for postprandial stimulation of protein synthesis, as demonstrated in the rat (Yoshizawa *et al.*, 1998) and the chicken (Yaman *et al.*, 2000). Stimulation of protein synthesis by amino acids is associated with an increase in translational efficiency with, in particular, stimulation of the initiation phase which corresponds to the sequential binding of the 40S and 60S ribosomal subunits on the mRNA molecule. Because re-feeding elicits a rise in plasma concentrations of insulin and amino acids, the role of insulin has also to be considered. Interestingly, some studies have suggested that a minimum level of insulin is required for the stimulation of protein synthesis by re-feeding or amino acids (see Kimball *et al.*, 2002 for a review). Insulin may thus have a permissive effect for the amino acid-induced stimulation of protein synthesis.

Evidence of the action of amino acids in protein turnover has been provided using diets supplemented with or deprived of one or more amino acids. Methionine is for example the first limiting factor in classical diets used for growing chickens because of a high requirement for sulphur amino acids for the synthesis of feathers, whereas poultry diets

based on corn and soybean meal are deficient in sulphur amino acids without supplementation (Baker, 2006). Decreased growth in chickens fed methionine- and cysteine-free diets is mainly caused by lower rates of whole-body protein synthesis associated with lower RNA efficiency, suggesting translational regulation. Methionine supplementation enhances muscle growth, and the addition of methionine to a methionine-deficient diet, otherwise balanced in terms of other amino acids, increases accretion and synthesis of protein in the *Gastrocnemius* and *Pectoralis major* muscles in chickens (Barnes *et al.*, 1995). Similarly, lysine supplementation to a lysine-deficient diet otherwise balanced in terms of other amino acids increases the amounts of protein synthesized and gained in chicken skeletal muscle (Tesseraud *et al.*, 1996a, 2001).

Studies performed using lysine-deficient diets have revealed the possibility of a major effect of dietary amino acid levels on protein degradation: the fractional rates of proteolysis (values expressed as % per day) measured in the *Pectoralis major* muscle of growing chickens are always higher in lysine-deprived animals, irrespective of age or genotype (Tesseraud *et al.*, 1996a, 2001). Amino acid deficiency stimulates autophagic (lysosomal degradation) and proteasome-mediated proteolysis (Hamel *et al.*, 2004; Bechet *et al.*, 2005). In chicken muscle, daily variations in dietary lysine content affect the expression of two important genes controlling the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway, *i.e.* E3 ubiquitin ligases Muscle Atrophy F box (MAFbx, also called atrogin-1) and Muscle Ring Finger-1 (MuRF1) (Tesseraud *et al.*, 2009a).

It should be noted that lysine is one amino acid that probably exerts the most specific effects on carcass composition and muscle growth. A particularly drastic effect has been observed on breast muscle development in chickens (Tesseraud *et al.*, 1996a). It is probable that the breast muscle of chickens represents a major reservoir of lysine that can be mobilised in deficiency states. Increased proteolysis in such conditions provides free amino acids that are used for protein synthesis. It is of note that neither threonine nor valine exhibits an effect on body composition as pronounced as that of lysine, as observed in an experiment in which these three amino acids were studied together in similar conditions (Leclercq, 1998). The specific effect of lysine on breast muscle development may be due to the fact that lysine is the most abundant essential amino acid in skeletal muscle protein. Interestingly, a recent study has also revealed that increasing lysine can improve chicken breast muscle quality by increasing its ultimate pH and water holding capacity (Berri *et al.*, 2008), but the underlying mechanisms have yet to be defined.

Based on findings reported in piglets (Conde-Aguilera *et al.*, 2010), it appears that amino acids modify the chemical composition of tissues with a potential effect on meat quality. In particular, a deficient supply of methionine and/or cysteine affects lipid content and amino acid composition of proteins in muscles.

Nutrient signalling

Several reviews have reported that amino acids are signal mediators acting on the same intracellular protein kinases as certain hormones (*e.g.* insulin) (Kimball and Jefferson, 2006a; Dann and Thomas, 2006; Tesseraud *et al.*, 2006; Métayer *et al.*, 2008). Thus, amino acids, in particular the branched-chain amino acid leucine in skeletal muscle, affect the activity of several proteins involved in the control of mRNA translation, such as 4E binding protein (4E-BP1) and 70 kDa ribosomal protein S6 kinase (p70S6K, also called S6K1) (*Figure 1*). S6K1 and, similarly, 4E-BP1 are phosphorylated in response to insulin via a signal transduction pathway involving phosphatidylinositol-3' kinase (PI3K) and the mammalian target of rapamycin (mTOR) in mammals and avian species (Proud,

2006; Tesseraud *et al.*, 2007a; Dupont *et al.*, 2009). Amino acid signalling also originates from mTOR, and activates S6K1 and 4E-BP1 (Meijer and Dubbelhuis, 2004; Tesseraud *et al.*, 2006). Despite the increased understanding of the roles of amino acids, many questions still remain and the underlying mechanisms need to be elucidated. One of the key issues relates to the specificity of amino acids acting as 'nutrient signals'. The effects of branched-chain amino acids on the mTOR/S6K1 pathway have been clearly demonstrated (Kimball and Jefferson, 2006b; Yoshizawa, 2004). However, other amino acids may also exert an effect on cell signalling. For example, arginine regulates S6K1 and 4E-BP1 in intestinal cells (Ban *et al.*, 2004), and glutamine can control S6K1 activation and 4E-BP1 phosphorylation induced by arginine or leucine (Nakajo *et al.*, 2005). There are few studies regarding the potential effects of methionine on these intracellular kinases, but they suggest that this sulphur amino acid may have a signal function by inducing S6K1 activation in mammals (Shigemitsu *et al.*, 1999; Stubbs *et al.*, 2002) and avian species (Tesseraud *et al.*, 2003; Métayer-Coustard *et al.*, 2010). In addition, amino acid availability regulates the expression of the E3 ubiquitin ligase atrogin-1 via mTOR in muscle cell lines (Tesseraud *et al.*, 2007b; Herningtyas *et al.*, 2008).

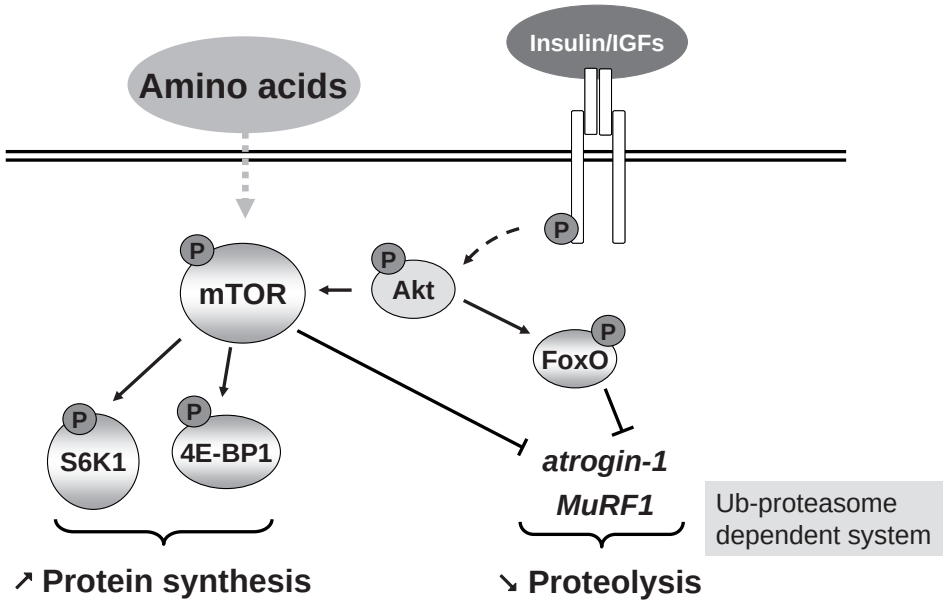


Figure 1 mTOR signalling and control of protein synthesis and proteolysis. Akt or PKB, protein kinase B; atrogin-1 or MAFbx, muscle atrophy F box; 4E-BP1, eukaryotic initiation factor 4E binding protein; FoxO, forkhead box-O transcription factor; mTOR, mammalian target of rapamycin; MuRF1, Muscle Ring Finger-1; S6K1, 70 kDa ribosomal protein S6 kinase.

Interestingly, the activation by feeding and by amino acids of components related to translation initiation is developmentally regulated, with enhanced responses during the neonatal period, as reported by several studies in piglets (Suryawan *et al.*, 2001, 2007). Decreased stimulation with age parallels the developmental decline in protein synthesis in skeletal muscle, which is due to lower efficiency of the translation process and depressed synthesis capacity (Davis *et al.*, 2008). Similar age-related changes might exist in avian species since developmental declines in the capacity for protein synthesis (Tesseraud *et*

al., 1996b) and in the abundance of kinases involved in intracellular signalling (Vaudin *et al.*, 2006) have been reported in chick muscle. Considering the drastic effects of amino acids on proteins related to translation initiation in the neonatal period (Escobar *et al.*, 2006, 2007), consumption of an amino acid-enriched diet could be particularly valuable to improve protein synthesis and growth in this critical period. A recent study performed in neonatal chicks showed that the consumption of a high protein diet clearly activated S6K1 and augmented its activity in the breast muscle (Everaert *et al.*, 2010). These findings indicated that the activation of S6K1 is sensitive to dietary amino acid provision during early feeding, which could potentially enhance the translation of mRNA in skeletal muscle of neonatal chicks.

One unsolved issue concerns the multiple effects of amino acids on cell functioning. The role of amino acids as nutrient signals appears to be important for cell functions and metabolic pathways, other than those directly concerned with protein turnover. For example, amino acids may be strong modulators of glucose metabolism and insulin sensitivity. *In vitro* and *in vivo* findings indicate an important role of amino acids in glucose homeostasis through inhibition of insulin action on muscle glucose transport and hepatic glucose production. This negative effect of amino acids on insulin action appears to be associated with mTOR/S6K1-dependent inhibitory phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) on serine and/or threonine residues and impaired activation of PI3K, a key effector of the metabolic actions of insulin (Tremblay *et al.*, 2007; Um *et al.*, 2006). Depletion of S6K1 was recently shown to enhance basal glucose utilization in mammalian muscle cells and to protect against the development of impaired insulin action in response to excessive leucine (Deshmukh *et al.*, 2009). More information is therefore needed on the potential effects of amino acid supplementation before use for nutritional purposes.

Sulphur amino acids, control of oxidative status and methylation process

As precursors of various molecules, amino acids have other major functions. For instance, the antioxidants glutathione and cysteine, originating from methionine metabolism, can function as direct scavengers of reactive oxygen species (ROS), formed at the mitochondrial level and producing deleterious effects such as lipid and protein oxidation or DNA strand-break damage. Glutathione, which is a tripeptide (L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine), is the most important intracellular antioxidant in the body (Obled *et al.*, 2004; Reid and Jahoor, 2001). Acute infection increases its synthesis in various tissues (liver, spleen, lung and muscles), accounting for at least 40% of the enhanced cysteine utilisation during infection in the rat (Malmezat *et al.*, 2000). Methionine metabolism was affected in normal volunteers subjected to a mild inflammatory challenge (*i.e.* vaccination; Mercier *et al.*, 2006), in agreement with results obtained in acute diseases. Preferential methionine metabolism toward cysteine synthesis has thus been observed, indicating increased requirement for sulphur amino acids in these situations. Interestingly, using everted sac techniques with chicken intestine, it was demonstrated that the methionine hydroxy-analog, DL-2-Hydroxy-(4-Methylthio) butanoic acid, is more efficiently converted to cysteine and taurine than L-methionine through the trans-sulphuration pathway, suggesting that this hydroxy-analog of methionine might have a different role in detoxification processes than methionine itself (Martin-Venegas *et al.*, 2006).

Sulphur amino acids are involved in the methionine sulphoxide reductase anti-oxidant system (Moskovitz *et al.*, 1995; Levine *et al.*, 1996). Methionine residues in proteins are

particularly susceptible to oxidation by ROS and are converted to methionine sulphoxide, which can be reduced back to methionine by methionine sulphoxide reductases. Each cycle of methionine oxidation and reduction will destroy one equivalent of ROS, which might represent a major natural scavenging system for ROS. The methionine sulphoxide reductase system is particularly involved in the repair of oxidized proteins, thereby preventing cellular accumulation of damaged proteins (Stadtman *et al.*, 2005). Nevertheless, the effects of different sulphur compounds in critical physiopathological conditions is not yet fully understood, especially with regard to host defence against oxidative stress and protection against lipid and protein oxidation. These findings that impact on tissue metabolism have potential implications for animal health, tissue development and product (meat) quality.

Methionine is a source of methyl groups that are used to methylate DNA, a process that influences chromatin structure and gene expression. The mechanisms involved have been detailed in a recent review and therefore will not be presented here (Tesseraud *et al.*, 2009b). From a nutritional point of view, one interesting application concerns perinatal nutrition since aberrant methyl metabolism in early life is linked with disorders. This means that manipulating the sulphur amino acid content of the early diet may induce chronic changes in cell functions that have implications for long-term health. For instance, it has been shown in mammals that changes within physiological ranges in the supply of methionine and specific B vitamins such as B12 during the periconception period can lead to widespread epigenetic changes in DNA methylation in offspring, and can modify adult health-related phenotypes (Sinclair *et al.*, 2007). To our knowledge, such epigenetic regulation by nutrients has not yet been investigated in avian species, although there is evidence of epigenetic changes in chicks after heat-conditioning (Kisliouk *et al.*, 2010).

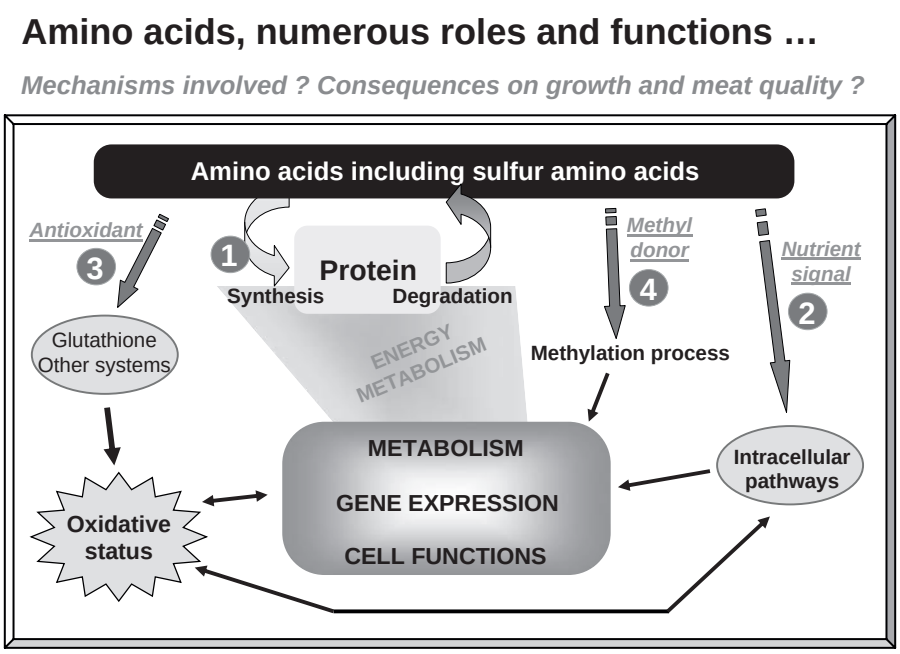


Figure 2 Regulation of metabolism, numerous roles played by amino acids: 1) precursors of protein synthesis, 2) nutrient signal, 3) antioxidant function and 4) methyl group donor. The figure represents a summary of findings discussed in the present review.

Conclusions

Amino acids are recognised to be essential in controlling metabolism (*Figure 2*). Despite the increased understanding of the role of amino acids, many questions still remain unanswered. Identifying the mechanisms by which amino acids regulate metabolism, signalling, gene expression and cell functioning is thus essential to improve the control of nutrient utilisation and to optimise dietary amino acid provision for animal production purposes.

Acknowledgements

The authors thank I. Seiliez (INRA, St Pée-sur-Nivelle, France) for valuable discussions, and D. Raine (Surrey, UK) for editing the English language.

References

BAKER, D.H. (2006) Comparative species utilization and toxicity of sulphur amino acids. *The Journal of Nutrition* **136**: 1670S-1675S.

BAN, H., SHIGEMITSU, K., YAMATSUJI, T., HAISA, M., NAKAJO, T., TAKAOKA, M., NOBUHISA, T., GUNDUZ, M., TANAKA, N. and NAOMOTO, Y. (2004) Arginine and Leucine regulate p70 S6 kinase and 4E-BP1 in intestinal epithelial cells. *International Journal of Molecular Medicine* **13**: 537-543.

BARNES, D.M., CALVERT, C.C. and KLASING, K.C. (1995) Methionine deficiency decreases protein accretion and synthesis but not tRNA acylation in muscles of chicks. *The Journal of Nutrition* **125**: 2623-30.

BECHET, D., TASSA, A., COMBARET, L., TAILLANDIER, D. and ATTAIX, D. (2005) Regulation of skeletal muscle proteolysis by amino acids. *Journal of Renal Nutrition* **15**: 18-22.

BERRI, C., BESNARD, J. and RELANDEAU, C. (2008) Increasing dietary lysine increases final pH and decreases drip loss of broiler breast meat. *Poultry Science* **87**: 480-4.

CONDE-AGUILERA, J.A., BAREA, R., LE FLOC'H, N., LEFAUCHEUR, L. and VAN MILGEN, J. (2010) A sulphur amino acid deficiency changes the amino acid composition of body protein in piglets. *Animal* **4**: 1349-1358, doi:10.1017/S1751731110000340.

DANN, S.G. and THOMAS, G. (2006) The amino acid sensitive TOR pathway from yeast to mammals. *FEBS Letters* **580**: 2821-2829.

DAVIS, T.A., SURYAWAN, A., ORELLANA, R.A., NGUYEN, H.V. and FIOROTTO, M.L. (2008) Postnatal ontogeny of skeletal muscle protein synthesis in pigs. *Journal of Animal Science* **86**: E13-8.

DESHMUKH, A., SALEHZADEH, F., METAYER-COUSTARD, S., FAHLMAN, R., NAIR, K.S. and AL-KHALILI, L. (2009) Post-transcriptional gene silencing of ribosomal protein S6 kinase 1 restores insulin action in leucine-treated skeletal muscle. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**: 1457-66.

DUPONT, J., TESSERAUD, S. and SIMON, J. (2009) Insulin signalling in chicken liver and muscle. *General and Comparative Endocrinology* **163**: 52-7.

ESCOBAR, J., FRANK, J.W., SURYAWAN, A., NGUYEN, H.V. and DAVIS, T.A. (2007) Amino acid availability and age affect the leucine stimulation of protein synthesis and eIF4F formation in muscle. *The American Journal of Physiology* **293**: E1615-21.

ESCOBAR, J., FRANK, J.W., SURYAWAN, A., NGUYEN, H.V., KIMBALL, S.R., JEFFERSON, L.S. and DAVIS, T.A. (2006) Regulation of cardiac and skeletal muscle protein synthesis by individual branched-chain amino acids in neonatal pigs. *The American Journal of Physiology* **290**: E612-E621.

EVERAERT, N., SWENNEN, Q., COUSTARD, S.M., WILLEMSEN, H., CAREGHI, C., BUYSE, J., BRUGGEMAN, V., DECUYPERE, E. and TESSERAUD, S. (2010) The effect of the protein level in a pre-starter diet on the post-hatch performance and activation of ribosomal protein S6 kinase in muscle of neonatal broilers. *British Journal of Nutrition* **103**: 206-11.

HAMEL, F.G., FAWCETT, J., BENNETT, R.G. and DUCKWORTH, W.C. (2004) Control of proteolysis: hormones, nutrients, and the changing role of the proteasome. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **7**: 255-58.

HERNINGTYAS, E.H., OKIMURA, Y., HANDAYANINGSIH, A.E., YAMAMOTO, D., MAKI, T., IIDA, K., TAKAHASHI, Y., KAJI, H. and CHIHARA, K. (2008) Branched-chain amino acids and arginine suppress MaFbx/atrogin-1 mRNA expression via mTOR pathway in C2C12 cell line. *Biochimica et Biophysica Acta* **1780**: 1115-20.

HOCQUETTE, J.F., TESSERAUD, S., CASSAR-MALEK, I., CHILLIARD, Y. and ORTIGUES-MARTY, I. (2007) Responses to nutrients in farm animals: implications for production and quality. *Animal* **1**: 1297-1313.

KIMBALL, S.R. and JEFFERSON, L.S. (2006a) New functions for amino acids: effects on gene transcription and translation. *The American Journal of Clinical Nutrition* **83**: 500S-507S.

KIMBALL, S.R. and JEFFERSON, L.S. (2006b) Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *The Journal of Nutrition* **136**: 227S-231S.

KIMBALL, S.R., FARRELL, P.A. and JEFFERSON, L.S. (2002) Invited Review: Role of insulin in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by amino acids or exercise. *Journal of Applied Physiology* **93**: 1168-1180.

KISLIOUK, T., ZIV, M. and MEIRI, N. (2010) Epigenetic control of translation regulation: alterations in histone H3 lysine 9 post-translation modifications are correlated with the expression of the translation initiation factor 2B (Eif2b5) during thermal control establishment. *Developmental Neurobiology* **70**: 100-13.

LECLERCQ, B. (1998) Specific effects of lysine on broiler production: comparison with threonine and valine. *Poultry Science* **77**: 118-123.

LEVINE, R.L., MOSONI, L., BERLETT, B.S. and STADTMAN, E.R. (1996) Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 15036-15040.

MALMEZAT, T., BREUILLE, D., CAPITAN, P., MIRAND, P.P. and OBLED, C. (2000) Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. *The Journal of Nutrition* **130**: 1239-46.

MARTIN-VENEGAS, R., GERAERT, P.A. and FERRER, R. (2006) Conversion of the Methionine Hydroxy Analogue, DL-2-Hydroxy-(4-Methylthio) butanoic Acid, to Sulphur-Containing Amino Acids in the Chicken Small Intestine. *Poultry Science* **85**: 1932-8.

MEIJER, A.J. and DUBBELHUIS, P. (2004) Amino acid signalling and the integration of metabolism. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **313**: 397-403.

MERCIER, S., BREUILLE, D., BUFFIERE, C., GIMONET, J., PAPET, I., MIRAND, P.P. and OBLED, C. (2006) Methionine kinetics are altered in the elderly both in the basal state and after vaccination. *American Journal of Clinical Nutrition* **83**: 291-98.

MÉTAYER-COUSTARD, S., MAMERI, H., SEILIEZ, I., CROCHET, S., CRÉPIEUX, P., MERCIER, Y., GERAERT, P.A. and TESSERAUD, S. (2010) Methionine deprivation regulates the S6K1 pathway and protein synthesis in avian QM7 myoblasts without activating the GCN2/eIF2 cascade. *The Journal of Nutrition* **140**: 1539-1545.

MÉTAYER, S., SEILIEZ, I., COLLIN, A., DUCHÊNE, S., MERCIER, Y., GERAERT, P.A. and TESSERAUD S. (2008) Mechanisms through which sulphur amino acids control protein metabolism and oxidative status. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **19(4)**: 207-15.

MOSKOVITZ, J., RAHMAN, M.A., STRASSMAN, J., YANCEY, S.O., KUSHNER, S.R., BROT, N. and WEISSBACH, H. (1995) Escherichia coli peptide methionine sulphoxide reductase gene: regulation of expression and role in protecting against oxidative damage. *Journal of Bacteriology* **177**: 502-507.

MURAMATSU, T. (1990) Nutrition and whole-body protein turnover in the chicken in relation to mammalian species. *Nutrition Research Reviews* **3**: 211-28.

NAKAJO, T., YAMATSUJI, T., BAN, H., SHIGEMITSU, K., HAISA, M., MOTOKI, T., NOMA, K., NOBUHISA, T., MATSUOKA, J., GUNDUZ, M., YONEZAWA, K., TANAKA, N. and NAOMOTO, Y. (2005) Glutamine is a key regulator for amino acid-controlled cell growth through the mTOR signalling pathway in rat intestinal epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **326**: 174-180.

OBLED, C., PAPET, I. and BREUILLE, D. (2004) Sulphur-containing amino acids and glutathione in diseases., in: CYNOBER, L.A. (Ed.) *Metabolic and therapeutic aspects of amino acids in clinical nutrition*, 2nd ed., pp 667-687, Boca Raton (CRC Press LLC).

PROUD, C.G. (2006) Regulation of protein synthesis by insulin. *Biochemical Society Transactions* **34**: 213-6.

REEDS, P.J., FJELD, C.R. and JAHOOR, F. (1994) Do the differences between the amino acid compositions of acute-phase and muscle proteins have a bearing on nitrogen loss in traumatic states? *The Journal of Nutrition* **124**: 906-10.

REID, M. and JAHOOR, F. (2001) Glutathione in disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **4**: 65-71.

SHIGEMITSU, K., TSUJISHITA, Y., MIYAKE, H., HIDAYAT, S., TANAKA, N., HARA, K. and YONEZAWA, K. (1999) Structural requirement of leucine for activation of p70 S6 kinase. *FEBS Letters* **447**: 303-306.

SINCLAIR, K.D., ALLEGRUCCI, C., SINGH, R., GARDNER, D.S., SEBASTIAN, S., BISPHAM, J., THURSTON, A., HUNTLEY, J.F., REES, W.D., MALONEY, C.A., LEA, R.G., CRAIGON, J., MCEVOY, T.G. and YOUNG, L.E. (2007) DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 19351-19356.

STADTMAN, E.R., VAN REMMEN, H., RICHARDSON, A., WEHR, N.B. and LEVINE, R.L. (2005) Methionine oxidation and aging. *Biochimica et Biophysica Acta* **1703**: 135-140.

STUBBS, A.K., WHEELHOUSE, N.M., LOMAX, M.A. and HAZLERIGG, D.G. (2002) Nutrient-hormone interaction in the ovine liver: methionine supply selectively modulates growth hormone-induced IGF-I gene expression. *Journal of Endocrinology* **174**: 335-341.

SURYAWAN, A., NGUYEN, H.V., BUSH, J.A. and DAVIS, T.A. (2001) Developmental changes in the feeding-induced activation of the insulin-signaling pathway in neonatal pigs. *The American Journal of Physiology* **281**: E908-E915.

SURYAWAN, A., ORELLANA, R.A., NGUYEN, H.V., JEYAPALAN, A.S., FLEMING, J.R. and DAVIS, T.A. (2007) Activation by insulin and amino acids of signalling components leading to translation initiation in skeletal muscle of neonatal pigs is developmentally regulated. *The American Journal of Physiology* **293**: E1597-605.

TESSERAUD, S., ABBAS, M., DUCHENE, S., BIGOT, K., VAUDIN, P. and DUPONT, J. (2006) Mechanisms involved in the nutritional regulation of mRNA translation: features of avian model. *Nutrition Research Reviews* **19**: 104-116.

TESSERAUD, S., BIGOT, K. and TAOUIS, M. (2003) Amino acid availability regulates S6K1 and protein synthesis in avian insulin-insensitive QM7 myoblasts. *FEBS Letters* **540**: 176-180.

TESSERAUD, S., BOUVAREL, I., COLLIN, A., AUDOUIN, E., CROCHET, S., SEILIEZ, I. and LETERRIER, C. (2009a) Daily variations in dietary lysine content alter the expression of genes related to proteolysis in chicken pectoralis major muscle. *The Journal of Nutrition* **139**: 38-43.

TESSERAUD, S., GRIZARD, J., DEBRAS, E., PAPET, I., BONNET, Y., BAYLE, G. and CHAMPREDON, C. (1993) Leucine metabolism in lactating and dry goats: effect of insulin and substrate availability. *American Journal of Physiology* **265**: E402-13.

TESSERAUD, S., MÉTAYER COUSTARD, S., COLLIN, A. and SEILIEZ, I. (2009b) Role of sulphur amino acids in controlling nutrient metabolism and cell functions: implications for nutrition. *British Journal of Nutrition* **101**: 1132-9.

TESSERAUD, S., MÉTAYER, S., DUCHÊNE, S., BIGOT, K., GRIZARD, J. and DUPONT, J. (2007a) Regulation of protein metabolism by insulin: value of different approaches and animal models. *Domestic animal Endocrinology* **33**: 123-42.

TESSERAUD, S., MÉTAYER-COUSTARD, S., BOUSSAID, S., CROCHET, S., AUDOUIN, E., DEROUET, M. and SEILIEZ, I. (2007b) Insulin and amino acid availability regulate atrogin-1 in avian QT6 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **357**: 181-6.

TESSERAUD, S., PERESSON, R. and CHAGNEAU, A.M. (1996b) Age-related changes of protein turnover in specific tissues of the chick. *Poultry Science* **75**: 627-31.

TESSERAUD, S., PERESSON, R., LOPES, J. and CHAGNEAU, A.M. (1996a) Dietary lysine deficiency greatly affects muscle and liver protein turnover in growing chickens. *British Journal of Nutrition* **75**: 853-65.

TESSERAUD, S., TEMIM, S., LE BIHAN-DUVAL, E. and CHAGNEAU, A.M. (2001) Increased responsiveness to dietary lysine deficiency of pectoralis major muscle protein turnover in broilers selected on breast development. *Journal of Animal Science* **79**: 927-33.

TREMBLAY, F., LAVIGNE, C., JACQUES, H. and MARETTE, A. (2007) Role of dietary proteins and amino acids in the pathogenesis of insulin resistance. *Annual Review of Nutrition* **27**: 293-310.

UM, S.H., D'ALESSIO, D. and THOMAS, G. (2006) Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. *Cell Metabolism* **3**: 393-402.

VAUDIN, P., DUPONT, J., DUCHÊNE, S., AUDOUIN, E., CROCHET, S., BERRI, C. and TESSERAUD, S. (2006) Phosphatase PTEN in chicken muscle is regulated during ontogenesis. *Domestic Animal Endocrinology* **31**: 123-140.

WATT, P.W., CORBETT, M.E. and RENNIE, M.J. (1992) Stimulation of protein synthesis in pig skeletal muscle by infusion of amino acids during constant insulin availability. *American Journal of Physiology* **262**: E453-60.

YAMAN, M.A., KITA, K. and OKUMURA, J. (2000) Various macronutriments intakes additively stimulate protein synthesis in liver and muscle of food-deprived chicks. *The Journal of Nutrition* **130**: 70-76.

YOSHIZAWA, F. (2004) Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **313**: 417-422.

YOSHIZAWA, F., KIMBALL, S.R., VARY, T.C. and JEFFERSON, L.S. (1998) Effect of dietary protein on translation initiation in rat skeletal muscle and liver. *American Journal of Physiology* **275**: E814-20.

Sourour BOUSSAID-OM EZZINE

Adaptations environnementales de la protéosynthèse et de la protéolyse dans le muscle de poulet ; voies de signalisation impliquées

Résumé

Les mécanismes d'adaptation environnementale du métabolisme protéique à court et long-terme sont mal connus. L'exposition prolongée à la chaleur (32°C *vs.* 22°C) modifie l'expression de quelques gènes impliqués dans le métabolisme protéino-énergétique du muscle *Pectoralis major* de poulet. La moindre activation de la protéine ribosomale S6 par des facteurs anaboliques à 32°C pourrait indiquer une baisse de l'efficacité de la traduction des ARNm en protéines au chaud. Ceci, associé à une baisse du potentiel de synthèse, traduit une altération à long-terme de la protéosynthèse musculaire au chaud. La distribution séquentielle de régimes alimentaires variant par leur teneur en protéines et/ou en énergie induit au niveau du muscle *Pectoralis major* de poulet des régulations considérables d'acteurs impliqués dans le contrôle de la protéolyse (e.g. atrogin-1) et de la protéosynthèse (e.g. mTOR, S6K1, S6). Ceci indique une régulation à court-terme de l'équilibre protéosynthèse/protéolyse, dont les mécanismes et les limites restent à caractériser.

Mots clés : Adaptation, métabolisme protéique, atrogin-1, muscle, poulet.

Résumé en anglais

Environmental adaptation of protein synthesis and proteolysis in chicken muscle:

Signaling pathways involved

Molecular mechanisms underlying the short and long-term environmental adaptation of protein metabolism are not well understood. Prolonged heat exposure (32°C *vs.* 22°C) modified the expression of some genes related to protein and energy metabolism in the *Pectoralis major* muscle of chickens. The lower activation of the ribosomal protein S6 by anabolic factors at 32°C could indicate a decrease in the efficiency of mRNA translation into proteins in hot environment. These findings, associated with an impaired potential of protein synthesis, suggest a long-term alteration of muscle protein synthesis under heat conditions. Sequential distribution of diets varying in protein and/or energy contents induced drastic regulations of genes and proteins involved in the control of proteolysis (e.g. atrogin-1) and protein synthesis (e.g. mTOR, S6K1, S6) in the *Pectoralis major* muscle of chickens. This may indicate a short-term regulation of protein synthesis/proteolysis balance, whose mechanisms and limits remain to be characterized.

Key words: Adaptation, protein metabolism, atrogin-1, muscle, chickens.