

Université de Montréal

Effets de l'exercice sur la zonation du métabolisme glucidique hépatique

par

François Désy

Département de kinésiologie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor en science de l'activité physique (Ph.D.)

Avril, 2001

© François Désy, 2001



GV
201
U54
2001
v.008

Document No. 1000000000

Effect de l'ordonnance de la Commission de l'égalité territoriale

du

Président de la

Commission de l'égalité territoriale

Effect de l'ordonnance de la Commission de l'égalité territoriale

en vue de l'ordonnance de la

Commission de l'égalité territoriale (P.13)



2008-05-20

Document No. 1000000000

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Effets de l'exercice sur la zonation du métabolisme glucidique hépatique

présentée par

François Désy

Département de kinésiologie

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Président-rapporteur	Louise Béliveau
Directeur de recherche	Jean-Marc Lavoie
Membre du jury	François Péronnet
Examineur externe	Carole Lavoie
Représentant du doyen	Nobuharu Yamaguchi

Thèse acceptée le: _____

SOMMAIRE

Le foie occupe une position centrale dans la régulation du métabolisme énergétique de l'organisme. En période absorptive, il contribue à retirer de la circulation une certaine quantité de glucose qui s'avère alors en excès. En période post-absorptive, le foie libère dans la circulation du glucose de façon à répondre principalement aux besoins énergétiques du système nerveux et des globules rouges. De nombreuses évidences démontrent que les hépatocytes qui assurent cette fonction 'gluconstatique' du foie affichent une spécialisation régionale ou zonation quant à leur implication dans la régulation du métabolisme énergétique. Ainsi, toutes les fonctions hépatiques semblent s'effectuer de façon prépondérante dans l'une ou l'autre des extrémités (périportale ou périveineuse) de l'acinus hépatique. Qui plus est, cette zonation est dynamique et s'adapte aux situations particulières dans lesquelles peut être plongé l'organisme. Comme il est bien connu que l'activité physique prolongée peut provoquer certains bouleversements dans le métabolisme énergétique de l'organisme, notamment en stimulant de façon importante la néoglucogenèse hépatique, et que rien n'a encore été considéré sous l'angle de la zonation du métabolisme hépatique, la problématique de la présente thèse est de circonscrire les effets de l'activité physique sur la zonation du métabolisme glucidique hépatique.

La première étude avait pour but d'évaluer l'effet de l'exercice sur la capacité de production de glucose de cellules périportales et périveineuses de rats à jeun (18 h) ayant préalablement réalisé ou non une période d'exercice sur tapis roulant (60 min, 26

m/min, 0% pente). Les hépatocytes périportaux et périveineux, obtenus par destruction sélective à la digitonine puis par perfusion à la collagénase, ont été incubés (45 min, 37°C saturé avec 95% O₂ : 5% CO₂) avec des concentrations saturantes des substrats néoglucogéniques suivants : alanine, 20 mM ou lactate + pyruvate, 20 : 2 mM afin de déterminer le flux de production de glucose, J_{glucose}. Les résultats démontrent qu'au repos, la production de glucose à partir de substrats exogènes est significativement plus élevée chez les cellules périportales. Suite à l'exercice, le J_{glucose} à partir d'alanine est significativement plus élevé chez les deux types de cellules tandis qu'à partir du mélange lactate + pyruvate il ne l'est plus que chez les cellules périveineuses. L'augmentation de J_{glucose} suite à l'exercice apparaît donc plus importante chez les cellules périveineuses ce qui amène la disparition de la différence significative de la capacité de production de glucose des cellules périportales et périveineuses observée au repos.

Puisqu'il subsiste encore dans la littérature une certaine équivoque quant à la zonation de l'activité glycolytique, le deuxième projet avait pour but de clarifier cette situation et documenter davantage les effets de l'exercice sur la zonation de la néoglucogénèse à partir d'un autre substrat s'intégrant beaucoup plus en aval dans la voie néoglucogénique soit le dihydroxyacétone (DHA). Les cellules ont été obtenues de la même manière et dans les mêmes conditions de repos et d'exercice. Les hépatocytes ont été incubés avec des concentrations saturantes de 20 mM de DHA ou de glucose 40 mM. Les résultats montrent que la production de glucose à partir de DHA des cellules périportales et périveineuses est équivalente que ce soit au repos ou en post-exercice. La capacité glycolytique, représentée par le taux d'accumulation de lactate +

pyruvate (J_{L+P}), à partir de DHA ou de glucose, s'est également avérée équivalente entre les cellules périportales et périveineuses. Il semble donc que la capacité glycolitique des cellules périportales et périveineuses soit similaire au repos et en post-exercice.

Puisqu'il a été démontré que la néoglucogénèse à partir de l'alanine était contrôlée aux niveaux des étapes du transport de l'alanine à l'intérieur de l'hépatocytes et de sa transamination en pyruvate, le troisième projet a été entrepris dans le but de déterminer à partir de quelle(s) étape(s) de la voie néoglucogénique de l'alanine se manifestaient les différences de J_{glucose} observées entre les cellules périportales et périveineuses au repos ainsi que les effets de l'exercice. Les résultats de cette étude indiquent qu'au repos, la production de glucose des cellules périportales est significativement supérieure pour toute la gamme des concentrations d'alanine dans le milieu d'incubation (0.6, 1.2, 2.4, 4.8 et 9.6 mM). Cette différence s'explique par les différentes capacités de transport de l'alanine ainsi que par des activités différentes de transamination. En post-exercice, cette production de glucose significativement plus élevée pour les cellules périportales n'est toutefois plus significative à 9.6 mM d'alanine. En dépit du fait que l'activité maximale des enzymes néoglucogéniques ainsi que la capacité de la navette malate-aspartate soient supérieures chez les cellules périportales, ces éléments n'expliquent en rien ni la plus grande capacité de production de glucose à partir d'alanine des cellules périportales comparativement aux cellules périveineuses ni les effets de l'exercice. L'ensemble de ces données souligne l'utilité de considérer le concept de la zonation du métabolisme glucidique hépatique afin de

mettre en lumière les mécanismes d'adaptation du foie en réponse à l'activité physique prolongée.

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE	III
TABLE DES MATIERES	VII
Liste des tableaux.....	IX
Liste des figures	XI
Liste des abréviations.....	XIII
REMERCIEMENTS	XVI
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 - REVUE DE LITTÉRATURE.....	5
1.1 <i>Zonation hépatique : description anatomique</i>	6
1.2 <i>Concept de zonation du métabolisme hépatique</i>	13
1.2.1 Gradient sinusoidal	15
1.2.1.1 Gradient des substrats	16
1.2.1.2 Gradient hormonal	21
1.2.1.3 Gradient d'oxygène.....	24
1.2.1.4 Gradient du potentiel rédox.....	25
1.2.1.5 Gradient du potentiel phosphate	26
1.2.1.6 Gradient de la capacité de transport.....	27
1.2.1.7 Gradient de la densité de l'innervation.....	29
1.2.1.8 Autres gradients.....	30
1.3 <i>Zonation du métabolisme hépatique</i>	31

1.3.1	Zonation du métabolisme glucidique	32
1.3.1.1	Métabolisme du glycogène	34
1.3.1.2	Paradoxe du glucose	38
1.3.1.3	Néoglucogenèse.....	42
1.3.1.4	Glycolyse.....	49
1.3.1.5	Effets du glucagon sur le métabolisme glucidique hépatique	50
1.4	<i>Implications du foie dans la régulation métabolique à l'exercice</i>	<i>52</i>
CHAPITRE 2 – ÉTUDES EXPÉRIMENTALES		57
2.1	<i>Effects of acute exercise on the gluconeogenic capacity of periportal and perivenous hepatocytes.....</i>	<i>58</i>
2.2	<i>Effects of acute exercise on the DHA metabolism in periportal and perivenous hepatocytes.....</i>	<i>90</i>
2.3	<i>Mechanisms of the differentiation of exercise-induced gluconeogenesis from alanine in isolated periportal and perivenous hepatocytes</i>	<i>115</i>
CHAPITRE 3 - DISCUSSION		148
CHAPITRE 4 – CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....		155
RÉFÉRENCES		159

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Composition structurale du tissu hépatique et aspects de la zonation correspondants. Adapté de (49).....	7
Tableau 2 Composition structurale des cellules parenchymateuses et des mitochondries de rats. Adapté de (124).	9
Tableau 3 Situations physiologiques, pathophysiologiques et expérimentales provoquant une modification de la zonation des capacités métaboliques du foie.....	15
Tableau 4 Valeurs respectives de composés phosphatés dans les zones périportale et périveineuse. Adapté de (51).	26
Tableau 5 Zonation du métabolisme glucidique et autres fonctions métaboliques du foie . Adapté de (49,74).....	32
Tableau 6 Zonation des principales enzymes reliées au métabolisme glucidiques hépatique.....	34
Tableau 7 Flux métaboliques au sein d'hépatocytes périportaux et périveineux incubés en présence d'un mélange lactate:pyruvate (1,0:0,1 mM) . Adapté de (71). 49	49
Tableau 8 Concentrations de métabolites hépatiques de rats en situation post-exercice exprimées en pourcentage des valeurs de repos. G 6-P, glucose 6-phosphate; Fru 6-P, fructose 6-phosphate; Fru 1,6-P, fructose 1,6-biphosphate; Gly 3-P, glycérol 3-P; Glyhyde 3-P, glyceraldehyde 3-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; Pyr, pyruvate; Lac, lactate; Ac-CoA, acetyl-CoA; ATP, adénosine triphosphate; ADP, adénosine diphosphate; AMP adénosine monophosphate. Adapté de (42,43)	53
Tableau 9 Activités maximales des principales enzymes du métabolisme glucidiques hépatiques de rats en situation post-exercice exprimées en pourcentage des valeurs de repos. GK, glucokinase; G 6-Pase, glucose 6-phosphate; Fru 6-P,	

fructose 6-phosphate; Fru 1,6-P, fructose 1,6-biphosphate; PK, pyruvate
kinase; PC, pyruvate carboxylase; PEPCK, phosphoenolpyruvate
carboxykinase. Adapté de (42,43)..... 54

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Représentation schématique d'une partie du lobule hépatique . Adapté de (33).....	8
Figure 2 Zonation des éléments déterminant le microenvironnement dans lequel évoluent les hépatocytes. Adapté de (76).....	18
Figure 3 Répartition relative des éléments déterminant le microenvironnement dans lequel évoluent les hépatocytes. La valeur la plus élevée est arbitrairement fixée à 100 % dans la zone où elle est plus abondante. Adapté de (74).....	18
Figure 4 Représentations multiples des niveaux de Glu, G-6-P et du rapport Glu:G-6-P dans le lobule hépatique. Adapté de (143).....	19
Figure 5 Niveaux de glycogène hépatique au cours d'un cycle de prise alimentaire (2 h) et de jeûne (22 h) de rats nourris <i>ad libitum</i> (barres blanches) et conditionnés (barres ombrées). Adapté de (121).....	35
Figure 6 Répartition du glycogène dans le lobule hépatique au cours d'un cycle de prise alimentaire (2 h) et de jeûne (22 h) . Adapté de (121).....	37
Figure 7 Métabolisme de la glycogénèse par voie directe (traits hachurés) et par voie indirecte (traits gras).....	40
Figure 8 Répartition de l'activité maximale de la glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) dans l'acinus hépatique. Les chiffres 0 et 12 correspondent respectivement aux extrémités périportales et périveineuse de l'acinus. La planche du bas à droite représente la moyenne des trois autres . Adapté de (140).....	44
Figure 9 Répartition de l'activité maximale de la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) dans l'acinus hépatique. Les extrémités gauche et droite de chaque planche correspondent respectivement aux extrémités périportale et périveineuse de l'acinus. Adapté de (161).....	45

- Figure 10 Répartition de l'activité maximale de la lactate déshydrogénase (LDH) dans l'acinus hépatique. Les extrémités gauche et droite de la planche correspondent respectivement aux extrémités périportale et périveineuse de l'acinus. Adapté de (44). 45
- Figure 11 Répartition de l'activité maximale de l'alanine aminotransférase dans l'acinus hépatique. Les extrémités gauche et droite de la planche correspondent respectivement aux extrémités périportale et périveineuse de l'acinus. Adapté de (52). 46

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ac-CoA	acetyl-CoA
ADP	adénosine diphosphate
AMP	adénosine monophosphate
ATP	adénosine triphosphate
Fructose 1,6-P	fructose 1,6-biphosphate
Fru 6-P	fructose 6-phosphate
GK	glucokinase
G 6-P	glucose 6-phosphate
G 6-Pase	glucose 6-phosphatase
Gly 3-P	glycérol 3-P
Glyhyde 3-P	glycéraldéhyde 3-phosphate
GLUT1	transporteur de glucose de type 1
GLUT2	transporteur de glucose de type 2
h	heure
J_{glucose}	flux de glucose
J_{PK}	flux à travers l'enzyme pyruvate kinase
J_{PEPCK}	flux à travers l'enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase
Lac	lactate
mg	milligramme
mmHg	millimètres de mercure
m	mole
M	molaire
n	nano

Pi	phosphate inorganique
PC	pyruvate carboxylase
PEP	phosphoénolpyruvate
PEPCK	phosphoénolpyruvate carboxykinase
PK	pyruvate kinase
PP	périportal
PV	périveineux
Pyr	pyruvate
vs	versus
µm	micromètre

À la mémoire de mon père...

REMERCIEMENTS

Je désire remercier tous ceux qui ont contribué aux projet de cette thèse : Dr. Jean-Marc Lavoie pour son support et son ouverture d'esprit qui a fait en sorte que j'ai pu explorer une nouvelle problématique; Dr Marielle Gascon-Barré et le technicien Jean-Luc Petit pour m'avoir permis d'acquérir la technique d'isolation sélective d'hépatocytes; Dr Yan Burelle pour son expertise et ses judicieux conseils; Patrice Bélanger, Karine Couturier et Marie-Soleil Gauthier, confrère et consœurs de labo pour leur bonne humeur, leur encouragement et surtout pour le franc esprit d'entraide qui règnait dans le labo, ainsi que Karine Legendre pour son aide technique précieuse et sa disponibilité. Je désire également remercier Le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et Génie du Canada (C.R.S.N.G.), le Fond de Recherche en Santé du Québec (F.R.S.Q) ainsi que le Fond pour les Chercheurs et l'Aide à la Recherche. (F.C.A.R.) pour leur support financier.

Je tiens à remercier ma famille, parents et beaux-parents pour leurs encouragements soutenus et tout particulièrement Ginette pour son amour, support et compréhension indéfectibles ainsi que Xavier qui, d'un seul gazouillis, réussit à dissiper tous les sentiments négatifs possibles pour ne laisser place qu'à ceux témoignant de l'émerveillement que procure la vie.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Plusieurs des fonctions du foie, notamment celles qui ont trait au métabolisme énergétique, ont été étudiées soit au niveau de la réponse intégrée de l'organe *in vivo* ou au niveau des mécanismes intracellulaires, plusieurs expérimentations utilisant un homogénat de foie à partir duquel les chercheurs ont défini plusieurs caractéristiques biochimiques se rapportant aux hépatocytes. Toutefois, il est de mise de considérer que la cellule hépatique fonctionne au sein d'un environnement défini que lui confère l'acinus hépatique et que ce sont les caractéristiques particulières de cet environnement qui contribuent à créer une certaine hétérogénéité fonctionnelle des hépatocytes. La distribution du débit sanguin est telle que le retrait et la mise en circulation progressifs de certains solutés au fur et à mesure que le sang circule dans les sinusoides, génèrent des gradients de concentrations qui ne sont pas sans influencer le métabolisme des cellules. La contribution des hépatocytes au transport et au métabolisme de multiples composés est donc différente selon la position spécifique au sein de l'acinus hépatique de chacune des cellules considérées. De plus, l'existence de certaines différences cellulaires intrinsèques, notamment en ce qui a trait à certains organites comme les mitochondries, exerce également une influence sur le degré de contribution des hépatocytes dans la réalisation des fonctions hépatiques. Dans ce contexte, chacune des réponses du foie *in vivo* en réaction aux perturbations du milieu interne que peut subir l'organisme, peut être considérée, à juste titre, comme étant l'intégration ou la résultante de tous les événements intracellulaires se déroulant à différents degrés dans les hépatocytes de chaque zone déterminée par la microvascularisation du foie. Le danger de négliger le fait que les hépatocytes

fonctionnent normalement dans un cadre structural situé dans un environnement aux caractéristiques bien définies était déjà souligné par J.W. Wilson, en 1958, qui soutenait que : ‘ dans la pensée des biochimistes et des physiologistes, la cellule hépatique est dangereusement près de devenir ‘La Cellule’ et ce, avec raison, puisqu’elle contient toutes les caractéristiques structurales d’une cellule typique et qu’elle se prête bien à un important nombre de procédures expérimentales. Cependant, les cellules du foie peuvent ne pas toutes faire la même chose en même temps et une même cellule peut ne pas faire les mêmes choses tout le temps.’ (58). De plus, le même auteur écrivait également que ‘Dans notre laboratoire, nous en sommes venus à penser que les hépatocytes, bien que structurellement et potentiellement semblables, sont habituellement différents sur la base de différences dans leurs positions dans le lobule... nous avons conçu que les cellules portales, habituellement, métabolisent et emmagasinent les glucides alors que les cellules centrales ne le font qu’en cas d’urgence tandis que les cellules centrales, habituellement, métabolisent et emmagasinent les lipides alors que les cellules portales ne le font qu’en cas d’urgence. Bien que cela manque encore de précision significative, nous avons trouvé une hypothèse utile pour réfléchir sur les nombreux problèmes intrigants de la physiologie et de la pathophysiologie du foie’ (106). La nécessité de considérer cette hétérogénéité fonctionnelle du foie plutôt que simplement l’organe dans son ensemble s’avère un constat de plus en plus partagé par la communauté scientifique.

L’implication du foie dans la régulation métabolique et hormonale en réponse à l’exercice est manifeste. Toutefois, la littérature semble dépourvue de travaux relatifs à l’étude des mécanismes d’adaptations hépatiques à l’activité physique sous l’angle de

la zonation métabolique du foie. Cette voie semble, du moins potentiellement, constituer un aspect non négligeable de la réalité physiologique de l'exercice et pourrait comme elle l'a fait dans le passé dans le cas du paradoxe du glucose, permettre de réconcilier certaines données, apparemment divergentes de la littérature.

CHAPITRE 1 - REVUE DE LITTÉRATURE

1. REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Zonation hépatique : description anatomique

Le foie représente le plus grand organe viscéral chez les mammifères. Chez l'humain, il se situe sous le diaphragme soit presque totalement à l'intérieur de la cage thoracique et s'étend davantage du côté droit du plan médian du corps (33). Le foie est proportionnellement plus massif chez le rat où il compte pour environ 4 % de la masse corporelle (34), soit un foie de 12 g pour une masse corporelle de 300 g contre 2 % approximativement pour l'humain, soit un foie de 1.5 kg (124) pour une masse corporelle de 70 kg. Le foie se divise en quatre lobes : le lobe médian ou cystique, le lobe latéral droit, le lobe gauche et le lobe caudé.

Le foie est composé de cellules parenchymateuses (les hépatocytes) et de cellules non-parenchymateuses dont l'importance relative en termes du nombre de cellules ou du volume qu'elles occupent est représentée au tableau 1.

Tel que représenté en partie dans la figure 1, l'unité de l'organisation structurale du foie est le lobule hépatique qui a une forme polygonale et mesure environ 0.7 mm X 2 mm (33). Chez certains animaux, une mince couche de tissu sépare les lobules tandis que chez l'humain, les lobules sont pratiquement tous en contact ce qui complique la détermination exacte des environnements lobulaires. Toutefois, une juxtaposition de différents tissus dans certaines régions permet une démarcation. Ces tissus forment la triade portale et sont composés de trois vaisseaux soient : une artériole hépatique, une

Tableau 1 Composition structurale du tissu hépatique et aspects de la zonation correspondants.
Adapté de (49).

Type de cellules	% du nombre de cellules total	% du volume total	Zonation
Hépatocytes	60-65	78	Plus volumineuses en zone III
Cellules Endothéliales	15-20	2.8	Plus larges mais plus grande porosité en région périveineuse
Cellules de Kupffer	8-12	2.1	Plus nombreuses en zone périportale mais activité de phagocytose accrue dans la zone périveineuse
Cellules Ito	3-8	1.4	Légère prédominance dans la zone périportale
Pit cells	< 2	-	-

veinule hépatique et un canal biliaire. Le foie humain comporte ainsi 3 à 6 triades portales par lobule (33). Le plus gros de ces vaisseaux est la veinule hépatique, ayant pour origine la veine porte hépatique qui achemine environ 80 % du débit sanguin aux hépatocytes, le 20 % restant étant acheminé par l'artère hépatique. Adapté de (33).

Les hépatocytes sont disposés de façon radiale au sein du lobule formant ainsi des rayons d'une à deux cellules d'épaisseur. Selon la position qu'ils occupent dans l'acinus, les hépatocytes peuvent être divisés en trois zones : I, II et III. Les hépatocytes disposés en périphérie de la triade dont le principal vaisseau est la veine porte, constituent les cellules de la zone I ou cellules périportales tandis que les cellules disposés en périphérie de la veine hépatique terminale ou centrale constituent les cellules de la zone III ou cellules périveineuses. Les cellules situées entre ces deux

zones constituent par défaut les cellules de la zone II également appelées ‘midzonal cells’.

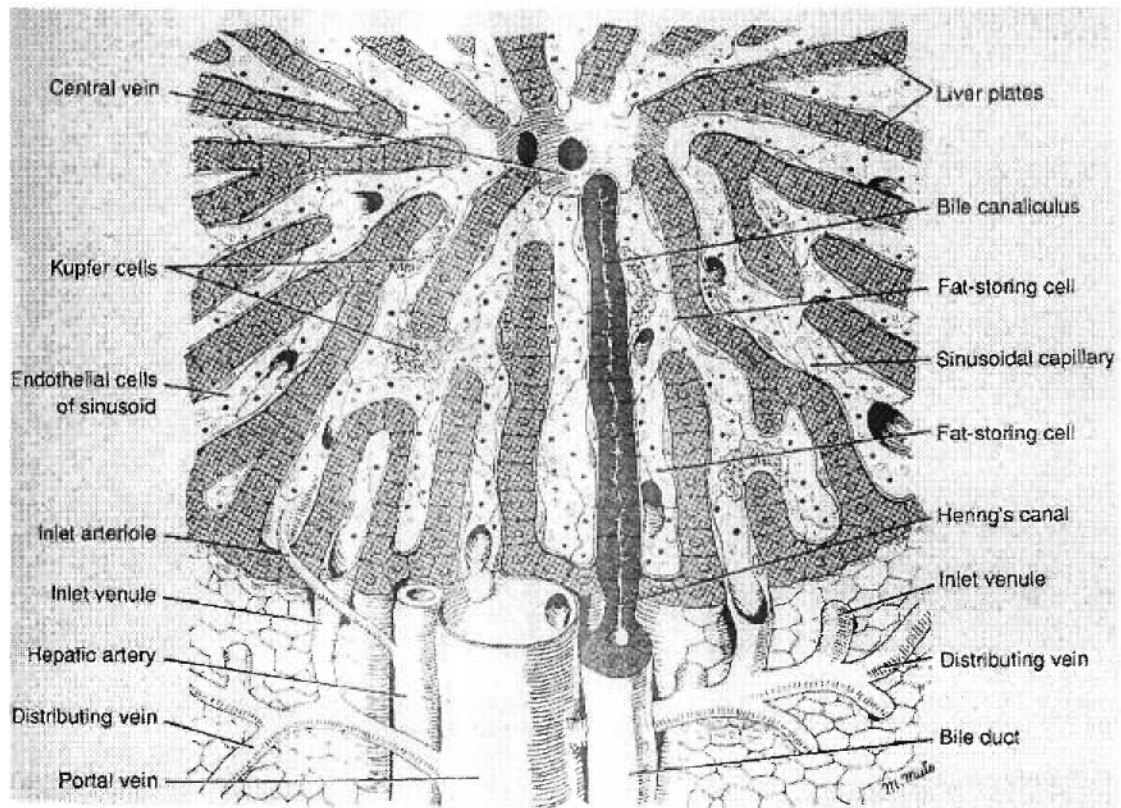


Figure 1 Représentation schématique d'une partie du lobule hépatique . Adapté de (33).

Par souci de commodité, il est considéré que les zones I et III contiennent chacune environ 20 % des hépatocytes, les 60 % restant étant des cellules appartenant à la zone II (94). Puisque dans un sinusoiide environ 20 hépatocytes séparent une veinule portale d'une veinule hépatique terminale (58), il est permis de considérer que, globalement, on y retrouve 4 hépatocytes de la zone I, 12 hépatocytes de la zone II et 4 hépatocytes de la zone III.

Selon la position qu'ils occupent ou la zone de laquelle ils proviennent, les hépatocytes démontrent des différences marquées quant à leurs caractéristiques morphologiques, biochimiques et fonctionnelles (132). Considérant que certains hépatocytes sont mononucléés et d'autres binucléés, il est de mise d'exprimer les valeurs se rapportant aux organites intracellulaires sous un seul dénominateur commun soit par noyau cellulaire. Cet exercice apparaît valide puisqu'il semble que les cellules binucléées possèdent effectivement deux fois le volume des cellules mononucléées de sorte que le volume par noyau représente de façon satisfaisante le volume d'une cellule mononucléée moyenne (94).

Comme le volume cellulaire est d'environ $5400 \mu\text{m}^3$ et que le volume d'un noyau est de $280 \mu\text{m}^3$, le volume du cytoplasme par noyau qui en résulte est donc de $5100 \mu\text{m}^3$ comme le montre le tableau 2.

Tableau 2 Composition structurale des cellules parenchymateuses et des mitochondries de rats. Adapté de (124).

Paramètre	Zone I	Zone II	Zone III
Volume μm^3			
cytoplasme	5100	5100	5100
mitochondries	995 - 1010	974 - 1046	658 - 765
lysosomes	10 - 15	10 - 15	20
lipides	5 - 10	10	10
glycogène	984 - 1050	887 - 1100	857 - 867
Mitochondries			
nombre	1060 - 1160	1300 - 1480	1530 - 1600
Diamètre moyen μm	0.562 ± 0.017	0.471 ± 0.024	0.323 ± 0.012
Longueur moyenne μm	3.85 ± 0.67	4.32 ± 0.40	5.04 ± 1.38
Volume moyen μm^3	0.954 ± 0.158	0.752 ± 0.112	0.411 ± 0.092

Le volume occupé par les mitochondries de la plupart des hépatocyte est de près de 20 %. Cependant, ce pourcentage est significativement inférieur dans les cellules de la zone III ou centrilobulaires, ceci étant particulièrement le cas pour les deux premières rangées de cellules entourant la veine hépatique centrale (94). Les mitochondries des cellules de la zone III apparaissent donc de taille plus petite, de forme plus allongée et beaucoup moins volumineuses que celles de la zone I mais elles sont, en revanche, plus nombreuses.

Le glycogène mesuré dans cette étude (94) occupe un volume sensiblement équivalent à celui des mitochondries et semble être réparti de manière quasi-uniforme au sein des hépatocytes des trois zones mais il est certain que cette caractéristique illustrée ici ne l'est que d'une façon ponctuelle. L'auteur conclut néanmoins que de retrouver de telles concentrations de glycogène dans toutes les parties du lobule hépatique après une nuit où la nourriture était continuellement disponible, suggère que les niveaux de glycogène mesurés sont probablement parmi les plus élevés que les hépatocytes puissent contenir en situation normale. Malgré le fait que les données quantitatives ne le démontrent pas, il est à noter que le glycogène retrouvé dans les cellules de la zone III est généralement dispersé en petits agrégats à travers le cytoplasme, le plus souvent associé aux membranes du réticulum endoplasmique lisse. À l'opposé, le glycogène des cellules de la zone I se présente davantage en larges agrégats qui s'amoncellent sur une plus grande surface en étant significativement moins associés aux membranes du réticulum endoplasmique lisse (94).

Il semble exister dans la littérature une certaine discordance quant aux volumes des hépatocytes. Ainsi dans l'étude de Loud (94), il ne semble pas exister de différences quant au diamètre des cellules qui est respectivement (en μm) de $20,8 \pm 0,2$ dans la zone I, $20,8 \pm 0,3$ dans la zone II et $21,0 \pm 0,3$ dans la zone III. Si l'on considère le diamètre des cellules comme indice de leur volume, il serait alors permis de conclure que tous les hépatocytes ont le même volume peu importe leur origine. Une autre source (8) indique cependant que les hépatocytes périportaux de souris adultes sont beaucoup plus petits que les hépatocytes périverneux (4448 ± 347 vs $8033 \pm 1182 \mu\text{m}^3$). Bien qu'il semble que les hépatocytes aient été obtenus dans des conditions assez semblables dans les deux études : sacrifice à 10:00 AM suivant une nuit où la nourriture (lab chow commercial) était continuellement disponible. Toutefois, il est impératif de considérer que les hépatocytes sont sujets à subir des variations importantes de leur volume selon les activités métaboliques qui se déroulent au sein de ceux-ci. Il semble effectivement que des variations de l'état d'hydratation cellulaire (i.e. volume cellulaire (62)) puissent constituer un important mécanisme de régulation du métabolisme et agir à titre de second ou troisième messager, reliant ainsi les fonctions cellulaires aux changements hormonaux dans l'environnement des cellules. De façon générale, un environnement hyper-osmolaire ou la présence de certains composés comme le glucagon, serait associé à un rétrécissement ou réduction du volume cellulaire ce qui entraînerait un signal catabolique dans la cellule tandis qu'un environnement hypo-osmolaire ou la présence de certains composés comme l'insuline, serait associé à un gonflement ou accroissement du volume cellulaire ce qui entraînerait un signal anabolique dans la cellule (62). Il est donc permis de penser qu'avec les successions d'activités anaboliques et cataboliques, incluant donc la

synthèse et la dégradation du glycogène, dictée par les périodes de prise alimentaire, que le volume des hépatocytes n'est jamais constant et que sa mesure ne donne conséquemment que des valeurs ponctuelles. Aucune étude dans la littérature, à ce jour, ne semble avoir été dévolue à l'étude des caractères spécifiques des changements de volume des hépatocytes périportaux et périveineux.

Le sang et tout ce qu'il contient circule entre les rangées d'hépatocytes par les sinusoides de la triade portale jusqu'à la veine centrale pour sortir du foie, traversant l'acinus tel que représenté à la figure 1.

Les sinusoides représentent un type de capillaires composé simplement d'une rangée discontinue de cellules endothéliales fenestrées dont la forme sinueuse ralentit le débit de la circulation sanguine (49). Le diamètre des sinusoides semble augmenter de la région périportale à la région périveineuse (32) passant ainsi de 5,9 μm à 7,1 μm (166). De plus, les cellules endothéliales retrouvées dans la région périveineuse sont plus larges que celles de la région périportale. Il est également possible d'observer un certain gradient le long des sinusoides quant au diamètre des fenêtres qui passe de $110,7 \pm 0,25$ nm dans la zone périportale à $104,8 \pm 0,22$ nm dans la zone périveineuse. Cependant, la densité des fenêtres augmente de 9 à 13 par μm^2 ce qui fait augmenter la porosité de 6 % à 8 % (166). Puisque tous les solutés du sang destinés à être pris par le foie doivent nécessairement se faufiler par les fenêtres dans la rangée de cellules endothéliales, il semble bel et bien que l'ensemble des paramètres structuraux dont les valeurs changent selon un gradient porto-veineux, favorisent donc les échanges de substances (retrait ou mise en circulation) au niveau de la région périveineuse (23).

Les cellules endothéliales sont séparées des hépatocytes par les espaces de Disse dans lesquels se trouvent des cellules capables de phagocytose, les cellules de Kupffer. Malgré le fait qu'on retrouve davantage de cellules de Kupffer dans la région périportale (22), la phagocytose est prépondérante dans la zone périveineuse (137).

L'espace de Disse contient également un autre type de cellules, capables d'accumuler des lipides (fat storing cells) ou cellules Ito (25.3 % de leur volume est constitué de dépôts lipidiques (124)) qui sont légèrement plus nombreuses dans la région périveineuse (49).

Enfin, une classe de cellules sinusoidales dont l'intérêt est relativement récent est celle des 'pit cells' nommées ainsi en raison de leur apparence granulaire. Il semble que ces cellules soient de grands lymphocytes et qu'ils soient répartis uniformément dans le parenchyme hépatique (124).

Bien que ces différences quant à la distribution et aux caractéristiques des cellules non-parenchymateuses puissent suggérer diverses interactions fonctionnelles avec les hépatocytes, force est de constater que la littérature demeure encore embryonnaire à ce sujet jusqu'à présent.

1.2 Concept de zonation du métabolisme hépatique

La première étude publiée portant sur l'hétérogénéité fonctionnelle des hépatocytes est celle de Beale en 1856, soulignant la contribution différente des hépatocytes à la sécrétion de bile (rapporté de (49,57)). Ensuite, bon nombre d'études portant sur les

différences morphologiques ou enzymatiques se sont succédées jusqu'à ce que, à la fin des années 70, Jungermann et Sasse (123,125) proposent une véritable implication fonctionnelle aux différentes caractéristiques des hépatocytes énumérées jusqu'alors. L'idée générale du concept de la zonation métabolique est dérivée de plusieurs études sur le métabolisme des glucides suggérant notamment que des voies métaboliques opposées, comme la néoglucogenèse et la glycolyse, puissent être actives simultanément au sein des hépatocytes périportaux et périveineux respectivement (81). C'est donc dire que les caractéristiques intrinsèques des cellules ainsi que la répartition inégale des différentes enzymes confèrent à certains groupes d'hépatocytes une capacité accrue de réaliser l'une ou l'autre des multiples fonctions hépatiques. Les termes employés pour traduire cette réalité sont aussi divers que nombreux : hétérogénéité des hépatocytes, zonation métabolique, compartimentation intra-lobulaire, spécialisation fonctionnelle, distribution intra-acinaire (intraacinar distribution), subpopulation hépatocytaire (hepatocyte subpopulation), localisation fonctionnelle, régionalité, variation à l'intérieur du lobule hépatique de fonction de l'hépatocyte. Le fait que cette zonation métabolique soit dynamique et s'adapte selon plusieurs situations physiologiques, pathologiques et expérimentales (tableau 3) constitue un important mécanisme par lequel le foie répond aux différents besoins énergétiques de l'organisme (49).

Tableau 3 Situations physiologiques, pathophysiologiques et expérimentales provoquant une modification de la zonation des capacités métaboliques du foie.

Situations	Références
Physiologiques	
développement	(19,72,78,82,122,125,149,153,163)
jeûne	(47,72,83,138,141,161,171)
Pathophysiologiques	
diabète sucré (induit)	
streptozotocine	(30,68,99,162)
alloxane	(72,99,100)
cirrhose hépatique (induit)	
thioacetamide	(107)
Expérimentales	
Diète protéique ou lipidique	(164)
Diabète induit par streptozotocine et administration d'oestrogène	(162)
Administration d'hormones sexuelles : estradiol et testostérone	(160)
Hépatectomie partielle	(6,25,35,72,151)
Anastomose porto-cavale	(168)
Adaptation au froid	(129,131)

1.2.1 Gradient sinusoidal

En traversant l'acinus, le sang se départit progressivement de tous les composés qui peuvent être captés par les hépatocytes et s'enrichit de tous ceux qui peuvent être produits par les hépatocytes. En fait, les concentrations sont directement déterminées par le métabolisme même des hépatocytes au moment précis où chacun des composés traverse l'acinus (74). Ceci amène conséquemment des changements dans la concentration des métabolites dans toutes les sections de l'acinus et crée, par le fait même, des gradients de concentration dont les valeurs peuvent se trouver modifiées à n'importe quel endroit de l'acinus.

Pour un bon nombre d'éléments, les variations de concentrations sont directement proportionnelles à la distance franchie entre la première cellule périportale et la dernière cellule périveineuse. Il existe cependant d'autres gradients qu'on peut retrouver au sein des hépatocytes d'un acinus qui n'ont pas trait à la composition du sang, entre-autre la densité de l'innervation qui fait l'objet d'une partie de cette thèse.

Il est de mise de considérer que toutes ces différences retrouvées au sein de l'acinus hépatique constituent autant de différences dans l'environnement dans lequel évoluent les hépatocytes qui sont susceptibles de contribuer à l'hétérogénéité fonctionnelle des hépatocytes (49). Certaines données de la littérature tirées d'études où l'on a procédé à la transplantation d'hépatocytes (hépatocytes périportaux transplantés dans un environnement périveineux et vice-versa) démontrent bel et bien que le microenvironnement dans lequel se situent les hépatocytes constitue le facteur prépondérant quant à l'expression génique et les fonctions qui leur sont propres (37,60).

Les figures 2 et 3 représentent la zonation de ces signaux susceptibles d'influencer le métabolisme des hépatocytes et par le fait même d'expliquer la nature de l'induction de la zonation métabolique des hépatocytes.

1.2.1.1 Gradient des substrats

Pour la plupart des substrats associés au métabolisme des glucides, le gradient de concentration portal hépato-veineux (représentatif de l'environnement du début de la zone périportale et de la fin de la zone périveineuse) est présent mais relativement

faible. Ainsi, on a mesuré un rapport portal/veineux de 0.8 et 1.3 pour le glucose et de 0.8 et 1.6 pour le lactate dans les phases absorptives et de jeûne respectivement et un rapport de 1.5 pour l'alanine (49). Certains substrats montrent néanmoins un rapport beaucoup plus appréciable comme c'est le cas pour le glycérol : 2.2, les acides gras : 1.5 à 2.1, les corps cétoniques : 0.5 et d'autres substrats comme l'acétate : 1.9 et 1.3, le propionate : 24 et 9, le butyrate : 15 et 4 dans les phases absorptives et de jeûne respectivement (49). Puisque ces substrats et produits sont pris et relâchés par les cellules via des systèmes de transport, il demeure encore inconnu jusqu'à quel point ces gradients de concentrations sanguines se transmettent à l'intérieur des cellules. Certaines études, dans lesquelles les mesures ont été effectuées dans le milieu intracellulaire, ont néanmoins permis de démontrer que le rapport glucose/glucose 6-phosphate était deux fois supérieurs dans les cellules périveineuses que dans les cellules périportales (142-144). À cet égard, le travail monastique de Teutsch (143) est illustré à la figure 4 où sont représentées les concentrations de glucose (périportal < périveineux) et de glucose 6-phosphate (périportal > périveineux) ainsi que les rapports glucose/glucose 6-phosphate dans le lobule hépatique.

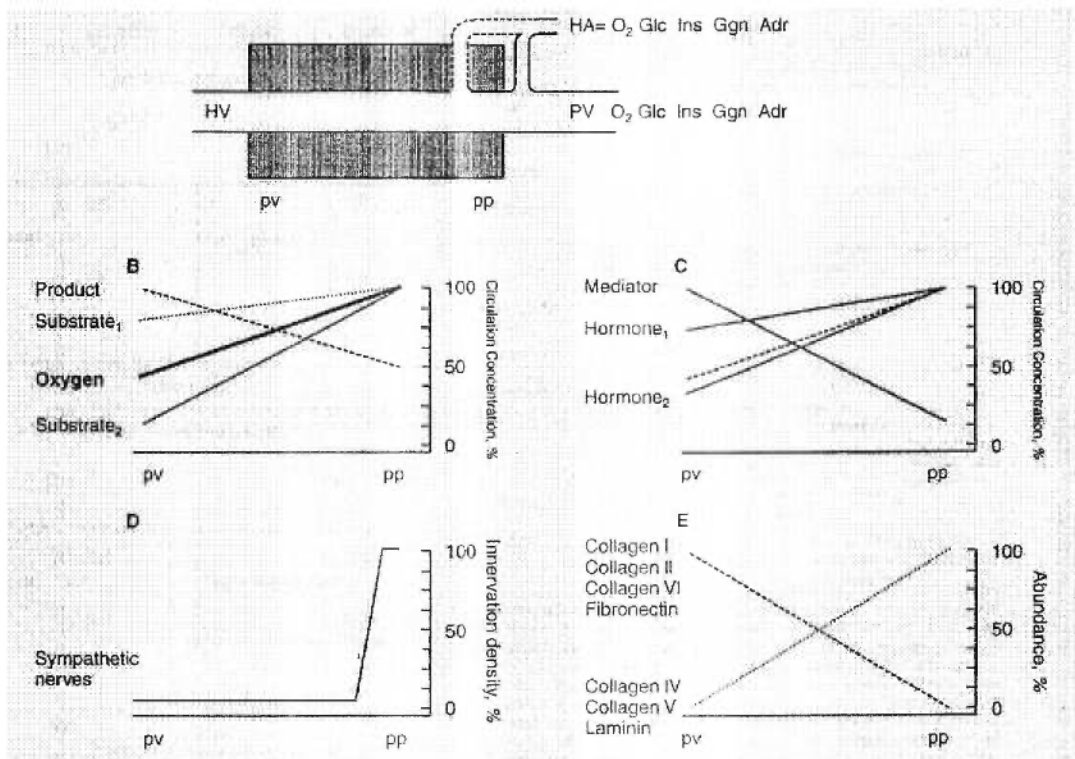


Figure 2 Zonation des éléments déterminant le microenvironnement dans lequel évoluent les hépatocytes. Adapté de (76).

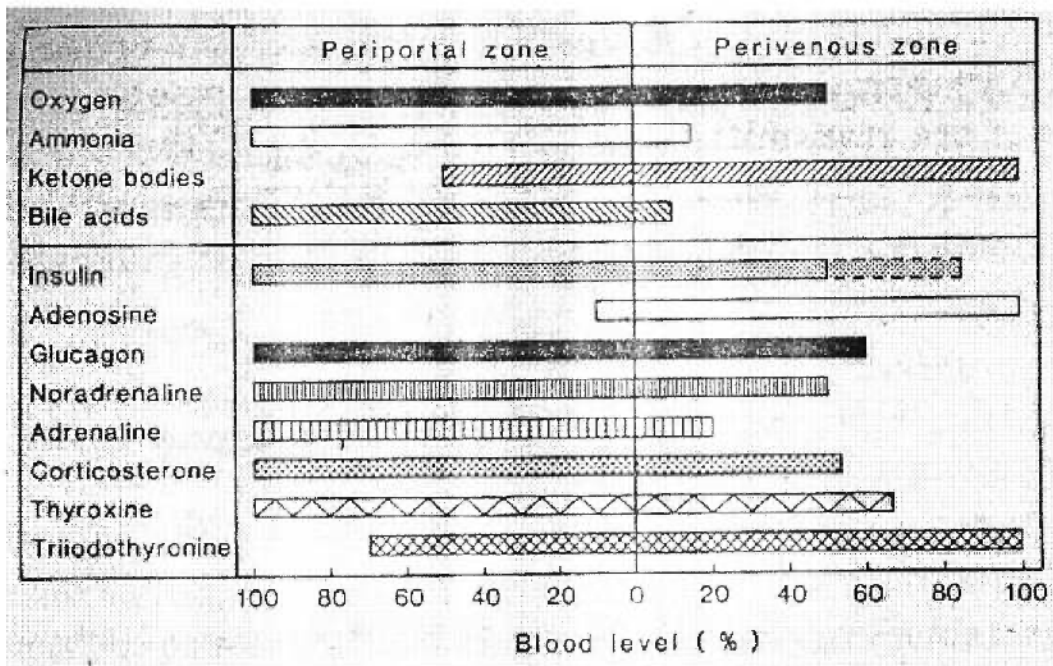


Figure 3 Répartition relative des éléments déterminant le microenvironnement dans lequel évoluent les hépatocytes. La valeur la plus élevée est arbitrairement fixée à 100 % dans la zone où elle est plus abondante. Adapté de (74).

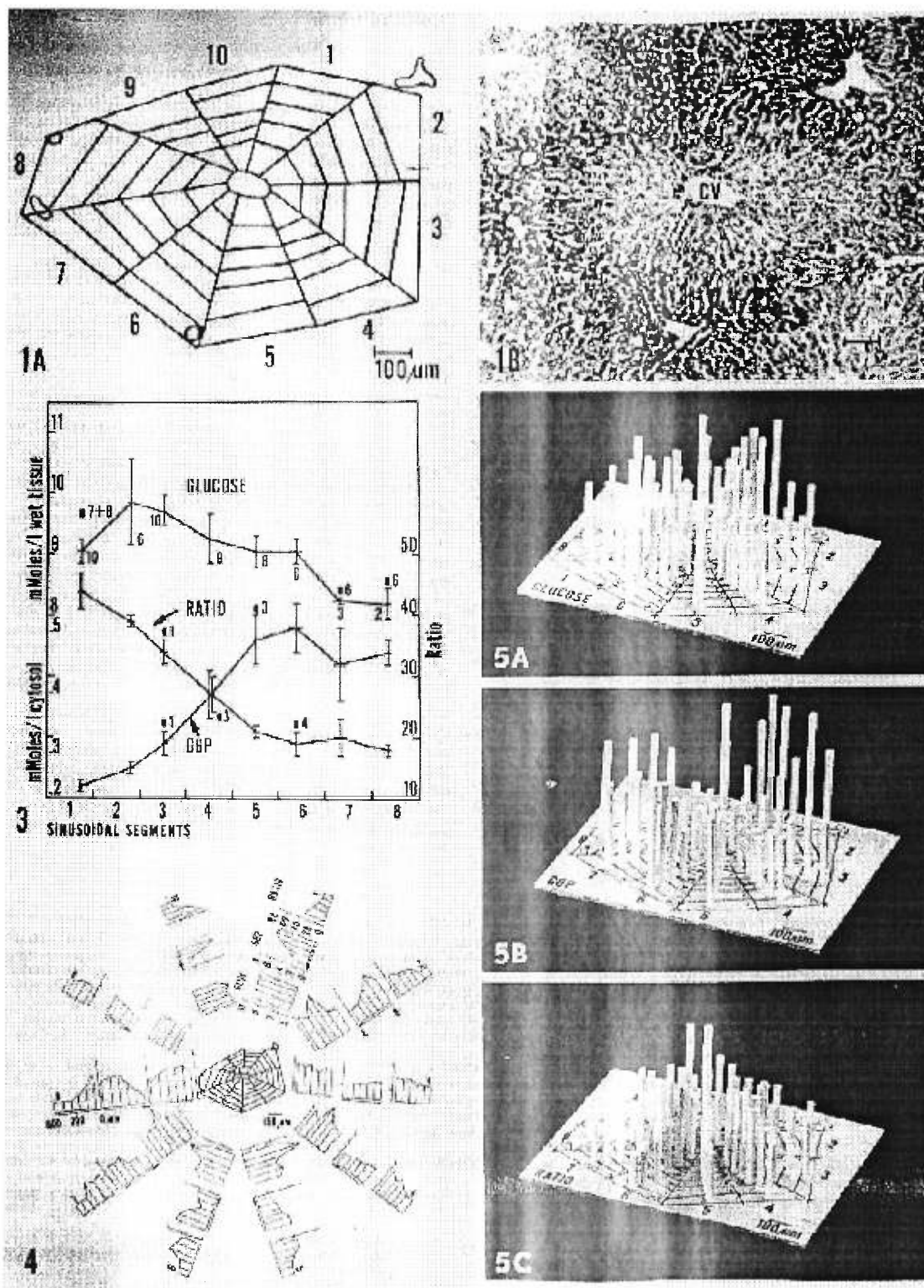


Figure 4 Représentations multiples des niveaux de Glu, G-6-P et du rapport Glu:G-6-P dans le lobule hépatique. Adapté de (143).

Utilisant la technique du 'dual digitonin pulse', permettant de mesurer des métabolites dans le perfusat après avoir détruit successivement les cellules périportales et périveineuses du même foie, Quistorff rapporte une concentration de glycérol-3-phosphate deux fois plus importante dans les hépatocytes de la zone périveineuse (117). Cette mesure s'avère cependant discordante avec l'étude de Ghosh où les mesures des concentrations de glycérol-3-phosphate et de dihydroxyacétone phosphate ne sont pas significativement différentes (51). Il est à noter que même si les mesures semblent avoir été effectuées auprès d'animaux dans la même condition métabolique (nourris) les rats étaient des mâles dans l'étude de Quistorff et des femelles dans l'étude de Ghosh, ce qui peut potentiellement expliquer les conclusions différentes des deux études.

Il a été abondamment démontré que le fructose-2,6-biphosphate joue un rôle important dans la régulation de la néoglucogenèse et de la glycolyse (112,152). Le fructose-2,6-biphosphate s'avère un important stimulateur de la phosphofructokinase ainsi qu'un inhibiteur de la fructose-2,6-biphosphatase. La quantité de fructose-2,6-biphosphate dans la cellule permet donc d'aiguiller en quelque sorte le flux des composés du métabolisme glucidique vers la synthèse ou la dégradation du glucose. Puisque le concept de zonation métabolique indique que la synthèse du glucose et du glycogène à partir de composés à trois carbones (voie indirecte) est davantage réalisée par les cellules périportales tandis que la synthèse de glycogène à partir du glucose (voie directe) est davantage réalisée par les cellules périveineuse, certains auteurs ont proposé qu'une différence de la concentration de fructose-2,6-biphosphate entre les types de cellules pouvait expliquer ce phénomène (88,113). Il semble toutefois que les

concentrations de fructose-2,6-biphosphate dans les zones périportales et périveineuses soient équivalentes (154). Cependant, comme tant d'autres métabolites, les concentrations de fructose-2,6-biphosphate sont susceptibles d'être modifiées dans certaines conditions physiologiques particulières, à l'exercice notamment (43), et le fait que les niveaux de ce métabolite aient été rapportés équivalents dans les zones périportales et périveineuses ne traduit probablement qu'un segment de la réalité physiologique concernant le métabolisme du fructose-2,6-biphosphate.

1.2.1.2 Gradient hormonal

Durant le passage du sang à travers le foie, la concentration de plusieurs hormones régissant le métabolisme glucidique, insuline et glucagon notamment, diminuent puisque le foie constitue le site où s'opère leur dégradation (10,61). D'ailleurs, il semble que l'extraction hépatique des hormones pancréatiques régule à la fois le métabolisme du glucose hépatique et les concentrations périphériques de ces hormones (69).

1.2.1.2.1 Insuline

Le taux d'extraction de l'insuline par le foie est dynamique et bien qu'il soit généralement accepté qu'environ 50 % de l'insuline arrivant au foie soit extrait de la circulation en un seul passage (10,53,69), ce pourcentage peut varier grandement et l'on a même rapporté des niveaux d'extraction d'insuline de 45 % et dans un état de jeûne et de presque 0 % dans un état bien nourri (rapporté de (10)). Balks et Jungermann (10) ont également noté des changements similaires, suite à l'observation

d'un cycle normal d'alimentation de 24 h (accès à la nourriture 12 h sur 24 h). Ainsi, le taux d'extraction de l'insuline est passé de 52 % à la fin de la période de privation de nourriture à 25 % durant la phase de prise alimentaire (10). Considérant ces chiffres, il est permis de conclure que le gradient de concentration de l'insuline qui se forme entre la première cellule périportale et la dernière cellule périveineuse est d'environ de 1,9 en période de jeûne et environ de 1,1 en période de prise alimentaire. Bien qu'on puisse chiffrer ces valeurs de gradients, cela ne nous donne pas d'information concernant l'endroit précis dans le lobule où il prend place, encore faut-il considérer les capacités d'extraction respectives des cellules périportales et périveineuses. La littérature n'offre pas encore de réponses à cet égard, mais récemment, Kronen, Kietzmann et Jungermann proposaient que le récepteur de l'insuline, bien que détectable chez tous les types d'hépatocytes, l'était de façon prédominante chez les hépatocytes périveineux (87). Ceci va tout à fait de pair avec le principe de la zonation métabolique suggérant que la zone périveineuse soit le lieu privilégié où se produisent les activités métabolique permettant de disposer du glucose soit en le dégradant par la glycolyse ou en le stockant par la glycogénèse par voie directe (74,75). Il est à noter, toutefois, que l'ARNm codant pour le récepteur de l'insuline est, lui, réparti uniformément ce qui suggère donc une régulation post-transcriptionnelle de la zonation du récepteur de l'insuline (87).

1.2.1.2.2 Glucagon

Le taux d'extraction du glucagon par le foie est également dynamique. Dans la même étude illustrant les variations de l'extraction de l'insuline au cours d'un cycle normal d'alimentation de 24 h (accès à la nourriture 12 h sur 24 h) chez le rat (10), les auteurs

rappellent que le taux d'extraction du glucagon passe de 20 % au tout début de la période de privation de nourriture à 38 % 12 h plus tard. Si l'on refait le même exercice que pour l'insuline, le gradient de concentration du glucagon qui se forme entre la première cellule périportale et la dernière cellule périveineuse est d'environ de 1,6 en période de jeûne et environ de 1,3 en période de prise alimentaire. Selon le concept de la zonation métabolique, la zone périportale est davantage responsable des voies métaboliques menant à la production de glucose soient la glycogénolyse et la néoglucogenèse (74,75). La prédominance de l'ARNm du récepteur du glucagon dans la zone périportale (86) va également de pair avec le concept de zonation métabolique puisque les deux activités métaboliques décrites précédemment sont orchestrées, entre autres, par le glucagon. Qui plus est, de récentes évidences portent à croire que la régulation de l'expression de l'ARNm du récepteur du glucagon tient du même paradigme que celui de l'œuf et de la poule car elle pourrait être assurée par le flux de substrats dans les voies glycolytique et néoglucogénique (27).

L'insuline et le glucagon, peuvent être considérés comme des éléments majeurs de la régulation ou des mécanismes sous-jacents au phénomène de la zonation métabolique hépatique. Probst, Schwartz et Jungermann ont démontré qu'en mettant en culture 48h une partie des hépatocytes fraîchement isolés, sans tentative de repérer ou quantifier leur origine, dans un milieu riche en glucagon (10 nM) et l'autre partie des hépatocytes dans un milieu riche en insuline (10 nM), il était possible d'induire chez ces cellules des profils périportal et périveineux respectivement (114). Le profil se dénote ici par une prédominance de l'enzyme PEPCK et de l'activité néoglucogénique chez les cellules ayant séjourné en culture avec du glucagon et une prédominance des

enzymes glucokinase (GK), phosphofruktokinase (PFK) et pyruvate kinase (PK) chez les cellules ayant séjourné en culture avec de l'insuline. Ces données supportent donc l'hypothèse selon laquelle le rapport insuline/glucagon qui prévaut dans l'environnement immédiat de chaque hépatocyte est susceptible de changer son profil et que chaque situation physiologique, pathophysiologique ou expérimentale qui entraîne une perturbation de ce rapport est également susceptible d'entraîner un changement de la zonation métabolique.

1.2.1.3 Gradient d'oxygène

Au cours de son passage dans les sinusoides, le sang se départit d'une partie de son oxygène ce qui cause des variations de concentration d'oxygène le long de l'acinus. Ainsi, la pression partielle d'oxygène dans la région périportale est d'environ 65 mmHg (95 mmHg dans le sang artériel et 45-55 mmHg dans la veine porte donc environ 65 mmHg dans le sang mélangé à l'entrée de la zone portale (170)) et peut être réduite à environ 35 mmHg dans la région périveineuse. Au même titre que les hormones pancréatiques, l'oxygène semble également représenter un déterminant majeur de la zonation hépatique en agissant sur la régulation à court terme des voies métaboliques de production et d'utilisation du glucose ainsi que dans l'induction et le maintien à long terme des différences périportales/périveineuses quant au contenu cellulaire des enzymes reliées au métabolisme glucidique (76). Les effets que peut exercer différentes concentrations d'oxygène, à court et à long termes, touchent littéralement à toutes les étapes du métabolisme glucidique (169,170).

1.2.1.4 Gradient du potentiel rédox

Les notions fondamentales de chimie définissent l'oxydation comme une perte d'électrons et la réduction comme un gain d'électrons. Les enzymes impliquées dans les processus d'oxydation sont des oxydoréductases, dont une sous-classe, les déshydrogénases anaérobies, catalysent le transfert d'atomes d'hydrogène à un composé autre que l'oxygène (54). L'échange d'énergie libre de ces réactions est proportionnel à la tendance des réactifs à donner ou accepter des électrons qu'il est possible d'exprimer numériquement sous forme de potentiel d'oxydoréduction ou potentiel rédox, selon le rapport des composés impliqués : oxaloacétate/malate, pyruvate/lactate, acétoacétate/ β -hydroxybutyrate, NAD^+/NADH (54). Comme ces échanges sont communs dans les voies métaboliques énergétiques qui font l'objet d'une zonation, il ne serait pas étonnant de constater une certaine zonation de potentiels rédox. Toutefois, dans l'étude Ghosh, on a constaté une répartition uniforme du rapport NAD^+/NADH ainsi que du rapport glycérol-3-phosphate/dihydroxyacétone-phosphate, considéré par les auteurs comme étant aussi révélateur que le rapport pyruvate / lactate (51). Le potentiel rédox mitochondrial, tel qu'évalué par le rapport β -hydroxybutyrate/ acétoacétate, s'avère également équivalent au sein des cellules périportales et périveineuse (147), mais une hétérogénéité peut être induite en traitant les cellules au glucagon (148). Ces auteurs suggèrent que l'effet du glucagon se manifeste par un plus grand transfert d'équivalents réduits de la mitochondrie au cytoplasme en vue de la néoglucogénèse. À cet égard, Shiota rapporte une plus grande activité de la navette malate-aspartate lors de la néoglucogénèse à partir de l'alanine chez des hépatocytes de rats ayant jeûné

48h avant l'expérimentation, donc exposés à d'importantes concentrations de glucagon (130). Il est à noter que l'hétérogénéité de la navette ne semble pas reliée aux activités enzymatiques de la malate déshydrogénase ni de l'aspartate aminotransférase qui ne sont pas significativement différentes (périportal vs périveineux) autant dans le compartiment cytosolique que mitochondrial, mais bien au transport de l'aspartate à travers la membrane mitochondriale (130).

1.2.1.5 Gradient du potentiel phosphate

Il est communément admis que l'état énergétique de la cellule est traduit par le potentiel phosphate ou le rapport $ATP/ADP \times P_i$. Les premières études concernant ces paramètres n'indiquent aucune différence régionale significative (tableau 4 (51)).

Tableau 4 Valeurs respectives de composés phosphatés dans les zones périportale et périveineuse.

Adapté de (51).

	ATP $nmol \cdot kg^{-1}$	ADP $nmol \cdot kg^{-1}$	Pi $nmol \cdot kg^{-1}$	$ATP \cdot ADP^{-1} \cdot P_i^{-1}$ M^{-1}
Périportal	13.7 ± 0.62	6.12 ± 0.48	15.1 ± 0.8	556
Périveineux	14.5 ± 0.63	6.08 ± 0.32	15.8 ± 1.5	566

Cette constatation de l'équivalence du potentiel phosphate entre les zones périportale et périveineuse est également corroborée par d'autres travaux (71,96,117). Il ne faut toutefois pas en conclure pour autant que ces éléments sont répartis uniformément à l'intérieur de l'acinus puisque Burns suggère une distribution biphasique de l'ATP impliquant de plus grandes concentrations d'ATP dans la zone II ou intermédiaire (31). Dans cette dernière étude, puisque les mesures ont été effectuées sur des foies

dans lesquels la néoglucogenèse était activée (consommant donc des ATP), les auteurs suggèrent une possible déplétion d'ATP dans la zone périportale (31).

1.2.1.6 Gradient de la capacité de transport

Puisque le sang traverse l'acinus de façon unidirectionnelle, l'environnement des cellules périportales est toujours le premier à être irrigué avec du sang riche en composés destinés à être pris par le foie et inversement pauvre en composés qui sont mis en circulation par le foie. Si le transport était gouverné exclusivement par les gradients de concentration, alors les activités de transport s'effectueraient uniquement en fonction de la position des hépatocytes dans l'acinus (59). Mais tel n'est pas le cas puisque, entre autres, tel que déjà vu dans la partie 1.1, la porosité des sinusoides change le long de l'acinus. Outre cela, la répartition de transporteurs spécifiques joue également un rôle important. Ainsi, il a été démontré que le métabolisme de certains acides aminés différait entre les zones périportale et périveineuse en raison de capacités hétérogènes des systèmes de transport (29). Ceci revêt une importance non négligeable puisque le transport constitue la principale étape contrôlant le métabolisme de certains acides aminés comme l'alanine (46,133). Ainsi, le transport de l'alanine et son métabolisme sont beaucoup plus importants dans les hépatocytes périportaux que périveineux (21,63). Contrairement à l'alanine, le transport d'un autre substrat néoglucogénique majeur, le lactate, semble équivalent dans les zones périportale et périveineuse (135).

Le foie contient également d'autres transporteurs qui font l'objet d'une zonation, soient les transporteurs de glucose. Le foie exprime deux types de transporteurs

soient les GLUT1 et GLUT2 (111,146). Les GLUT1 sont des transporteurs de glucose exprimés dans presque tous les tissus de l'organisme et ils sont responsables du transport basal du glucose (111). Dans le foie, les GLUT1 se retrouvent dans les deux dernières rangées d'hépatocytes (18) et, qui plus est, les GLUT1, bien qu'en plus grand nombre, demeurent localisés à cet endroit après un jeûne de trois jours (136). Quant aux GLUT2, retrouvés particulièrement dans le foie (111,146), ils se retrouvent davantage dans la zone périportale ce qui va de pair avec le concept de zonation métabolique où la zone périportale est davantage responsable des voies métaboliques menant à la production de glucose (108). Bien qu'il soit considéré que le transport du glucose à travers la membrane hépatocytaire soit tributaire des GLUT2, dans une surprenante étude de Guillam, Burcelin et Thorens, il est rapporté que la production de glucose hépatique s'avère normale chez des souris dépourvues génétiquement de GLUT 2 (56).

Ceci suggère donc que, du moins pour sortir de la cellule, le glucose ne semble pas requérir la présence d'un transporteur spécifique ni de mécanisme de diffusion facilitée. En fait, selon ce groupe de chercheurs, en l'absence de GLUT2, les choses se dérouleraient ainsi : le glucose 6-phosphate généré par la glycogénolyse ou la néoglucogénèse entrerait dans le reticulum endoplasmique pour y être hydrolysé en glucose et en phosphate, le glucose ainsi produit pourrait être relâché de la cellule par une voie de trafic membranaire mais une fraction de ce glucose pourrait également retourner dans le cytosol. Ce glucose ne pouvant sortir de la cellule serait rephosphorylé en glucose 6-phosphate où son accumulation dans la cellule entraînerait une stimulation de l'expression génique de la glycogène synthase et de la pyruvate

kinase. Qui plus est, ces effets de l'accumulation de glucose 6-phosphate serait même prédominant sur ceux du glucagon (26). Toujours selon ces auteurs, le tout se corrige lorsque les GLUT2 sont de nouveau exprimés dans la membrane cellulaire ceci indiquant que le rôle principal des GLUT2 est de permettre l'équilibration du glucose avec le milieu extérieur. Ceci suggère donc que les métabolites intra-cellulaires reliés au métabolisme du glucose ont un effet qui prédomine sur ceux exercés par les hormones pancréatiques quant au contrôle du métabolisme du glycogène et de l'expression génique de certaines enzymes (26).

1.2.1.7 Gradient de la densité de l'innervation

Le foie est innervé par les deux parties du système nerveux autonome, à savoir les systèmes sympathique et parasympathique, dont les fibres nerveuses rejoignent le foie par des ramifications autour de la veine porte et de l'artère hépatique (124). Il semble que l'innervation du foie soit restreinte aux premières cellules périportales seulement et que le signal nerveux se propagerait aux autres cellules par des jonctions serrées (gap junctions) (118,127). Le foie s'avère sous tonus sympathique lorsque les concentrations de glucose diminuent, et conséquemment, lorsque les concentrations de glucose augmentent, ce tonus diminue (73). De toute évidence, l'intégrité des voies nerveuses n'est pas essentielle à l'augmentation de la production de glucose hépatique, du moins en réponse à l'exercice chez les animaux, (134,156,159) et il semble que ce soit également le cas chez l'humain (120).

1.2.1.8 Autres gradients

Parmi les éléments répartis de façon non-uniforme au sein de l'acinus hépatique et qui ont fait l'objet d'une attention relativement restreinte de la part des chercheurs, notons le pH et le potentiel membranaire.

Burns a mesuré le pH intracellulaire dans des foies effectuant de la néoglucogenèse à partir de 1,5 mM de lactate (31). Les données recueillies indiquent un pH de 7,9 au tout début de la région périportale qui s'abaisse rapidement à 7,4 alors qu'à peine 16 % de la distance séparant la triade portale de la veine hépatique terminale est franchie, pour ensuite atteindre des valeurs inférieures à 7,35 dans la zone périveineuse (31). Les implications physiologiques de cette observation demeurent encore inconnues.

Certains auteurs se sont également intéressés au potentiel membranaire des hépatocytes et puisque les changements de potentiel membranaire semblent corrélés avec la production de glucose hépatique (Friedman 1980 cité par (92)), des différences régionales étaient suspectées. Les résultats de cette étude démontrent que sans substrat présent, le potentiel membranaire est équivalent dans les zones périportale et périveineuse ($- 27$ mV). Cependant, l'addition d'un mélange lactate/pyruvate (4 / 0.4 mM) dans le perfusat a entraîné une hyperpolarisation des membranes des deux types de cellules, l'effet étant toutefois prépondérant dans la première zone rencontrée par le perfusat (périportale lors de la perfusion antérograde et périveineuse lors de la perfusion rétrograde). Avec l'addition de glucagon dans le perfusat, l'hyperpolarisation (~ 45 mV) s'est avérée équivalente dans les deux zones, peu

importe la direction dans laquelle le foie était perfusé. Les auteurs suggèrent conséquemment que les mécanismes des phénomènes métaboliques et électriques sont indépendants, ceci étant particulièrement vrai dans les situations où une stimulation hormonale provoque l'hyperpolarisation des membranes des cellules sans pour autant stimuler la néoglucogenèse (92).

1.3 Zonation du métabolisme hépatique

Le foie joue un rôle important dans le métabolisme des principaux nutriments tel que les glucides, lipides et protéines. Bien qu'il soit raisonnable de penser que tous les hépatocytes sont impliqués dans ces fonctions de régulation, il apparaît maintenant, de façon de plus en plus évidente, que la contribution relative des hépatocytes aux fonctions de retrait de la circulation, de stockage, de transformation de substrats et de mise en circulation de divers composés revêt un haut degré d'hétérogénéité. Non seulement certaines fonctions sont davantage réalisées par certains hépatocytes, il en existe certaines, comme la synthèse de la glutamine par exemple, qui sont réalisées exclusivement par un seul type de cellules (périveineuses dans ce cas-ci). De toute évidence, cette spécialisation régionale des hépatocytes quant à l'acquittement des tâches hépatiques (tableau 5) répond de façon dynamique aux différents états métaboliques de l'organisme et constitue un ensemble complexe de mécanismes ayant pour but un maintien plus efficace et adéquat de l'homéostasie de l'organisme (49).

Tableau 5 Zonation du métabolisme glucidique et autres fonctions métaboliques du foie . Adapté de (49,74).

Métabolisme glucidique	
Zone périportale	Zone périveineuse
Production du glucose	Disposition du glucose
Néoglucogénèse	Glycolyse
Dégradation du glycogène en glucose	Dégradation du glycogène en lactate
Synthèse du glycogène à partir de lactate et de pyruvate	Synthèse du glycogène à partir du glucose
Autres fonctions métaboliques	
Zone périportale	Zone périveineuse
Dégradation des acides aminés	
Production d'urée	
Utilisation de la glutamine	Formation de la glutamine
Synthèse de cholestérol	cétogénèse
Formation de la bile	Lipogénèse
Métabolisme énergétique oxydatif et protection contre les radicaux libres	biotransformations
Excrétion de la bilirubine	

1.3.1 Zonation du métabolisme glucidique

Jungermann (75) rapporte que, chez l'humain sédentaire, l'apport moyen de glucose est environ de 100 g par repas. Tout ce glucose est métabolisé au terme d'environ 2, 5h et aura sensiblement été réparti de la façon suivante : 40 g auront été pris par le foie (soit 40 % du glucose absorbé, ce qui équivaut à ce qui a été trouvé dans plusieurs études chez l'animal (101)) desquels 25 g auront été stockés en glycogène (soit environ le tiers de la réserve normale (54)) et 15 g dégradés en pyruvate; 27.5 g auront été pris par les muscles squelettiques, le cœur et les tissus adipeux; 13.75 g auront été consommés par l'intestin, le pancréas et autres viscères; 11.25 g auront été consommés par le système nerveux central; 3.75 g auront été consommés par les globules rouges). Ce qui reste, soit environ 3.75 g, aura entraîné une augmentation

transitoire de la concentration de glucose dans l'espace extracellulaire dont la glycémie. Pendant la période postabsorptive, la production hépatique de glucose s'ajuste au besoin en glucose de l'organisme au repos soit d'environ 7.5 g/h; 4.5 g/h sont fournis par la glycogénolyse tandis que les 3 g/h restants sont fournis par la néoglucogenèse. Lors de situations physiologiques particulières où la demande énergétique est accrue, comme c'est le cas à l'exercice, la production de glucose hépatique se trouve augmentée et son taux peut atteindre et même dépasser les 30 g/h. Ces chiffres démontrent donc clairement l'importance de la fonction glucostatique du foie quant à la régulation et au maintien de la glycémie. Le foie participe activement au retrait de la circulation du surplus de glucose entraîné par la prise alimentaire, au stockage de ce glucose sous forme de glycogène (glycogénèse), à la mise en circulation de ce glucose emmagasiné (glycogénolyse) lorsque requis par les besoins de l'organisme et également, au besoin, à la formation et la mise en circulation de nouvelles molécules de glucose à partir de précurseurs tels certains acides aminés comme l'alanine ou d'autres molécules comme le lactate ou le glycérol (néoglucogenèse). Ces trois fonctions du foie reliées au métabolisme glucidique ne s'opèrent pas de façon rigoureusement identique dans tous les hépatocytes, ceci étant partiellement dû au fait que la plupart des enzymes impliquées sont réparties inégalement au sein de l'acinus hépatique.

Tableau 6 Zonation des principales enzymes reliées au métabolisme glucidiques hépatique.

Enzyme	Prédominance	Ratio PP : PV	Référence
Glycogène synthase	PP		(121,123)
Phosphorylase	PP	2.0	(48,121,123)
Glucose 6 phosphatase (G 6-Pase)	PP	1.7 - 2.8	(6,38,67,84,123,139,140)
Fructose 1,6-biphosphatase (F 1,6-Pase)	PP	1.9 - 3.5	(83,90,126,147)
ARNm			(45)
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)	PP	2.9 – 6.2	(3,5,6,36,55,100,154,161,164)
ARNm			(11,12,167)
Lactate dehydrogenase	PP	1.3 - 1.8	(16,44,66,93,103,128,147,154,165)
Glucokinase (GK)	PV	0.3 – 0.6	(36,47,83,90,91,145,149,150,154)
ARNm			(102,167)
Pyruvate Kinase de type L (PK _L)	PV	0.4 – 0.6	(16,35,55,66,93,100,171)

1.3.1.1 Métabolisme du glycogène

Les niveaux de glycogène hépatique, du moins chez le rat, subissent d'importantes fluctuations selon les périodes de prise alimentaire et de jeûne (121). À la figure 5, Babcock et Cardell (9) ont tracé la cinétique des variations de concentrations de glycogène hépatique de deux groupes de rats au cours de 24 h dont le temps 0 correspond au terme d'un jeûne de 22 h. Les rats du premier groupe (barres ombrées) avaient préalablement été habitués à un cycle de prise alimentaire et de jeûne de 2 h et 22 h tandis que les rats du deuxième groupe (barres blanches) avaient eu accès à la nourriture *ad libitum* durant la même période. Au temps 0, soit au terme du jeûne de

22 h, les concentrations de glycogène sont très faibles : 0.87 ± 0.46 % pour le groupe prise alimentaire contrôlée et 0.11 ± 0.07 % pour le groupe *ad libitum*. Au cours de la période de prise de nourriture (2 h) et des heures qui suivent, les concentrations augmentent progressivement atteignant des niveaux maximum de 7.30 ± 0.49 % pour le groupe prise alimentaire contrôlée et 4.79 ± 0.84 % pour le groupe *ad libitum*. Ensuite, les concentrations diminuent progressivement de sorte qu'à 24 h, les niveaux de glycogène se rapprochent davantage de ceux du départ : 1.71 ± 0.52 % pour le groupe prise alimentaire contrôlée et 0.90 ± 0.30 % pour le groupe *ad libitum*.

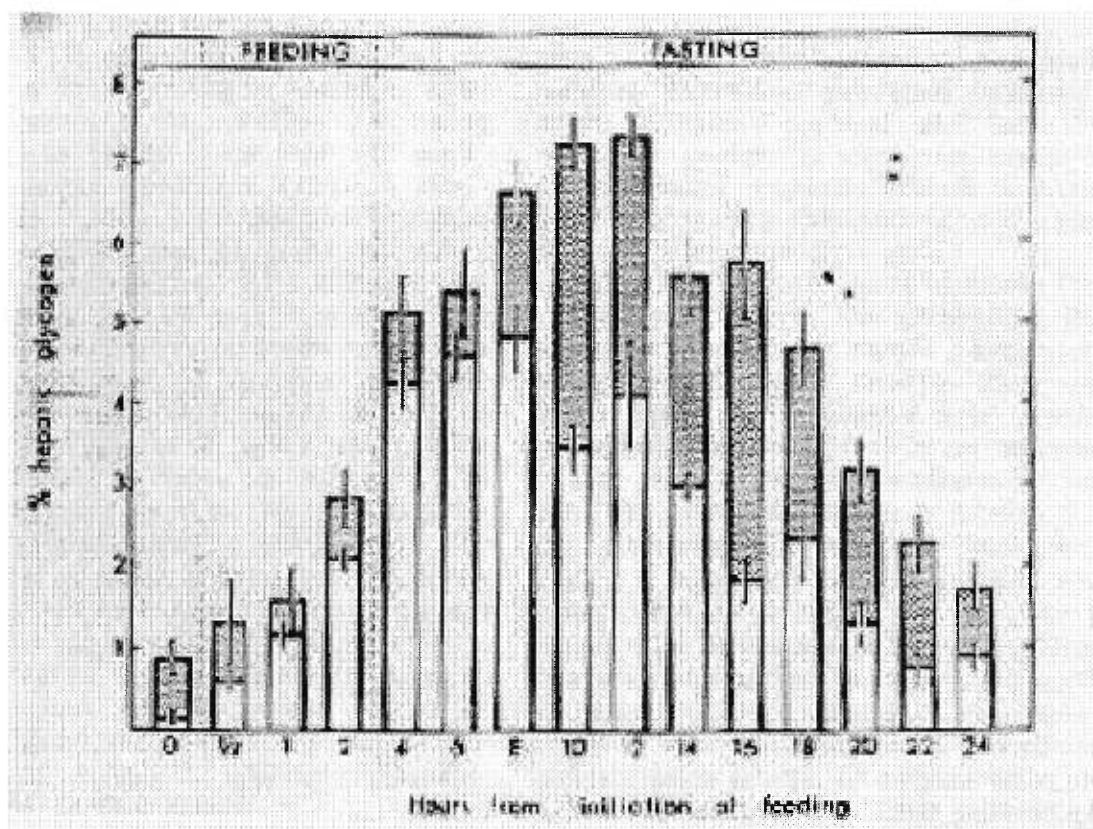


Figure 5 Niveaux de glycogène hépatique au cours d'un cycle de prise alimentaire (2 h) et de jeûne (22 h) de rats nourris *ad libitum* (barres blanches) et conditionnés (barres ombrées). Adapté de (121).

Les auteurs expliquent les différences de concentrations de glycogène entre les deux groupes par un écart de la quantité de nourriture ingérée durant la période de 2 h, les rats préalablement nourris *ad libitum* n'ayant pas été habitués à ingérer leur apport calorique quotidien total en si peu de temps. Dans cette même étude, une analyse minutieuse des échantillons hépatiques a permis d'établir une certaine modalité quant à la déposition et à la mobilisation du glycogène des régions périportale et périveineuse. Tel qu'illustré à la figure 6, au temps 0, soit après 22 h de jeûne, les concentrations de glycogène sont très faibles voire quasi indécélables au sein du lobule hépatique. Cependant, au terme de la période de prise de nourriture de 2 h, du glycogène s'est accumulé dans toutes les zones, mais davantage dans la zone centrilobulaire ou périveineuse. À 6 h, soit en pleine période d'accumulation du glycogène, cette démarcation témoignant de la répartition inégale du glycogène se trouve encore accentuée. À 12 h, les deux zones sont relativement bien garnies en glycogène alors que chez certains échantillons, il est permis d'observer une légère prédominance du glycogène dans la zone périportale. À 18 h, soit lorsque le glycogène est progressivement déplété afin de subvenir aux besoins de l'organisme, les deux régions perdent de leur contenu en glycogène mais la région périportale est davantage dégarnie que la région périveineuse. Finalement à 22 h, de petites quantités de glycogène demeurent détectables dans le lobule, sensiblement davantage dans la régions périveineuse.

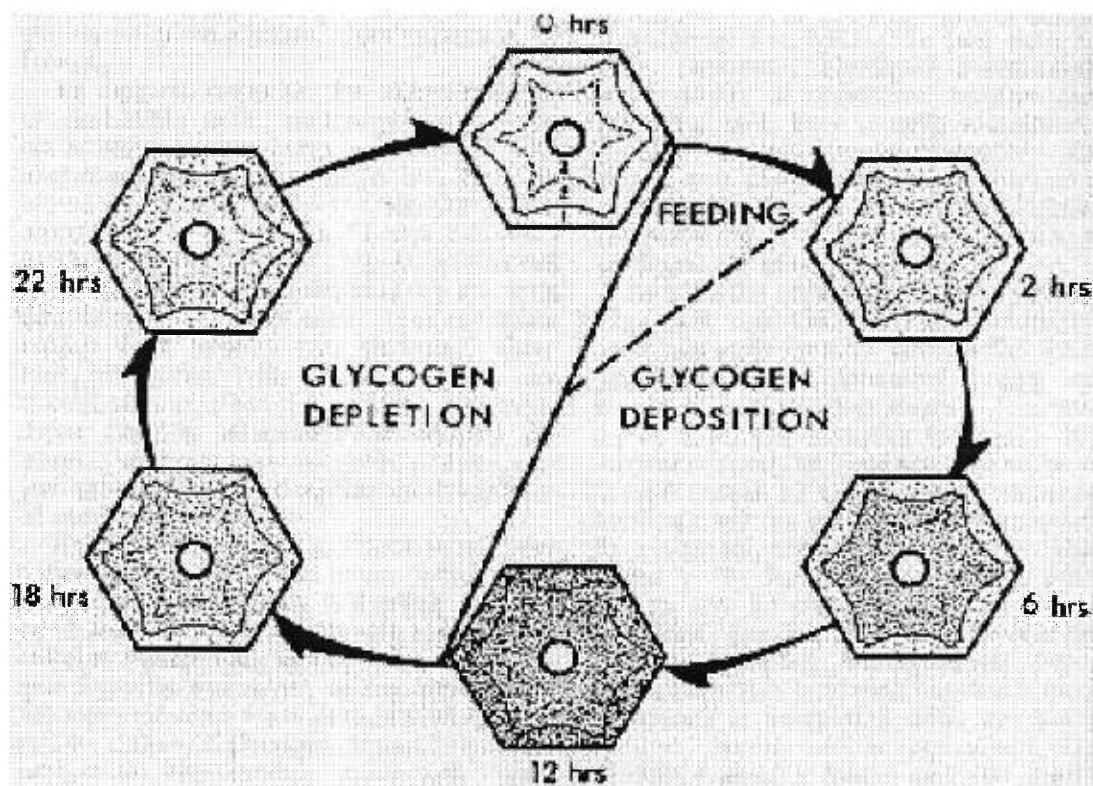


Figure 6 Répartition du glycogène dans le lobule hépatique au cours d'un cycle de prise alimentaire (2 h) et de jeûne (22 h) . Adapté de (121).

Étonnamment, déjà en 1872, Bock et Hoffman (rapporté par (9)) rapportaient que chez le lapin, le glycogène se déposait d'abord autour de la veine centrale (région périveineuse) avant de se déposer plus tard dans les régions plus en périphérie. À la fin de la période absorptive, soit à la fin de la période d'obscurité, du glycogène est présent dans tous les hépatocytes et il est possible de déceler un léger gradient porto-central (49). Toutefois à la fin de la période postabsorptive, soit à la fin de la période éclairée, une toute petite quantité de glycogène est retrouvée confinée dans la région périveineuse.

Certains auteurs suggèrent donc un métabolisme plus rapide du glycogène dans la zone périportale (49) ce qui signifierait que le glycogène se trouvant dans cette zone serait dégradé et resynthétisé plus rapidement et en plus grande quantité que le glycogène de la région périveineuse. Certaines données de la littérature soutiennent cette proposition (9,41,48,74,121,158). Toutefois, d'autres auteurs n'ont pas observé cette prépondérance périportale et ne suggèrent pas de différences quant à la distribution, ou la dégradation ou la resynthèse du glycogène entre les deux zones (48,140).

1.3.1.1.1 Glycogène synthase et glycogène phosphorylase

À l'instar des niveaux de glycogène qui montrent d'importantes fluctuations selon les périodes de prise alimentaire et de jeûne, la répartition des activités des enzymes reliées au métabolisme du glycogène varient en conséquence. Alors que chez le rat à jeun, il est permis d'observer une plus grande activité de la glycogène synthase et de la glycogène phosphorylase dans la région périportale, chez le rat nourri, cette distribution s'avère plus ou moins équivalente dans les deux zones périportale et périveineuse (121). Cependant, des niveaux équivalents de glycogène phosphorylase ont également été rapportés, ce qui irait de pair avec les variations diurnes de l'activité de la glycogène synthase dans les deux zones périportale et périveineuse qui semblent inversement corrélée avec le contenu en glycogène (119).

1.3.1.2 Paradoxe du glucose

Le paradoxe du glucose constitue un exemple frappant de l'importance de considérer le concept de la zonation métabolique dans l'interprétation des données de la

littérature et la compréhension des phénomènes physiologiques impliquant le métabolisme hépatique.

Pendant un bon nombre d'années, a persisté une certaine controverse concernant le substrat à partir duquel le glycogène est resynthétisé, soit directement à partir du glucose ou indirectement via des composés à trois carbones (lactate et pyruvate) (figure 7). À l'origine, puisque l'ingestion de glucides après un jeûne entraîne rapidement la reconstitution des réserves de glycogène et même l'activation de la lipogenèse hépatique, il fut communément admis que le glucose constituait un substrat majeur destiné à la synthèse de glycogène par voie directe (109).

Cependant, certaines données de la littérature ont démontré que, dans des conditions physiologiques, l'utilisation du glucose par le foie est relativement limitée (104) ce qui suggère que le glucose serait, contrairement à ce qui était cru, un faible précurseur pour la synthèse du glycogène (comparativement à d'autres précurseurs néoglucogéniques tels que le fructose, le lactate ou le glycérol) et des lipides (79) et, qu'en fait, la voie indirecte constituerait la voie de synthèse prédominante (105). Ces évidences allaient à l'encontre des croyances établies et, jusqu'à un certain point, s'avéraient contraires à la plus élémentaire des logiques (pourquoi faudrait-il dégrader le glucose pour le reformer ensuite et alors seulement l'emmagasiner en glycogène ?). L'accumulation de ces évidences a donc généré ce qu'il a été convenu d'appeler : le paradoxe du glucose (74). C'est finalement le concept même de la zonation métabolique hépatique qui a permis de rendre compte des données de la littérature de façon satisfaisante.

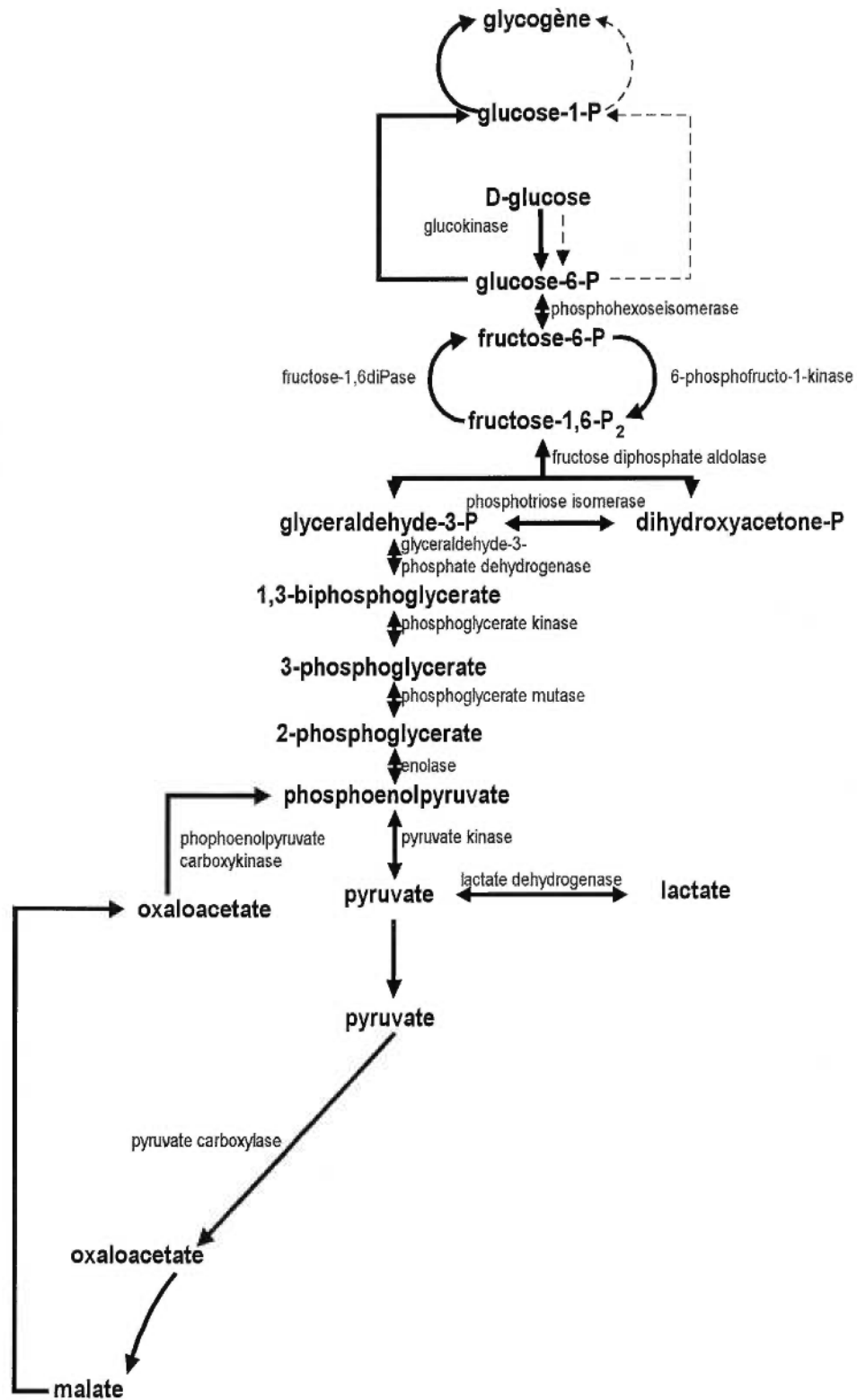


Figure 7 Métabolisme de la glycolyse par voie directe (traits hachurés) et par voie indirecte (traits gras).

À l'aide de foies isolés et perfusés de rats à jeun, Bartels a démontré que le glycogène est synthétisé à partir du pyruvate par la voie indirecte dans la zone périportale et à partir du glucose par la voie directe dans la zone périveineuse (13,14). Ces mêmes auteurs suggèrent également que les hépatocytes de la zone périveineuse retireraient de la circulation le glucose ingéré, en utiliseraient une partie pour synthétiser du glycogène par voie directe, dégraderait le glucose non utilisé en lactate, lequel serait alors relâché dans la circulation. Ce lactate voyagerait ainsi dans la circulation systémique pour ensuite revenir au foie et être alors capté par les hépatocytes de la zone périportale où il serait reconverti en glucose et finalement en glycogène (13,14). Cette hypothèse a été confirmée en partie par une autre étude où il a été démontré que les composés à trois carbones utilisés pour synthétiser le glycogène hépatique par voie indirecte proviendraient du foie (101). Il semble également que l'utilisation différente de substrats des hépatocytes des zones périportale et périveineuse pour la synthèse de glycogène soit modulée par l'insuline (110) et l'état nutritionnel de l'animal (2).

Par ailleurs, une récente étude indique que la leptine exercerait un effet additif sur celui de l'insuline quant à la stimulation de la synthèse du glycogène à partir du glucose et, qu'en fait, cela constituerait le principal effet de la leptine sur les hépatocytes (4). Il ne semble, toutefois, qu'aucune étude n'ait encore tenter de circonscrire les effets spécifiques de la leptine sur les hépatocytes périportaux et périveineux.

Malgré les nombreuses études confirmant la prédominance de la synthèse de glycogène par voie directe dans la région périveineuse et indirecte dans la région

périportale, deux chercheurs, Cline et Shulman, maintiennent toujours que le métabolisme du glucose et les voies de synthèse du glycogène sont équivalents dans les zones périportale et périveineuse (39,40).

1.3.1.3 Néoglucogenèse

La néoglucogenèse comprend tous les mécanismes et toutes les voies responsables de la conversion de substances non glucidiques en glucose. Les données les plus récentes indiquent que l'activité de cette voie métabolique peut s'avérer particulièrement importante puisqu'elle assure 50 % de la production totale de glucose d'un individu après un jeûne d'une nuit (overnight fast) (89), et plus de 90 % si ce jeûne perdure 40 h (80,89).

Tel qu'il est possible de le voir dans le tableau 6, les enzymes néoglucogéniques sont prédominantes en zone périportale. Qui plus est, l'utilisation des techniques de microdissection a permis de tracer les niveaux de l'activité des enzymes glucose 6-phosphatase (figure 9) et PEPCK (figure 10) tout au long de l'acinus. Le profil des activités de ces enzymes indiquent bien que leur activité décroît de façon linéaire de la zone périportale à la zone périveineuse. Les activités d'autres enzymes importantes affichent le même profil et se retrouvent également davantage dans la zone périportale, à savoir : lactate déshydrogénase (figure 11) et alanine aminotransférase (figure 12) dont les activités catalysent la transformation des précurseurs néoglucogéniques lactate et alanine en glucose (74).

Considérant la localisation des enzymes néoglucogéniques, il était anticipé que la néoglucogenèse s'effectue davantage dans la zone périportale. Mais encore fallait-il s'assurer que les flux réels de substrats à travers la voie néoglucogénique s'avéraient effectivement différents puisque ce flux ne dépend pas uniquement des activités enzymatiques mais également de la disponibilité des substrats, de leurs cofacteurs et d'autres modulateurs intracellulaire (57,95). Il est possible de constater, toutefois, que nombre d'évidences dans la littérature soutiennent que la néoglucogenèse se déroule davantage dans la zone périportale (7,24,30,31,71,95,115,116,148).

Bien que la zonation de la néoglucogenèse ait été démontrée à l'aide d'hépatocytes isolés, l'utilisation du modèle de foie perfusé, où l'intégrité des éléments structuraux et de l'organisation hépatocytaire est préservée, fournit les résultats les plus éloquents. Matsumura et Thurman ont développé une technique permettant de mesurer les variations des concentrations d'oxygène dans les régions périportale et périveineuse de foies perfusés (97). Ainsi, ils observèrent une relation linéaire entre la diminution de la concentration d'oxygène (due à la consommation) et la production de glucose des foies perfusés. Puisque 6 moles de composés phosphatés riches en énergie sont requis pour synthétiser une mole de glucose à partir de lactate et que 0,9 mole d'oxygène de plus est requis pour la respiration mitochondriale afin de générer 5,4 mole d'ATP (considérant un rapport P/O de 2,7 dans le foie perfusé), il est permis de chiffrer le ratio théorique entre la consommation d'oxygène et la production de glucose à 0,90, ce qui s'avère raisonnablement près de la valeur de 0,85 trouvée expérimentalement, suggérant ainsi que la méthode est valide (95).

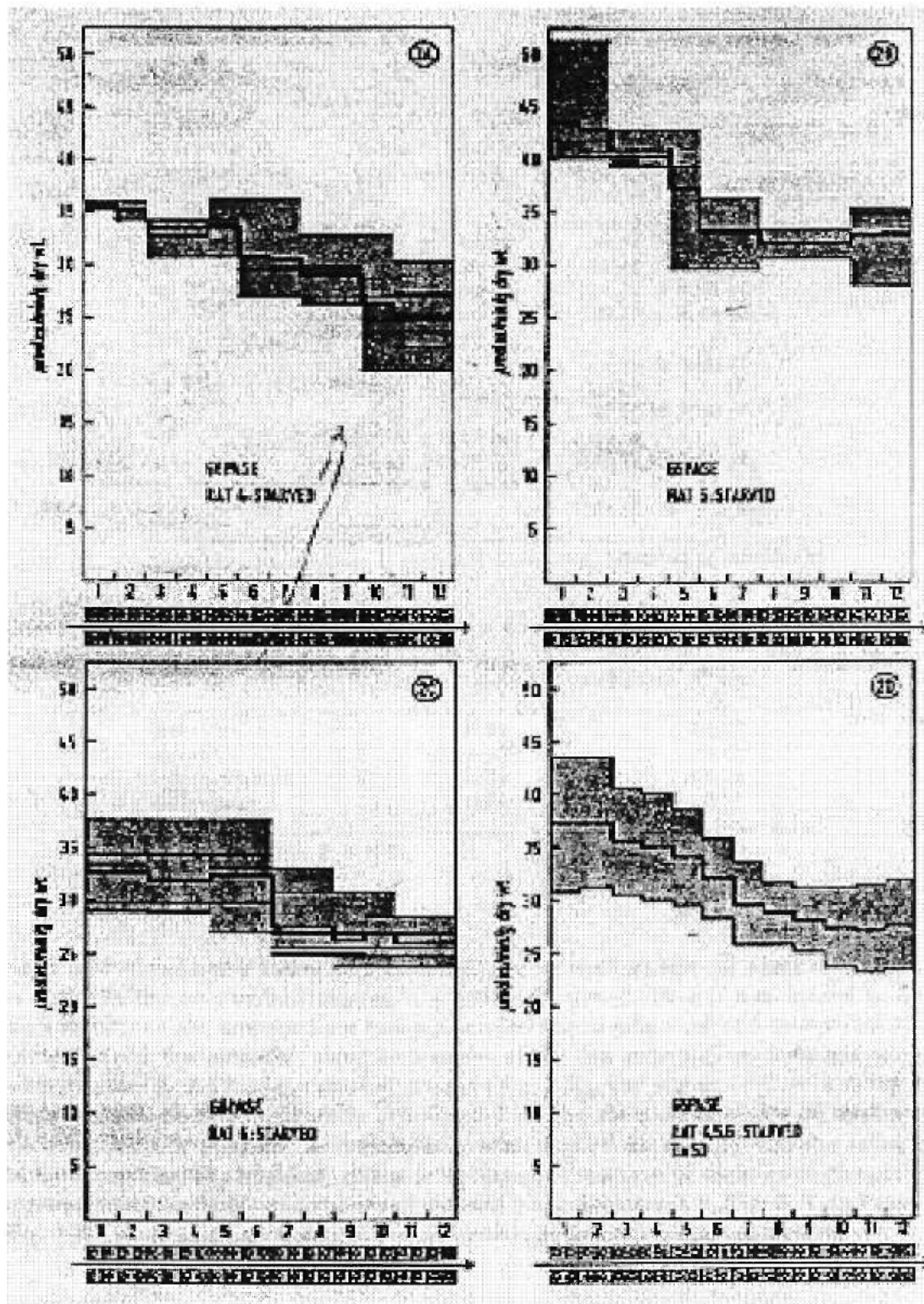


Figure 8 Répartition de l'activité maximale de la glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) dans l'acinus hépatique. Les chiffres 0 et 12 correspondent respectivement aux extrémités périportales et périverneuse de l'acinus. La planche du bas à droite représente la moyenne des trois autres. Adapté de (140).

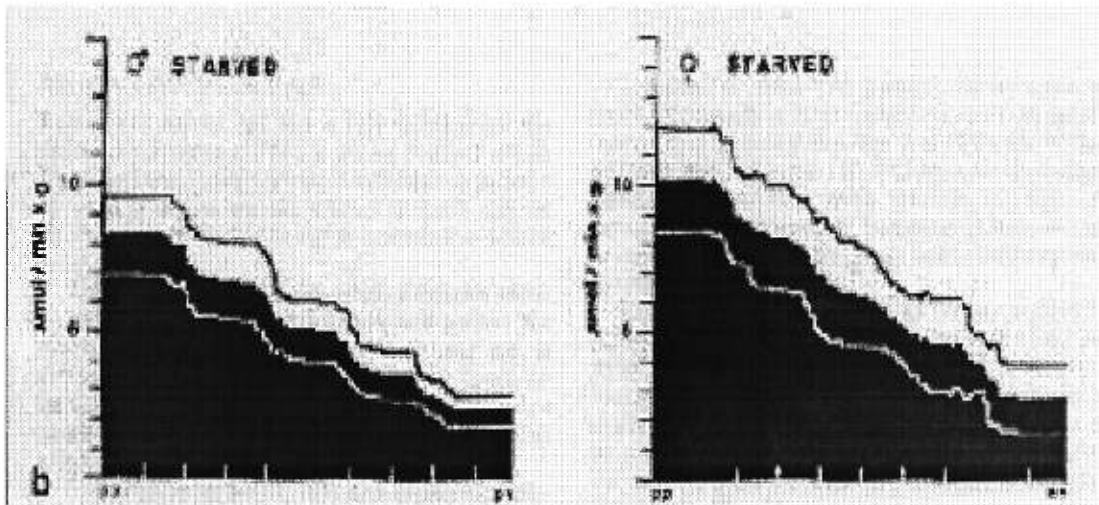


Figure 9 Répartition de l'activité maximale de la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) dans l'acinus hépatique. Les extrémités gauche et droite de chaque planche correspondent respectivement aux extrémités périportale et périveineuse de l'acinus. Adapté de (161).

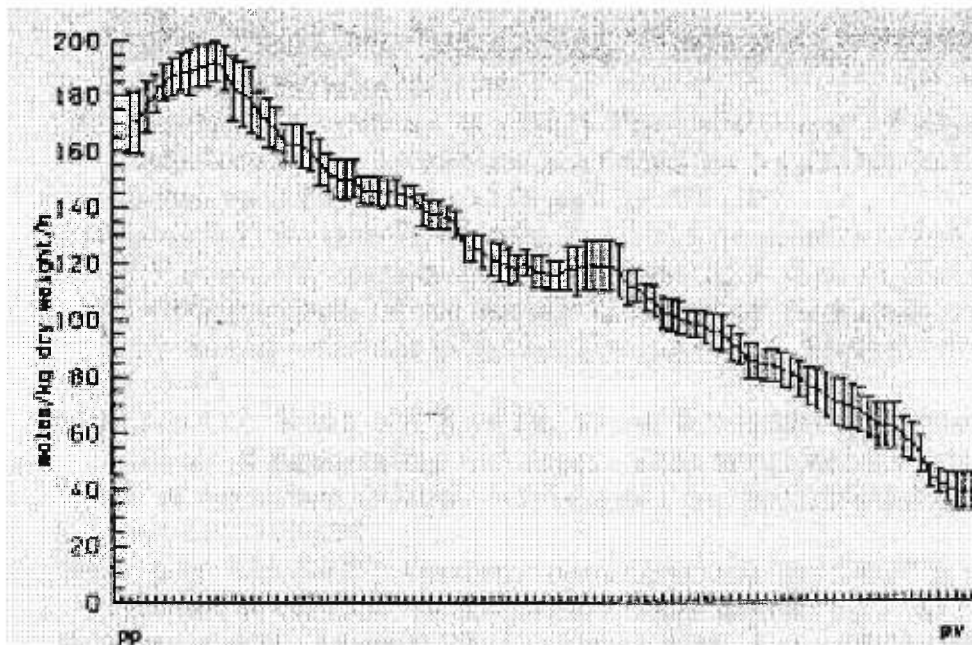


Figure 10 Répartition de l'activité maximale de la lactate déshydrogénase (LDH) dans l'acinus hépatique. Les extrémités gauche et droite de la planche correspondent respectivement aux extrémités périportale et périveineuse de l'acinus. Adapté de (44).

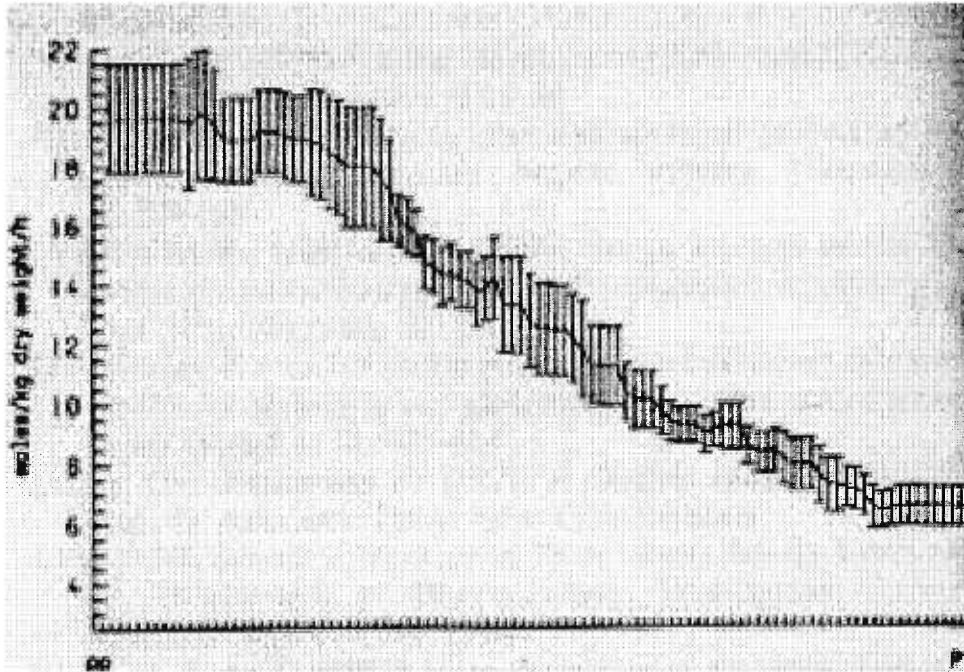


Figure 11 Répartition de l'activité maximale de l'alanine aminotransférase dans l'acinus hépatique. Les extrémités gauche et droite de la planche correspondent respectivement aux extrémités périportale et périveineuse de l'acinus. Adapté de (52).

Ces auteurs ont démontré que le glucose n'était pas synthétisé uniformément par tous les hépatocytes, les taux de production de glucose à partir de lactate étant deux à trois fois supérieurs dans la zone périportale en perfusion antérograde ($\sim 60 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ pour la zone périportale vs $\sim 25 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ pour la zone périveineuse). En perfusion rétrograde cependant, c'est la zone périveineuse qui s'est avérée la plus néoglucogénique ($\sim 75 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ pour la zone périveineuse vs $\sim 30 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ pour la zone périportale).

À ce point, il est important de mentionner que la validité de la technique de perfusion en sens rétrograde a fait l'objet de contestations (15,77). D'abord, certains auteurs suggèrent que la perfusion en direction rétrograde entraîne, d'une part, une expansion

de l'ordre de trois à quatre fois de l'espace extracellulaire hépatique total et, d'autre part, une augmentation du temps de transit du perfusé à travers le foie ainsi qu'une plus grande aire de surface sinusoidale résultante d'une distension des sinusoides, ce qui pourrait alors expliquer la plus grande extraction de certains composés (15). Ensuite, selon Jungermann, cette technique du 'stopped-flow oxygen-uptake' qui mesure la diminution de la concentration d'oxygène ne différencie pas l'oxygène consommée par le métabolisme énergétique de l'oxygène qui s'est simplement dissipé par diffusion, opinion tout à fait contraire à celle de Thurman, exprimée dans la même publication (77). La validité possible de ces remarques implique donc que les résultats obtenus à l'aide de ces techniques pourraient ne pas représenter que des différences authentiquement attribuables à la zonation du métabolisme hépatique.

Néanmoins, si l'on présume de la validité des travaux de Matsumura (95), il est possible de suggérer quelques mécanismes qui pourraient rendre compte des résultats obtenus. Ainsi, une explication plausible de la plus grande néoglucogenèse dans la zone affluente (périportale en perfusion antérograde et périveineuse en perfusion rétrograde) pourrait être les plus grandes disponibilités des substrats et de l'oxygène dans cette zone. Cependant, cette hypothèse est rejetée du fait que la néoglucogenèse et la consommation d'oxygène dans les régions effluentes se trouvent augmentées par l'ajout dans le perfusé d'épinéphrine. Il est donc permis de conclure que si ces éléments, substrats et oxygène, s'avéraient effectivement 'manquants' dans la zone effluente, la présence d'épinéphrine n'y changerait rien. De l'avis des auteurs, l'hypothèse la plus plausible serait qu'en région affluente, l'ATP serait synthétisé à un plus haut taux et que cela produirait un métabolite perméable qui irait inhiber le

métabolisme de cofacteurs dans la région effluente, ou que la plus grande concentrations d'oxygène dans la région affluente activerait le métabolisme des nucléotides par un mécanisme encore inconnu, permettant ainsi une plus grande activité néoglucogénique. (95).

1.3.1.3.1 Flux à travers les enzymes néoglucogéniques

Il semble qu'une seule étude n'ait été dévolue à la quantification des flux de substrats à travers les enzymes de la néoglucogenèse. Comme il est possible de le voir au tableau 7, les auteurs ont observé une production de glucose (à partir d'un mélange lactate/pyruvate 1.0/0.1 mM) et un flux à travers la PEPCK plus importants chez les cellules périportales mais un flux à travers la pyruvate kinase équivalent dans les deux zones.

Pour que ceci soit possible, il est impératif d'assister à un aiguillage du phosphoénolpyruvate vers la production de pyruvate plus important en zone périverneuse, ce qui est illustré par le plus grand rapport flux à travers la pyruvate kinase / flux à travers la PEPCK. Selon les auteurs, ceci indique que cette différence dans ce 'partitionnement' du phosphoénolpyruvate n'explique que 25 à 30 % de la différence de capacité de production de glucose des deux zones. Conséquemment, ceci implique que la cause majeure de disparité néoglucogénique réside dans la génération du phosphoénolpyruvate. De plus, à l'aide de traceurs, ces auteurs démontrèrent d'une part, que le flux à travers la pyruvate carboxylase est supérieur dans les cellules périportales et, d'autre part, que l'aiguillage du pyruvate vers la pyruvate carboxylase au détriment de la pyruvate deshydrogénase est également plus

important dans les cellules périportales. Ces résultats suggèrent donc que la différence de la production de glucose des hépatocytes périportaux et périveineux s'explique par la différence dans le taux d'approvisionnement du phosphoénolpyruvate, lui-même conséquent des différences de flux à travers la pyruvate carboxylase et la PEPCK

(71).

Tableau 7 Flux métaboliques au sein d'hépatocytes périportaux et périveineux incubés en présence d'un mélange lactate:pyruvate (1,0:0,1 mM) . Adapté de (71).

	Périportal nmol·mg ⁻¹ (poids humide)·15 min ⁻¹	Périveineux nmol·mg ⁻¹ (poids humide)·15 min ⁻¹	Ratio (PP : PV)
J _{glucose}	18.4 ± 1.8	13.0 ± 1.4	1.42 ± 0.06
J _{PK}	3.3 ± 0.3	3.1 ± 0.6	1.06 ± 0.08
J _{PEPCK}	21.7 ± 1.8	16.8 ± 0.7	1.29 ± 0.09
J _{GLUCOSE} /J _{PEPCK} %	84 ± 2	77 ± 3	1.09 ± 0.02
J _{PK} /J _{PEPCK} %	16 ± 2	23 ± 3	0.69 ± 0.10

1.3.1.4 Glycolyse

Bien que les enzymes de la glycolyse soient davantage actives dans la zone périveineuse, encore faut-il démontrer que le flux de substrats de cette voie métabolique est plus important dans cette zone. Matsumura et Thurman ont également appliqué leur technique de 'stopped-flow oxygen-uptake' afin de quantifier l'activité glycolytique dans les zones périportale et périveineuse du foie. Les auteurs en arrivent effectivement à la conclusion que l'activité glycolytique se déroule davantage dans la zone périveineuse lorsque le perfusat circule dans le sens antérograde (97,98). Selon les auteurs, la technique repose sur les mécanismes suivants : l'ajout d'éthanol dans le perfusat élève les niveaux de NADH dans les deux zones de l'acinus causant ainsi une

inhibition rédox de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et une importante diminution de la synthèse d'ATP glycolytique. Conséquemment, l'ADP qui n'est pas phosphorylé dans le cytosol se transporte dans la mitochondrie où il peut être phosphorylé et fait augmenter la consommation d'oxygène. Comme la consommation d'oxygène est plus importante dans la zone périveineuse, les auteurs en concluent que l'activité glycolytique l'est également.

Il est à noter toutefois que Chen et Katz, utilisant le modèle d'hépatocytes isolés, en arrivent à la conclusion qu'il n'existe pas de différence dans la capacité glycolytique des hépatocytes périportaux et périveineux (36). Ces auteurs n'ont pas relevé de différences significatives en ce qui a trait à la formation de ^3HOH à partir de $2\text{-}^3\text{H}$ -glucose, à la formation de lactate ou à la conversion de ^{14}C -glucose en ^{14}C -lactate (36).

1.3.1.5 Effets du glucagon sur le métabolisme glucidique hépatique

Le glucagon constitue l'hormone la plus puissante favorisant la néoglucogénèse et son effet principal est de faire augmenter la production de glucose hépatique (54). Comme les activités hépatiques de glycogénolyse et de néoglucogénèse sont zonées, les effets spécifiques du glucagon sur les hépatocytes périportaux et périveineux ont retenu l'attention de certains chercheurs.

Il semble que la glycogénolyse induite par le glucagon est plus importante dans la zone périveineuse suggérant ainsi que les hépatocytes périveineux seraient plus sensibles au glucagon mais que les effets du glucagon sur la néoglucogénèse soient équivalents

dans les deux zones (68). Les explications rendant compte de ces observations demeurent hypothétiques, mais il ne semble pas que le nombre ou l'affinité des récepteurs soient en cause puisque Ikezawa rapporte des contenus cellulaires équivalents d'AMPc ainsi que des augmentations semblables de Ca^{++} intracellulaire, suggérant des effets se manifestant en aval de ces messagers (68). D'autres auteurs ont souligné la différente capacité du glucagon à stimuler la phosphorylation de différents composés dans les zones périportale et périveineuse dont la glycogène synthase (périportal > périveineux), la glycogène phosphorylase (périportal > périveineux), et la pyruvate kinase (périportal < périveineux) (1). Comme c'est précisément l'état de phosphorylation qui détermine si l'enzyme se trouve sous sa forme active ou inactive (20,54), les effets sur les voies métaboliques peuvent s'avérer importants. Curieusement, la zonation des capacités de phosphorylation mentionnées vont à l'encontre de la prédominance de l'activité enzymatique et des effets connus. Ainsi, étant donné que la glycogène phosphorylase est sous sa forme active lorsque phosphorylée, sa plus grande phosphorylation en zone périportale, en réponse au glucagon, devrait conférer à cette zone une plus grande activité glycogénolytique alors que les résultats expérimentaux d'Ikezawa indiquent le contraire (68). Les auteurs proposent néanmoins que la zonation des processus biochimiques pourrait s'expliquer par des différences dans la susceptibilité à la phosphorylation et non pas dans la distribution comme telle des enzymes cibles (1). Utilisant le modèle de foie perfusé de façon antérograde et rétrograde, Kinugasa rapporte que les effets du glucagon se manifestent davantage dans la zone affluente (périportale en perfusion antérograde et périveineuse en perfusion rétrograde). Les auteurs suggèrent que la différence dans

les concentrations d'oxygène dans les zones affluentes et effluente puissent venir moduler les effets hormonaux (85).

1.4 Implications du foie dans la régulation métabolique à l'exercice

En réponse à l'activité physique accrue que constitue une période d'exercice, il est bien établi que la production de glucose hépatique augmente afin d'assurer le maintien de la glycémie tout au long de l'effort (155). Cette activité entraîne d'importantes perturbations au niveaux des métabolites et des activités enzymatiques maximales au sein du tissu hépatique tel qu'illustré aux tableaux 8 et 9.

Selon Wasserman (155), la production de glucose hépatique représente la somme des flux de glucose générés par la glycogénolyse et la néoglucogenèse dont les caractéristiques spécifiques sont déterminées par les paramètres (intensité, durée, etc.) de l'exercice. La néoglucogenèse peut représenter environ 20 % de l'augmentation de la production de glucose hépatique et son importance croît selon la durée de l'effort, soit à l'inverse des réserves de glycogène. Le rôle essentiel que joue la néoglucogenèse à l'exercice prolongé, est manifestement illustré par l'utilisation d'un composé, l'acide 3-mercaptopycolinique, dont l'administration bloque la PEPCK, ce qui précipite l'épuisement des animaux (70).

La régulation de la néoglucogenèse repose sur des mécanismes influençant l'apport hépatique en précurseurs néoglucogéniques, leur extraction par le foie et, finalement, leur conversion en glucose dans le foie. L'exercice entraîne une augmentation de l'extraction hépatique d'acides aminés glucoformateurs et particulièrement de l'alanine

Tableau 8 Concentrations de métabolites hépatiques de rats en situation post-exercice exprimées en pourcentage des valeurs de repos. G 6-P, glucose 6- phosphate; Fru 6-P, fructose 6- phosphate; Fru 1,6-P, fructose 1,6-biphosphate; Gly 3-P, glycérol 3-P; Glyhyde 3-P, glyceraldehyde 3-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; Pyr, pyruvate; Lac, lactate; Ac-CoA, acetyl-CoA; ATP, adénosine triphosphate; ADP, adénosine diphosphate; AMP adénosine monophosphate. Adapté de (42,43) .

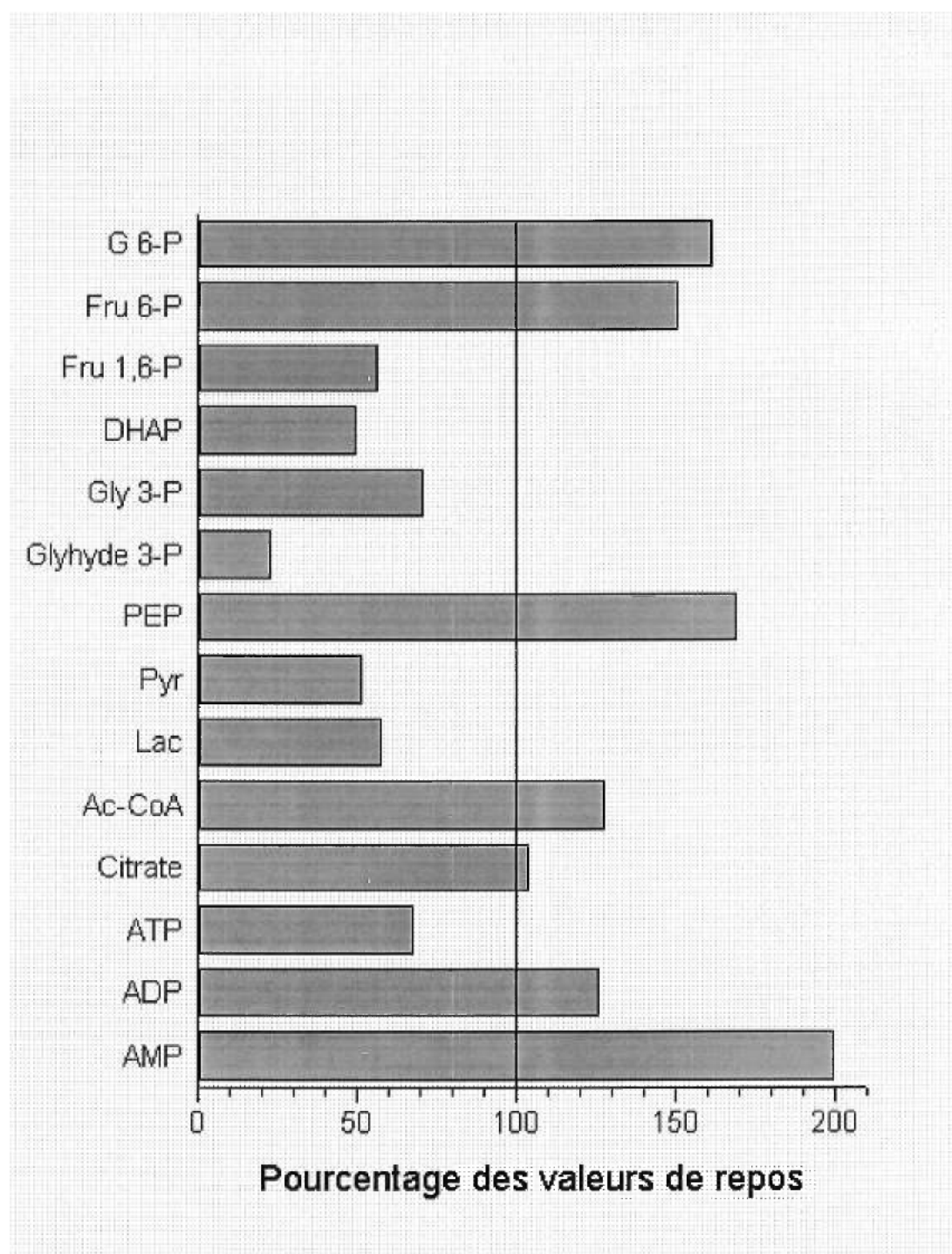
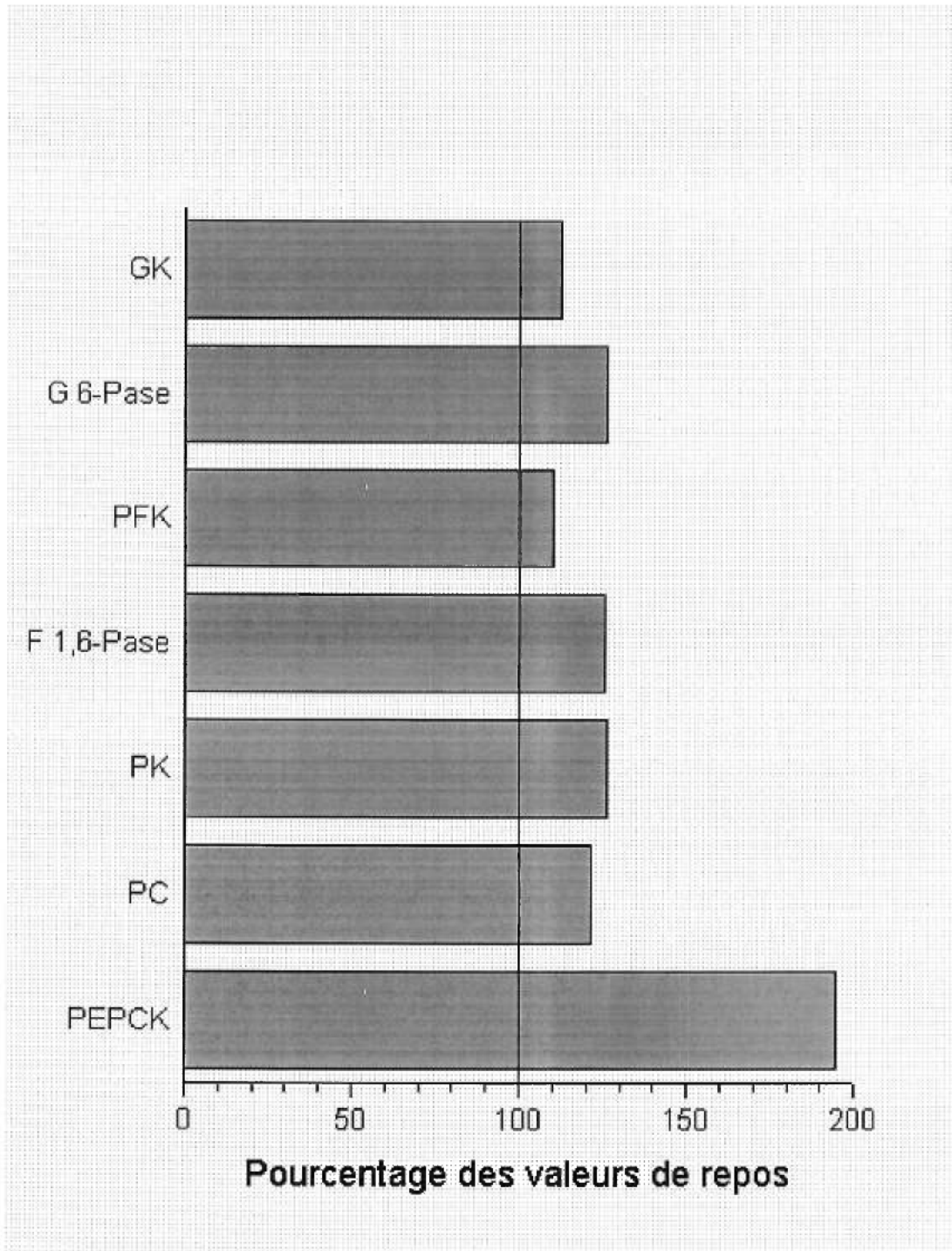


Tableau 9 Activités maximales des principales enzymes du métabolisme glucidiques hépatiques de rats en situation post-exercice exprimées en pourcentage des valeurs de repos. GK, glucokinase; G 6-Pase, glucose 6-phosphate; Fru 6-P, fructose 6-phosphate; Fru 1,6-P, fructose 1,6-biphosphate; PK, pyruvate kinase; PC, pyruvate carboxylase; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase. Adapté de (42,43).



dont la transformation en glucose augment de quelque 250 % en 150 min d'exercice chez le chien (157). L'exercice engendre également d'importants changements dans les niveaux d'hormones circulantes, dont celles des hormones pancréatiques ainsi que celui de l'adrénaline. Les variations des hormones pancréatiques semblent exercer la plus grande influence. Ainsi, dans les conditions respectives de deux études de Wasserman, la hausse du glucagon est responsable à 60 % de l'augmentation de la production de glucose hépatique tandis que la baisse d'insuline, quant à elle, compte pour 55 % (155). Bien qu'il soit possible que les contributions exactes de ces hormones à l'augmentation de production de glucose hépatique soient différentes dans chaque situation d'exercice, il n'en demeure pas moins que ces données témoignent de la prépondérance de leurs effets sur ce phénomène. Qui plus est, il semble même que la chute de l'insuline pourrait même potentialiser l'action du glucagon (155).

À l'exercice, la production de glucose hépatique répond de façon assez serrée à l'augmentation de l'utilisation du glucose par les muscle effectuant l'activité (17). Il semble donc qu'un signal rétroactif (feedback) transmette au foie l'information de la plus grande utilisation de glucose par le muscle (155). La glycémie pourrait constituer ce signal de sorte que l'utilisation accrue de glucose par le muscle pourrait entraîner une baisse transitoire de la glycémie qui pourrait être détectée par des 'senseurs' de glucose localisés dans la veine porte (65).

Malgré le fait que le métabolisme glucidique hépatique occupe une place centrale tant dans la régulation du métabolisme énergétique à l'exercice que dans le concept même de la zonation du métabolisme hépatique, aucune étude disponible n'a encore permis

de mettre en commun les connaissances acquises dans ces deux domaines. Or le but de la présente thèse consiste précisément à opérer cette symbiose. L'utilisation du modèle de l'exercice semble offrir un potentiel important quant à l'explication de la dynamique de la zonation métabolique hépatique, l'inverse étant aussi vrai.

CHAPITRE 2 – ÉTUDES EXPÉRIMENTALES

2.1 Effects of acute exercise on the gluconeogenic capacity of periportal and perivenous hepatocytes

**EFFECTS OF ACUTE EXERCISE ON THE GLUCONEOGENIC CAPACITY
OF
PERIportal AND PERIVENOUS HEPATOCYTES**


François Désy¹, Yan Burelle¹, Patrice Bélanger¹, Marielle Gascon-Barré²,
and Jean-Marc Lavoie¹.

1 : Département de Kinésiologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

2 : Département de Pharmacologie, Université de Montréal, Montréal, Québec,
Canada.

Running title : Hepatic metabolic zonation and exercise

Address for correspondence: Dr. Jean-Marc Lavoie
Département de Kinésiologie
Université de Montréal
C.P. 6128, Succ. Centre-Ville
Montréal, (Québec), Canada H3C 3J7
Tel : (514) 343-7044
Fax : (514) 343-2181



ABSTRACT

The present study was conducted to examine the effect of a single bout of exercise (rodent treadmill, 60 min at 26 m/min, 0% grade) on the gluconeogenic activity of periportal (PP-H) and perivenous (PV-H) hepatocytes in fasted (18 h) rats. Isolated PP-H and PV-H, obtained by selective destruction following liver perfusion with digitonin and collagenase, were incubated with saturating concentrations of alanine (20 mM; ALA) or a mixture of lactate + pyruvate (20:2 mM; LAC+PYR) to determine the glucose production flux (J_{glucose}) in the incubation medium. Results show that in the resting conditions, J_{glucose} from all exogenous substrates were significantly higher ($P < 0.01$) in PP-H than PV-H. Exercise, as compared to rest, resulted in a higher J_{glucose} ($P < 0.01$) from LAC+PYR substrate in the PV-H but not in the PP-H, resulting in the disappearance of the difference in J_{glucose} between PP-H and PV-H. Exercise, as compared to rest, led to a higher J_{glucose} ($P < 0.01$) from ALA substrate in both PP-H and PV-H. However, the exercise-induced increase in J_{glucose} (gluconeogenic activity) from ALA substrate was higher in PV-H than in PP-H, resulting, as from LAC+PYR substrate, in the disappearance ($P > 0.05$) of the difference of J_{glucose} between PP-H and PV-H. It is concluded that exercise differentially stimulates the gluconeogenic activity of PV-H to a larger extent than PP-H, indicative of a heterogenous metabolic response of hepatocytes to exercise.

Keywords: hepatic zonation, glucose flux, gluconeogenesis, liver

INTRODUCTION

Metabolic zonation is a twenty-five year old concept proposed by Sasse, Katz and Jungermann on the basis that hepatocytes, depending on their position along the acinus, possess different amounts and activities of enzyme and thus different metabolic capacities (30). Several recent reviews have enlightened the fact that hepatocytes differ also in a variety of morphometric, histochemical, and biochemical characteristics depending on their location (10,13,17-19). Following the blood stream along the liver acinus, at least two different zones can be discerned. The first zone includes hepatocytes located in proximity to the terminal portal venules or periportal hepatocytes (PP-H) which are perfused with blood rich in O₂, substrates, and hormones. The second zone includes hepatocytes in the vicinity of terminal hepatic venules or perivenous hepatocytes (PV-H), which are perfused with blood containing lower concentrations of O₂, substrates, and hormones, and with higher concentrations of CO₂ and other by-products of metabolism (17). Regarding carbohydrate metabolism, it appears that PP-H possess higher levels of gluconeogenic enzymes and PV-H possess higher levels of glycolytic enzymes (19). Thus, periportal cells show a greater capacity for gluconeogenesis and perivenous cells for glycolysis even though all enzymes implicated in these metabolic pathways are present in both zones.

Supporting the view that metabolic zonation has a functional significance, it has been shown in studies, using anterograde and retrograde liver perfusions (4,24,25), that this heterogeneous expression of enzyme activity results in markedly different gluconeogenic and glycolytic capacities between the two populations of hepatocytes. More recently, direct measurements of glucose flux in isolated hepatocytes confirmed the zonation model for gluconeogenesis by demonstrating an

up to two-fold higher rate of glucose production from ALA or a LAC+PYR mixture in PP-H compared to PV-H (6,15).

An important characteristic of the zonation of liver carbohydrate metabolism is its dynamism and adaptability in response to many physiological and pathophysiological situations where the glucostat function of the liver is altered. These situations where metabolic zonation is modified in order to cope with the particular needs of the moment include among others: normal development (16), starvation (>24 hrs) (16,21,33), high protein or high fat diet (34), cold adaptation (31,32), streptozotocin- and alloxan-induced diabetes (16,27), thioacetamide-induced liver cirrhosis (28), and partial hepatectomy (16). Of these experiments, perhaps the strongest evidence of a metabolic zonation adaptation comes from Shiota et al. (31) who showed selectively higher glucose production from gluconeogenic precursors in PV-H but not in PP-H after 5 days of cold exposure.

In the latter experimentation (31), cold exposure was used as a long-term gluconeogenic stimulus. A much more common and perhaps even more powerful stimulus for gluconeogenesis is physical activity. It is well known that prolonged exercise increases gluconeogenesis (35) which is of major importance since the inhibition of this metabolic process can alter glucose homeostasis and consequently the capacity of performing activity (14). Thus, the question that arises is whether or not the acute stimulation of gluconeogenesis by exercise causes a perturbation of the metabolic zonation. In the affirmative, the metabolic zonation adaptability could represent an important and perhaps fundamental aspect of liver adaptation in response to exercise.

The present study was conducted to examine the effect of exercise on the gluconeogenic capacity of PP-H and PV-H isolated from the liver of rats subjected to a submaximal exercise bout of 60 min on a rodent treadmill. In order to isolate activation of gluconeogenesis from glycogenolysis, the effect of exercise on glucose production flux in PP-H and PV-H was studied in 18-h fasted rats for which the pool of glycogen can be considered as negligible. Total glucose production flux (glycogenolysis + gluconeogenesis) was also determined in isolated PP-H and PV-H of normally fed rats, to determine the response of PP-H and PV-H under normal exercising conditions. The main finding of the present work is that exercise in the fasted state affects the gluconeogenic capacity in such a way that the PV-H are able to increase their glucose production to the level of the PP-H. This results in the disappearance of the difference in the gluconeogenic contribution between PP-H and PV-H seen in all the other conditions.

METHODOLOGY

Animal care. All experiments described in this report were conducted according to the directives of the Canadian Council on Animal Care. Male Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, Québec) weighing 280-300 g were housed in pairs and allowed pellet rat chow and tap water ad libitum for 10 to 14 days. Lights were on from 0700 until 1900, and the room temperature was maintained at 20-23°C. Two days after their arrival, all rats were submitted once a day to a 5 day habituation running protocol on a motor-driven rodent treadmill starting at 15 m/min (0% grade) for 15 min on the first day and progressively increased to 26 m/min for 50 min (0% grade) on the fifth day.

Groups and exercise protocol. The day before experimentation, rats were randomly assigned to either well-fed or overnight-fasted groups. Food was removed from cages of fasted rats by 1700 the day before experimentation (≈ 18 h). Since the pool of glycogen in the fasted group can be considered as negligible (2), all of the glucose production in this group was assumed to be the result of gluconeogenesis. No attempt was made to discriminate between the contribution of glycogenolysis and gluconeogenesis to the glucose production of hepatocytes in the fed rats. On the day of the experiment, rats were further divided into a rest and an exercise group. The experiments were run between 0930 and 1100. The exercise test consisted of running on the treadmill for 60 min at 26 m/min (0% grade). At the end of the running or resting period, all rats were rapidly anesthetized with pentobarbital sodium (40 mg/kg ip). PP-H and PV-H were obtained from different rats in each condition.

Isolation of hepatocytes. Selective isolation of PP-H and PV-H was made according to the technique described by Gascon-Barré et al. (10) with minor modifications. Briefly, the portal vein and the superior vena cava were cannulated with blunted needles (16 G) for selective anterograde and retrograde perfusion and digitonin injection. Both needles were positioned to rest at approximately 1 cm to the liver. The liver was perfused in open circuit in the anterograde direction at 37°C, pH 7.4 with saturated (95% O₂, 5% CO₂) perfusion medium at a rate of 25 ml/min for 5 min using a peristaltic pump (Cole Parmer Instrument Co). The perfusion medium consisted of 118.9 mM NaCl, 4.76 mM KCl, 1.19 mM KH₂PO₄, 1.19 mM MgSO₄ (7H₂O), and 25 mM NaHCO₃. For selective destruction of PP-H or PV-H, digitonin (Boehringer Mannheim) 7 mM dissolved in a buffer containing 137 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.1 mM CaCl₂, 0.65 mM MgSO₄, and 10 mM HEPES at 90°C was infused at 37°C in the portal vein in the anterograde direction (PP-H destruction) or in the caval catheter in the retrograde direction (PV-H destruction) at a rate of 10 ml/min using a microinfusion pump (Harvard Apparatus Inc. mod. 55-111). The infusion was maintained until the characteristic discolouration pattern was observed (23). In most of the preparations, this was achieved in less than 30s, the procedure being commonly longer for PV-H destruction. Subsequently, the liver was perfused with the perfusion medium for 5 min at a rate of 40 ml/min in open circuit in the opposite direction of the one used for the digitonin infusion. Following this, collagenase (Worthington Biochemical, CLS-2, 274 u/mg) 0.35 g% in perfusion medium supplemented with 2.4 mM CaCl₂, was infused at a rate of 12 ml/min for 7-8 min to achieve liver digestion. Digestion was considered complete when gentle finger pressure on a liver lobe resulted in fracture of the liver surface (2). The liver was, thereafter, excised and

transferred to a petri dish where it was gently disrupted with forceps. The cell solution was filtered through a nylon mesh and centrifuged twice at (2 min, 50 x g), and the supernatant discarded. Finally, cells were resuspended in a Falcon tube with approximately 15 ml of ice cold perfusion medium supplemented with 2.4 mM CaCl₂. The upper part of the tube was gassed for 1 min with 95% O₂, 5% CO₂ and left on ice for 1h before incubation.

Incubations. Hepatocytes were incubated at 10 mg/ml dry weight estimated from the weight of the wet packed cells (dry weight = wet weight/3.8; ref. 2) in closed vials saturated with 95% O₂, 5% CO₂ in a final volume of 2.8 ml (118.9 mM NaCl, 4.76 mM KCl, 1.19 mM KH₂PO₄, 1.19 mM MgSO₄ (7H₂O), 25 mM NaHCO₃, 2.4 mM CaCl₂, pH 7.4, 37°C). The dry weight of each hepatocyte preparation was subsequently determined by allowing a precise amount (500 uL) of the hepatocyte solution to dry out for two days in a warm dry area. The dry weight values of each hepatocyte preparation were subsequently used in the calculations. When a gluconeogenic substrate was present, 2% bovine serum albumin (Boehringer Mannheim) combined with oleate 2 mM (Sigma) was added. Cells were left for an equilibration period of 20 min in the shaking (2 Hz) thermostated (37°C) waterbath. At t = 0, either no substrate, or 20 mM final concentration alanine (Boehringer Mannheim), or 20 : 2 mM lactate (Sigma) pyruvate (Boehringer Mannheim) mixture was added. Cells were incubated for 45 min and sampling was made every 15 min. Metabolic reactions were stopped by deproteinizing the sample (400 ul) in HClO₄ (final concentration 5% vol/vol) and vortexing. After centrifugation (2 min, 16,000 x g), the supernatant was removed and neutralised with KOH and (2N)-3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (0.3 M) for subsequent glucose determination (1).

The glucose accumulation over time was used to compute the glucose accumulation rate (glucose flux or J_{glucose}). For all incubations with LAC+PYR or ALA, the glucose fluxes computed were corrected for endogenous glucose production in order to obtain the glucose flux produced from the addition of substrates.

Cell viability and PP-H and PV-H enriched preparations. The exclusion of trypan blue by intact cells is a commonly used method to distinguish between intact and damaged cells. The disadvantage of this procedure is the subjective error involved in microscopic counting of cells (22). The most sensitive method for determination of the viability of isolated liver cells is gluconeogenesis from lactate (22). At a given damage of the membrane it allows to estimate the extent of disturbances of coordinated cellular syntheses. But the results are not readily available. Since in the present experiment glucose production from gluconeogenesis was measured, glucose production in the basal fasted state was used as the ultimate criteria of cell viability to which glucose flux measurements obtained under similar conditions were compared. The test of exclusion of trypan blue was, however, run on each individual sample to obtain a rapid estimation of the cell viability and to avoid the use of an unacceptable (< 80%) hepatocyte preparation. Glutamine synthetase activity (26) was determined in PP-H and PV-H in resting and exercising animals to ensure the adequacy of the cell enriched preparations.

Statistical analyses were performed by a three-way analysis of variance for non-repeated-measures. Comparisons of glutamine synthetase activities were done by using the Student's *t* test. Statistical significance was achieved at $P < 0.05$.

RESULTS

Activity of the marker enzyme in PP-H and PV-H. The activity of glutamine synthetase was significantly ($P < 0.01$) higher in PV-H than PP-H both at rest and after the exercise bout whether in the fed or in the fasted condition (Table 1).

Glucose concentrations in incubations. Whether PP-H and PV-H were incubated without any exogenous substrate (endogenous glucose production), or with LAC+PYR, or with ALA, a linear increase in glucose concentration in the incubation medium was observed over time in all experimental conditions. An example of this relation is shown in Fig. 1 for the experiments performed in the rest-fast condition. The linearity of the glucose accumulation over time was used to compute the glucose accumulation rate (glucose flux or J_{glucose}) shown in Figs. 2, 3, and 4.

Endogenous glucose production. As expected, fasting, compared to the fed condition, resulted in overall lower endogenous J_{glucose} ($P < 0.01$) for all types of hepatocyte preparation (Fig. 2). In the fed state, PP-H and PV-H isolated from exercised rats displayed a lower J_{glucose} ($P < 0.01$) from endogenous substrates compared to PP-H and PV-H isolated from resting rats. In the fasted state, acute exercise led to a somewhat higher endogenous glucose production ($P < 0.05$) compared to rest in PP-H but not in PV-H, resulting in a small but significant ($P < 0.05$) difference between PP-H and PV-H in the exercise condition. In all other experimental conditions, no significant differences were observed between PP-H and PV-H for endogenous glucose production.

Glucose flux from lactate + pyruvate. Fasting, compared to the fed condition, resulted in overall higher J_{glucose} from LAC+PYR ($P < 0.01$) for all types of

hepatocyte preparations (Fig. 3). In both fed and fasted state, exercise, as compared to rest, resulted in higher J_{glucose} ($P < 0.01$) from LAC+PYR in PV-H only (100 % and 51 % higher in PV-H in the fed and fasted state, respectively, vs 9% and 10% in PP-H). In the fed state, this selectively higher value of J_{glucose} in PV-H following exercise led to an attenuation of the porto-venous zonation of LAC+PYR-induced glucose production, which remained significant ($P < 0.01$). However, in the fasted state, the selective exercise effect on J_{glucose} in PV-H led to a non-significant difference in porto-venous zonation of LAC+PYR-induced gluconeogenesis (3.81 ± 0.27 vs 3.31 ± 0.29 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ dry cells in PP-H and PV-H, respectively).

Glucose flux from alanine. When PP-H and PV-H, isolated from fed rats kept at rest, were incubated with ALA (Fig. 4), the measured glucose accumulation was equal to (PP-H) or less than (PV-H) glucose accumulations measured in the incubations with no exogenous substrate (Fig. 1). Therefore, the computed J_{glucose} from ALA was near zero in PP-H and negative in PV-H. As for incubations with LAC+PYR, fasting, compared to the fed condition, resulted in an overall higher J_{glucose} ($P < 0.01$) from ALA for all types of hepatocyte preparations (Fig. 4). Exercise resulted in significantly higher J_{glucose} ($P < 0.01$) from ALA in both PP-H and PV-H, in the fed as well as in the fasted state (42% for PP-H and 94 % for PV-H in the fast state). In the fed-exercise state, J_{glucose} from ALA was much higher in PP-H compared to PV-H ($P < 0.01$). However, as it was observed with LAC+PYR, exercise in the fasted state resulted in a non-significant difference in porto-venous zonation of the gluconeogenic capacity from ALA (1.79 ± 0.09 vs 1.49 ± 0.11 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ dry cells in PP-H and PV-H respectively).

DISCUSSION

The digitonin-collagenase hepatocyte isolation procedure used in the present experiment resulted in PP-H and PV-H preparations that produced glucose in the same range as those previously reported in studies conducted under similar conditions (fast, rest; 6,15,31). Shiota et al. (31), using incubations of hepatocytes in the presence of saturating substrate concentrations, reported gluconeogenic fluxes from LAC+PYR of ~ 3.7 and $\sim 2.3 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ in PP-H and PV-H, respectively (PP-H / PV-H = 1.6). In the same study, gluconeogenic fluxes from ALA were of ~ 2.1 and $\sim 1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ in PP-H and PV-H, respectively (PP-H / PV-H = 2.1). These values compare well with results of the present experiment obtained in incubated hepatocytes isolated from resting - fasted rats. Indeed, J_{glucose} from LAC+PYR were 3.45 and $2.19 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ in PP-H and PV-H, respectively, yielding a PP-H / PV-H ratio of 1.58. The same J_{glucose} values from ALA were of 1.26 and $0.77 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ in PP-H and PV-H, respectively, yielding a PP-H / PV-H ratio of 1.64. Taken together, these comparisons of glucose flux values and PP-H / PV-H ratios obtained in the fast-rest conditions indicate that the cell viability of our preparations was very high. The activity of glutamine synthase has been used as a stable marker of selective enrichment for PV-H isolated by digitonine-collagenase methods (11) because this enzyme is localized exclusively within a small population of parenchymal cells that surround the terminal hepatic venules. The large differences in glutamine synthase activity found in the present cell preparations, whether at rest or after exercise, indicate that the present PP-H and PV-H enriched preparations were not altered by the exercise stimulus and

also give a good indication that the digitonin-collagenase technique used in the present experiment allowed to obtain PP-H and PV-H enriched preparations.

Since glucose production from glycogenolysis can be considered as negligible in the fasted state, J_{glucose} measured at rest and after exercise in fasted rats was assumed to be solely the result of the gluconeogenic activity. The main finding of the present experiment was that an acute bout of exercise in fasted rats resulted in an unequal increase of J_{glucose} in PP-H and PV-H. Exercise resulted in the stimulation of J_{glucose} from ALA in both PP-H and PV-H of fasted rats. However, the magnitude of this stimulation appears to be greater in PV-H than PP-H, resulting in the disappearance of the porto-venous differences observed in the rested state. The same phenomena was seen when LAC+PYR was used as substrate with the exercise-induced activation of J_{glucose} in fasted rats observed only in the PV-H. The proportionally greater stimulation of gluconeogenesis by fasting and exercise in PV-H compared to PP-H led to an attenuation and even the disappearance of the initial porto-venous expression of the zonation of gluconeogenic capacity from both LAC+PYR and ALA. The disappearance of the metabolic zonation effect with stronger gluconeogenic stimuli is also illustrated by the decreasing PP/PV ratios of J_{glucose} (Table 2). These data show that as the gluconeogenic stimulus becomes more intense, there is a clear trend to homogeneity ($\text{PP-H/PV-H} = 1.00$) in the gluconeogenic activity of PP-H and PV-H. Overall, the present data indicate that exercise increases gluconeogenic activity in both PP-H and PV-H but that the increase in PV-H is predominant over PP-H with stronger gluconeogenic stimuli.

In the only other study reporting the effects of exercise on gluconeogenesis using the isolated hepatocyte model (from whole liver), the authors observed that only

hepatocytes isolated from trained but not untrained rats showed an increase in gluconeogenic activity during exercise (3). The disparity of these results for the untrained rats and that of the present study might be due to the use of somewhat different gluconeogenic precursors or to the use of a somewhat milder exercise intensity. It is also possible that if these authors (3) had looked up at the effects of exercise on gluconeogenic activity in PV-H and PP-H instead of a mixture of hepatocytes, they might have found a different response for the two types of cells. This interpretation, based on the present findings of a heterogeneous increase in the gluconeogenic response of the hepatocytes to the exercise stimulus, raised the view that the different types of hepatocytes should be considered when it comes to the interpretation of the metabolic effects of exercise on the liver. For instance, it could be speculated that the enhanced hepatic gluconeogenic capacity shown to occur with training in *in situ* perfused liver preparation (5,9) could be the result of a greater adaptation of PV-H than PP-H.

Without exogenous gluconeogenic substrates, glucose production (J_{glucose}) depends mainly on hepatic glycogenolysis. No difference in endogenous J_{glucose} between PP-H and PV-H in the resting state was recorded either in the fed or in the fast state (Fig. 2). In the fed group, the fact that the overall endogenous J_{glucose} values were lower after exercise than at rest is most likely related to the lower hepatic glycogenolytic activity due to the lower liver glycogen content following exercise. The even lower endogenous J_{glucose} values found in the fast state (Fig.2) support this contention. On the other hand, the higher endogenous J_{glucose} values found in PP-H than in PV-H following exercise in the fast state (Fig.2) may be explained by a somewhat larger contribution of gluconeogenesis from endogenous substrate since it is

documented that substantial hepatic proteolysis (up to 0.23 g/h) occurs during exercise (20). Therefore, one could speculate that protein degradation persisted after hepatocyte isolation thus making some gluconeogenic precursors available.

The measurement of glucose fluxes in the fed rats in the present experiment was carried out only to obtain some information on the contribution of PP-H and PV-H at rest and after exercise in a normal situation. It is difficult to interpret the J_{glucose} in terms of glycogenolytic and gluconeogenic contribution since both metabolic pathways can contribute to the J_{glucose} even if the endogenous production is subtracted from the fluxes measured with the addition of substrates. Also the addition of substrates may have an impact on the endogenous glucose production in the fed state. Nevertheless, it is interesting to note the higher J_{glucose} in PP-H than PV-H at rest and after exercise with the addition of LAC+PYR and ALA (Fig.3 and 4).

The mechanisms underlying the metabolic zonation adaptations are far from being well understood. Numerous factors could potentially be responsible for the larger increase in gluconeogenic activity in PV-H than in PP-H following exercise in the fast state. The main evidence points to the phosphoenolpyruvate-pyruvate cycle. It has been reported that the phosphoenolpyruvate-pyruvate cycle has a flux control coefficient for gluconeogenesis of $\sim 60\%$ with LAC+PYR as precursors (12,29). In their study using cold acclimatization as gluconeogenic stimulus, Shiota et al. (31) proposed that the selective increase of the gluconeogenic capacity of the PV-H could be due to the increase in the enzymatic activity of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK). They observed a greater increase in PEPCK activity in PV-H than in PP-H. The same phenomenon could have occurred in the present study based on the following. PEPCK is distributed heterogeneously across the liver acinus and long term

starvation (84 h) causes an increase in the overall (all hepatocytes from one acinus) PEPCK activity (33). In exercise conditions, PEPCK activity measured from liver biopsy has been shown to increase (7,36) or remain constant (8) from rest to exercise. Therefore, it is possible that exercise could cause an increase in PEPCK activity, particularly in the PV-H, and that this would be responsible, at least in part, for the perturbation of the metabolic zonation observed in the present study.

The increase in J_{glucose} subsequent to an increase in PEPCK activity is, however, more likely to take place when LAC+PYR, instead of ALA, is used as gluconeogenic precursor. At high concentrations of ALA, it appears that the increase in gluconeogenic flux is mostly due to an increased transamination (the other factor being membrane transport), which has a high flux control coefficient for gluconeogenesis in these conditions (5). It is well known that ALA aminotransferase is mostly located in the periportal zone (17). However, to our knowledge, the effect of exercise on alanine aminotransferase activity or its zonation is not known. Therefore, it could be hypothesized that the loss of hepatic zonation of gluconeogenesis from ALA in the fast-exercise condition could be due to a proportionally greater increase in flux through transamination in PV-H compared to PP-H.

In summary, taking into account that the present experiment was conducted on isolated hepatocytes using saturating concentrations of gluconeogenic precursors (ALA and LAC+PYR) in the post-exercise situation, the present results in fasted rats indicate that the PP-H have higher gluconeogenic capacities than PV-H in resting conditions. Exercise increased glucose production from ALA in both cell populations (PP-H and PV-H) but when LAC+PYR was used as gluconeogenic precursor, increased glucose production was observed in PV-H only. The PV-H were able to

increase their glucose production following exercise from both precursors (ALA and LAC+PYR) to the level of PP-H resulting in the disappearance of the difference in the gluconeogenic contribution between PP-H and PV-H. The present data point to the recommendation that hepatic zonation should be considered when analysing the contribution of the liver to energy metabolism during exercise.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and Fonds pour la formation des chercheurs et l'aide de la recherche (Gouvernement of Québec).

BIBLIOGRAPHY

1. Bergmayer, H. U. *Methods for Enzymatic Analysis*. New York: Academic, 1974.
2. Berry, M. N., A. M. Edwards, and G. J. Barrit. *Isolated hepatocytes preparation, properties and applications*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1991.
3. Bobyleva-Guarriero, V., and H. A. Lardy. The effect of different types of physical exercise on glucose and citrulline synthesis in isolated rat liver parenchymal cells. *FEBS* 194: 56-59, 1986.
4. Bracht, A., J. Constantin, E. L. Ishii-Iwamoto, and F. Suzuki-Kemmelmeier. Zonation of gluconeogenesis from lactate and pyruvate in the rat liver studied by means of anterograde and retrograde bivascular perfusion. *Biochem. Biophys. Acta* 1199: 298-304, 1994.
5. Burelle, Y., C. Fillipi, F. Péronnet, and X. Leverve. Mechanisms of increased gluconeogenesis from alanine in rat isolated hepatocytes after endurance training. *Am. J. Physiol.* 278: E35-E42, 2000.
6. Chen, K. S., and J. Katz. Zonation of glycogen and glucose syntheses, but not glycolysis, in rat liver. *Biochem. J.* 255: 99-104, 1988.
7. Dohm, G. L., G. J. Kasperek, and H. A. Barakat. Time course of changes in gluconeogenic enzyme activities during exercise and recovery. *Am. J. Physiol.* 249: E6-E11, 1985.
8. Dohm, G. L., and E. A. Newsholme. Metabolic control of hepatic gluconeogenesis during exercise. *Biochem. J.* 212: 633-639, 1983.

9. Donovan, C. M., and K. D. Sumida. Training enhanced hepatic gluconeogenesis: the importance for glucose homeostasis during exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 29: 628-634, 1997.
10. Gascon-Barre, M., N. Benbrahim, and C. Tremblay. Hepatic zonation of drug metabolizing enzymes. Studies on hepatocytes isolated from the periportal of perivenous region of the liver acinus. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67: 1015-1022, 1989.
11. Gebhardt, R. Metabolic zonation of the liver regulation and implications for liver function. *Pharmac. Ther.* 53: 275-354, 1992.
12. Groen, A. K., C. W. T. van Roermund, R. C. Vervoorn, and J. M. Tager. Control of gluconeogenesis in rat liver cells. *Biochem. J.* 237: 379-389, 1986.
13. Gumucio, J. J. Hepatocyte heterogeneity: the coming of age from the description of a biological curiosity to a partial understanding of its physiological meaning and regulation. *Hepatology* 9: 154-160, 1989.
14. John-Alder, H. B., R. M. McAllister, and R. L. Terjung. Reduced running endurance in gluconeogenesis-inhibited rats. *Am. J. Physiol.* 251: R137-R142, 1986.
15. Jones, C. G., and M. A. Thitradge. Measurement of metabolic fluxes through pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, pyruvate deshydrogenase, pyruvate carboxylase in hepatocytes of different acinar origin. *Arch. of Biochem. and Biophys.* 326: 202-206, 1996.
16. Jungermann, K. Dynamics of zonal hepatocyte heterogeneity. Perinatal development and adaptative alterations during regeneration after partial hepatectomy. *Acta Hist.* 89-98, 1986.

17. Jungermann, K., and N. Katz. Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiol. Rev.* 69: 708-764, 1989.
18. Jungermann, K., and T. Kietzmann. Zonation of perenchymal and nonparenchymal metabolism in the liver. *Ann. Rev. Nutr.* 16: 179-203, 1996.
19. Jungermann, K., and R. G. Thurman. Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of carbohydrates. *Enzyme* 46: 33-58, 1992.
20. Kasperek, G. J., G. L. Dohm, E. B. Tapscott, and T. Powell. Effect of exercise on liver protein loss and lysosomal enzyme levels in fed and fasted rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 164: 430-434, 1980.
21. Katz, N., H. F. Teutsch, K. Jungermann, and D. Sasse. Heterogeneous reciprocal localization of fructose-1,6-bis-phosphatase and of glucokinase in microdissected periportal and perivenous rat liver tissue. *FEBS* 83: 272-276, 1977.
22. Letko, G. A quick test for intactness of hepatocytes. *Acta Biol. Med. Germ.* 37: 663-665, 1978.
23. Lindros, K. O., and K. E. Pentilla. Digitonin-collagenase perfusion for efficient separation of periportal or perivenous hepatocytes. *Biochem. J.* 228: 757-760, 1985.
24. Matsumura, T., T. Kashiwagi, H. Meren, and R. G. Thurman. Gluconeogenesis predominates in periportal regions of the liver lobule. *Eur. J. Biochem.* 144: 409-415, 1984.
25. Matsumura, T., and R. G. Thurman. Predominance of glycolysis in pericentral regions of the liver lobule. *Eur. J. Biochem.* 140: 229-234, 1984.
26. Meister, A. Glutamine synthetase from mammalian tissues. *Methods Enzymol.* 113: 185-199, 1985.

27. Miethke, H., B. Wittig, A. Nath, and K. Jungermann. Gluconeogenic-glycolytic capacities and metabolic zonation in liver of rats with streptozotocin, non-ketotic as compared to alloxan, ketotic diabetes. *Histochem.* 85: 483-489, 1986.
28. Nuber, R., H. F. Teutsch, and D. Sasse. Metabolic zonation in thioacetamide-induced liver cirrhosis. *Histochem.* 69: 277-288, 1980.
29. Rigoulet, M., X. Leverve, P. J. A. Plomb, and A. J. Meijer. Stimulation by glucose of gluconeogenesis in hepatocytes isolated from starved rats. *Biochem. J.* 245: 661-668, 1987.
30. Sasse, D., N. Katz, and K. Jungermann. Functional heterogeneity of rat liver parenchyma and of isolated hepatocytes. *FEBS* 57: 83-88, 1975.
31. Shiota, M., Y. Fujimoto, M. Inagami, M. Hiramatsu, M. Moriyama, K. Kimura, M. Ohta, and T. Sugano. Adaptive changes in zonation for gluconeogenic capacity in liver lobules of cold-exposed rats. *Am. J. Physiol.* 265: E559-E564, 1993.
32. Shiota, M., M. Inagami, Y. Fujimoto, M. Moriyama, K. Kimura, and T. Sugano. Cold acclimatation induces zonal heterogeneity in gluconeogenic responses to glucagon in rat liver lobule. *Am. J. Physiol.* 268: E1184-E1191, 1995.
33. Wimmer, M. Effects of starvation and refeeding a high carbohydrate diet on the intra-acinar distribution pattern of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in the liver of male and female rats. *Histochem.* 92: 331-336, 1989.
34. Wimmer, M., C. Luttringer, and M. Colombi. Changes in the acinar activity patterns of phosphoenolpyruvate carboxykinase in livers of male and female rats upon feeding a high protein and a high fat diet. *Histochem.* 93: 257-262, 1990.

35. Winder, W. W. Regulation of hepatic glucose production during exercise. *Exer. Sports Sci. Rev.* 13: 1-31, 1985.
36. Zinker, B. A., P. R. Dallman, and G. A. Brooks. Augmented glucoregulatory hormone concentrations during exhausting exercise in mildly iron-deficient rats. *Am. J. Physiol.* 265: R863-R871, 1993.

LEGENDS

- Fig. 1. Glucose accumulation over 45-min incubation period in PP-H and PV-H from endogenous substrate or in presence of saturating concentration of ALA (20mM) or LAC+PYR (20:2 mM) in the rest fast condition. Results are means \pm SE for n = 9 in each group.
- Fig. 2. Glucose flux (J_{glucose}) computed from linear accumulation of glucose over the incubation period of PP-H and PV-H without any substrate. Results are means \pm SE for n = 9 in each group. ++ significantly different ($P < 0.01$) from the corresponding rest group of identical type of hepatocyte preparation, + $P < 0.05$. ** significantly different ($P < 0.05$) between PP-H and PV-H of the same nutritional and activity status. A significant ($P < 0.01$) overall effect of the overnight fast was observed and is not indicated on the graph for sake of clarity.
- Fig. 3. Glucose flux (J_{glucose}) computed from linear accumulation of glucose over the incubation period of PP-H and PV-H in the presence of LAC+PYR (20:2 mM) and oleate (2 mM), after correction for the respective endogenous glucose production. Results are means \pm SE for n = 9 in each group. ++ significantly different ($P < 0.01$) from the corresponding rest group of identical type of hepatocyte preparation. ** significantly different ($P < 0.01$) between PP-H and PV-H of the same nutritional and activity status. A significant overall effect ($P < 0.01$) of the overnight fast was observed and is not indicated on the graph for sake of clarity.

Fig. 4. Glucose flux (J_{glucose}) computed from linear accumulation of glucose over the incubation period of PP-H and PV-H in the presence of ALA (20 mM) and oleate (2 mM), after correction for the respective endogenous glucose production. Results are means \pm SE for $n = 9$ in each group. ++ significantly different ($P < 0.01$) from the corresponding rest group of identical type of hepatocyte preparation. ** significantly different ($P < 0.01$) between PP-H and PV-H of the same nutritional and activity status. A significant overall effect ($P < 0.01$) of the overnight fast was observed and is not indicated on the graph for sake of clarity.

Table 1. Glutamine synthetase activity (nmol/min/100 mg dry cells) in preparation enriched for periportal (PP-H) and perivenous hepatocytes (PV-H) isolated from fed and fasted rats at rest and after the exercise bout.

	Cell Preparations		
	PP-H	PP-V	PP-H/PV-H
Fed Rest	114 ± 14	1086 ± 58*	0.11
Fed Exercise	28 ± 10	1126 ± 54*	0.02
Fast Rest	45 ± 12	723 ± 2*	0.06
Fast Exercise	46 ± 9	655 ± 87*	0.07

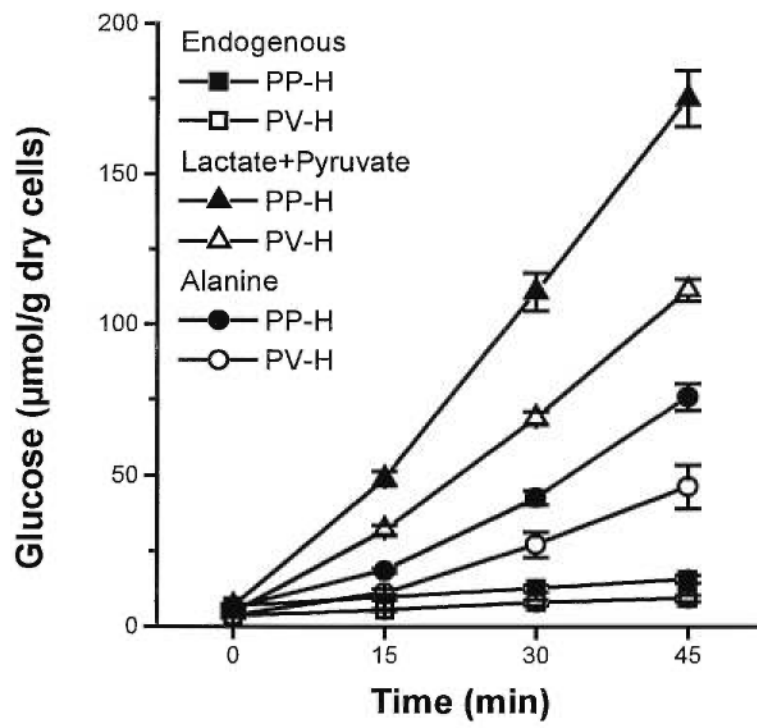
Values are means ± SE for n = 6 in each group

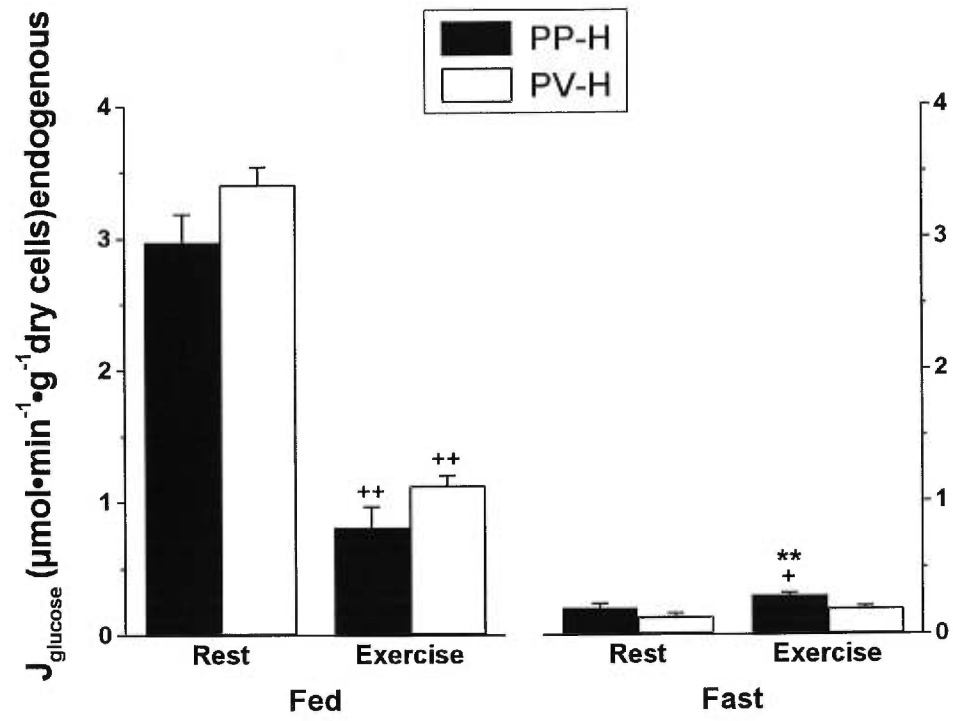
* Significantly different from PP-H, P < 0.01

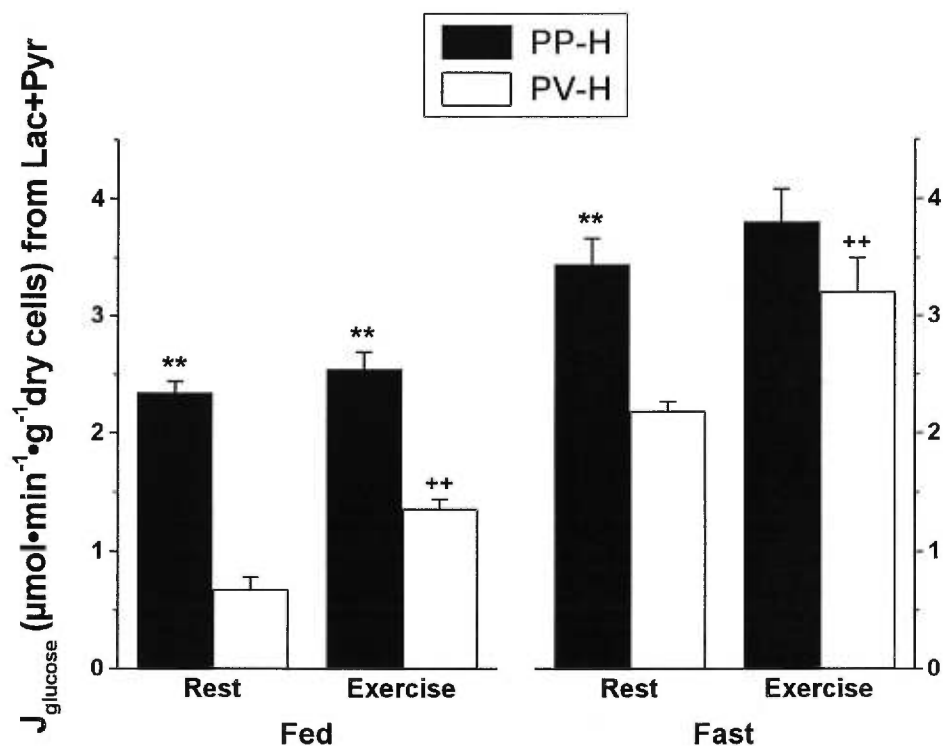
Table 2. PP-H/PP-V ratios* of J_{glucose} from lactate + pyruvate or alanine in different diet and activity conditions.

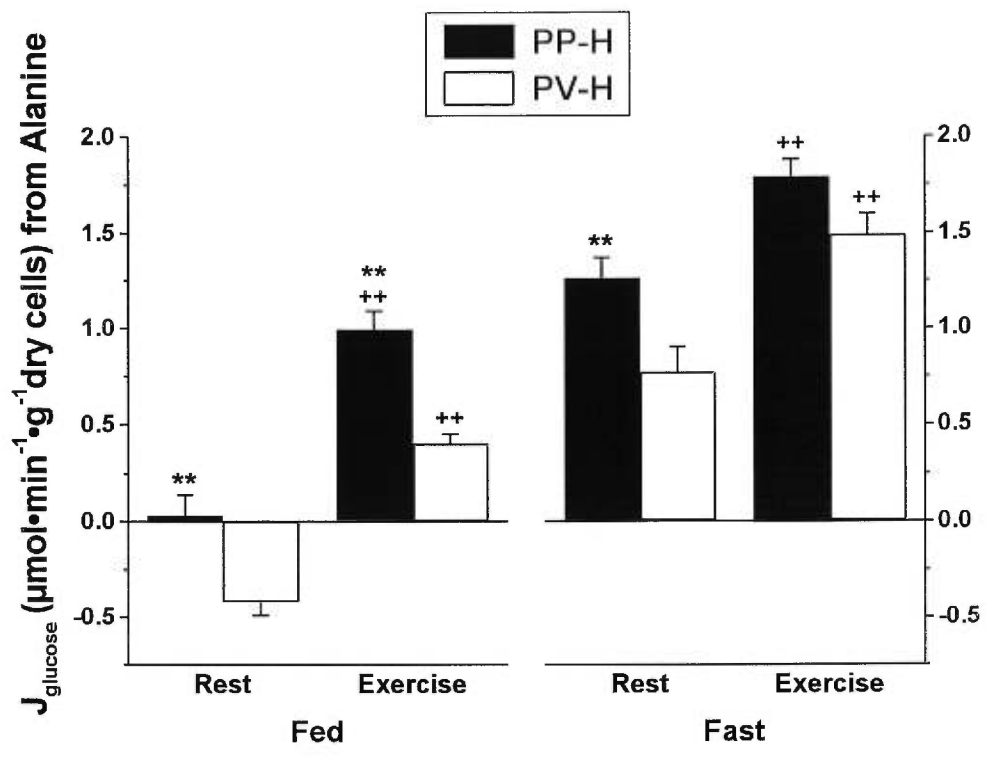
Conditions	LAC+PYR	ALA
Fed Rest	3.46	--
Fed Exercise	1.88	2.48
Fast Rest	1.58	1.64
Fast Exercise	1.15	1.20

*Ratios computed from the mean J_{glucose} values of each group.









2.2 Effects of acute exercise on the DHA metabolism in periportal and perivenous hepatocytes

EFFECTS OF ACUTE EXERCISE ON THE DHA METABOLISM
IN
PERIportal AND PERIVENOUS HEPATOCYTES.

Désy François, Yan Burelle, Patrice Bélanger, and Jean-Marc Lavoie.

Département de Kinésiologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Running title : Hepatic zonation and exercise

Address for correspondence: Dr. Jean-Marc Lavoie

Département de Kinésiologie


Université de Montréal

C.P. 6128, Succ. Centre-Ville

Montréal, (Québec), Canada H3C 3J7

Tel : (514) 343-7044

Fax : (514) 343-2181



ABSTRACT

We have shown that exercise could affect the functional metabolic zonation in hepatocytes isolated from exercised rats. In fact, the higher glucose production from various substrates (lactate + pyruvate mixture or alanine) observed in the periportal hepatocytes (PP-H) compared to the perivenous hepatocytes (PV-H) in an overnight fast resting situation is no longer seen when the gluconeogenic stimulus of the overnight fast is superimposed with exercise. Thus, exercise seems to promote gluconeogenesis in hepatocytes to different extents according to the origin of the cell (PP-H or PV-H). In order to pursue the investigation on this phenomenon, the present study was conducted to examine further the effects of exercise on the gluconeogenic or glycolytic capacity of PP-H and PV-H using other substrates such as dihydroxyacetone (DHA). Interest of using DHA comes from the fact that it can be metabolized through both gluconeogenic and glycolytic pathways. S-D male rats were submitted to an overnight fast (FAST) or not (FED) and to a 60 min treadmill exercise bout (EX) or rest (REST). Metabolic zonation has been evaluated on isolated PP-H or PV-H obtained by selective destruction after liver perfusion with digitonin and collagenase and subsequently incubated (45 min at 37°C saturated with 95% O₂ : 5% CO₂) with saturating concentrations (20 mM) of dihydroxyacetone (DHA) (for determination of glucose production flux (J_G) and lactate + pyruvate production flux (J_{L+P}) and glucose (only for determination of J_{L+P}). J_G and J_{L+P} were calculated from the glucose, lactate and pyruvate concentrations measured. Results showed that J_G ($\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) was not significantly different between PP-H and PV-H in REST or EX conditions but that EX led to a overall higher ($P<0.05$) J_G compared to REST. No significant zonation differences (PP-H vs PV-H) or exercise

effects (REST vs EX) were observed for the J_{L+P} from DHA or from glucose. Total amount of DHA metabolized calculated from J_{2G+L+P} was equivalent between PP-H and PV-H in REST and EX conditions but only J_{2G+L+P} from PP-H was higher ($P < 0.05$) in EX compare to REST. It is concluded that gluconeogenic and glycolytic metabolisms of DHA are equivalent in PP-H and PV-H.

Keywords: hepatic zonation, glucose flux, gluconeogenesis, glycolysis, liver.

INTRODUCTION

Since the work of Lindros and Pentilla (14) and Quistorff (17), successful isolation of periportal (PP-H) and perivenous hepatocytes (PV-H) can be achieved by selective destruction of hepatocytes with a digitonin infusion. Over the years, this technique has been improved and widely used and contributed to better understand the regional specialization of hepatic functions and its dynamism (8,13). One of the most striking evidence of metabolic zonation in the liver is related to carbohydrate metabolism. The levels of enzymes catalyzing gluconeogenesis are higher in the periportal zone and, accordingly, gluconeogenic capacity in PP-H from various precursors is higher than in PV-H (6,12). On the other hand, even if the enzyme levels catalyzing glycolysis are higher in the perivenous zone, discrepancies exist concerning the predominant localization of the glycolytic pathway. Using the isolated hepatocytes model, Chen and Katz found that lactate production from glucose in PV-H was not significantly higher than in PP-H (6), while Matsumura and Thurman, using the stopped flow technique in perfused liver, suggested that glycolysis occurs predominantly in the perivenous zone (15).

We have recently showed that exercise could modify the metabolic zonation of gluconeogenesis seen at rest. Selective isolation of PP-H and PV-H from overnight fasted rats submitted to a 60 min bout of treadmill running or rest, immediately before the isolation procedures permitted to show that the higher glucose production capacity of PP-H over the PV-H from alanine or lactate-pyruvate mixture in the rest situation is no longer significant when cells are obtained after the exercise period (). This suggests that some unknown factors governing metabolic zonation in the liver are affected by exercise and, in the scope of exercise metabolic regulation, this points to a

whole new field of unrevealed metabolic regulation mechanisms that deserves to be elucidated.

The purpose of the present study is to investigate the effects of exercise on the capacity of PP-H and PV-H to synthesize glucose from dihydroxyacetone (DHA) and to degrade DHA or glucose to lactate + pyruvate. The advantage of using DHA is that it can be oriented in both glucose or lactate + pyruvate production.

METHODOLOGY

Animals. The experiments described in this report were conducted according to the directives of the Canadian Council on Animal Care. Male Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, Québec) weighing 280-300 g were housed in duo, kept on 12 :12 h light-dark cycle and fed pellet rat chow and tap water ad libitum for 10 to 14 days. The room temperature was maintained at 20-23 °C. 2 days after their arrival, all rats were submitted once a day to an habituation running protocol on a motor-driven rodent treadmill starting at 15 m/min (0% grade) for 15 min on the first day and progressively increased to 26 m/min for 50 min (0% grade) on the fifth day.

Group and exercise protocol. The day before experimentation, rats were randomly divided into a well-fed and an overnight fasted groups. On the day of the experiment, rats were further divided into a rest and an exercise group. The experiments were run between 0930 and 1100. The exercise test consisted of running on the treadmill for 60 min at 26 m/min (0% grade). At the end of the running or resting period, all rats were rapidly anaesthetized with pentobarbital sodium (40 mg/kg ip). PP-H and PV-H were obtained from different rats in each condition.

Isolation of hepatocytes. Selective isolation of PP-H and PV-H was made according to the method described by Gascon-Barré et al. (8) with minor modifications. Briefly, the portal vein and the superior vena cava were cannulated with blunted needles (16 G) for selective anterograde and retrograde perfusion and digitonin injection. Both needles were positioned to rest at approximately 1 cm to the liver. The liver was perfused in open circuit in the anterograde direction at 37°C pH 7.4 with saturated

(95% O₂ 5% CO₂) perfusion medium at 25 ml/min for 5 min using a peristaltic pump (Cole Parmer Instrument Co). The perfusion medium consisted of 118.9 mM NaCl, 4.76 mM KCl, 1.19 mM KH₂PO₄, 1.19 mM MgSO₄ (7H₂O) and 25 mM NaHCO₃. For selective destruction of PP-H or PV-H, digitonin (Boehringer Mannheim) 7 mM dissolved in a buffer containing NaCl 137 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 1.1 mM, MgSO₄ 0.65 mM, Hepes 10 mM at 90 °C was infused at 37 °C in the portal vein in the anterograde direction (PP-H destruction) or in the caval catheter in the retrograde direction (PV-H destruction) at 10 ml/min using a microinfusion pump (Harvard Apparatus Inc. mod. 55-111). The infusion was maintained until the characteristic decolorization pattern was observed (14). In most of the preparations, this was achieved in less than 30 sec, the procedure being commonly longer for PV-H destruction. After that, the liver was perfused in open circuit in the opposite direction of the digitonin infusion with the perfusion medium previously described for 5 min at 40 ml/min. Then, collagenase (Worthington Biochemical, CLS-2, 274 u/mg) 0.35 g % in perfusion medium supplemented with 2.4 mM CaCl₂, was infused at 12 ml/min for 7-8 min to achieve liver digestion. Digestion was considered complete when gentle finger pressure with the finger on the underneath of the liver lobe resulted in fracture of the liver surface (5). Then, the liver was excised and transferred in a petri dish where it was gently disrupted. The cell solution was centrifuged twice at 50 G and the supernatant discarded. Cells were resuspended in a final volume of approximately 15 ml in ice cold perfusion medium supplemented with 2.4 mM CaCl₂ in a Falcon tube. The upper part of the tube was gassed 1 min with 95% O₂, 5% CO₂ and were left on the ice for 1 h before the incubation.

Incubations. Hepatocytes were incubated at 10 mg/ml dry weight estimated from the weight of the wet packed cells (dry weight = wet weight/3.8 ref. (3)) in closed vials saturated with 95% O₂, 5% CO₂ in a final volume of 2,8 ml (118.9 mM NaCl, 4.76 mM KCl, 1.19 mM KH₂PO₄, 1.19 mM MgSO₄ (7H₂O), 25 mM NaHCO₃, 2.4 mM CaCl₂ pH 7.4, 37 °C). The dry weight of each hepatocyte preparation was subsequently determined by letting a precise amount (500 uL) of the hepatocyte solution to dry out for two days in a warm dry area. Thus, the precise dry weight values of each hepatocyte preparation were used in the calculations. When a gluconeogenic substrate was present, 2 % bovine serum albumin (Boehringer Mannheim) combined with oleate 2 mM (Sigma) was added. Cells were left for an equilibration period of 20 min in the shaking (2 Hz) thermostated waterbath. At t = 0, either no substrate, or 20 mM final concentration dihydroxyacetone (DHA) (Sigma Aldrich) or 40 mM glucose (Sigma) was added. Incubation were held for 45 min and sampling was made every 15 min. Metabolic reactions were stopped by deproteinizing the sample (400 ul) in HClO₄ (final concentration 5 % vol./vol.) and vortexing. After centrifugation (2 min, 16000 g), the supernatant was removed and neutralised with KOH and (2N)-3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (0.3 M) for subsequent glucose assay (4).

The glucose fluxes computed were corrected for the endogenous glucose production (data not shown) in order to obtain a glucose flux more specific to the added substrates. Since the experimentations were performed without any labelled substrate in the well fed state as in the overnight state, only glucose production from DHA in the fasted state can be interpreted as gluconeogenesis, the endogenous glucose production in that condition being negligible.

Analytic method. Statistical analyses were performed by an analyse of variance non-repeated-measures design. Statistical significance was achieved at $P < 0.05$.

RESULTS

Glutamine synthetase activity. Table I shows the distribution of the marker enzyme glutamine synthetase. The enzyme maximal activity is very low in PP-H compared to PV-H, indicating that satisfactory enriched cell preparations were produced.

Total DHA metabolism. Since fatty acids are present in the incubation medium, the flux through pyruvate dehydrogenase is very low, therefore pyruvate oxidation can be neglected. Thus, the total DHA metabolism can be obtained by adding all fluxes of all the end products from DHA (glucose, lactate and pyruvate). Since two molecules of DHA are required for the formation of one molecule of glucose, the amount of glucose produced from DHA must be multiplied by two, therefore the total metabolism of DHA is given by adding 2 times the glucose flux (J_G) to the lactate + pyruvate flux, thus, J_{2G+L+P} (1).

Total DHA metabolism is presented in Fig. 1. No difference in the total DHA metabolism of PP-H and PV-H were recorded in any of the conditions indicating that the same amount of DHA was metabolized by the PP-H and PV-H. Exercise led to a higher total DHA metabolism in PV-H in the fed state and in the PP-H in the fasted state. Although statistically significant, these differences were modest in the sense that they did not cause significant differences in the total DHA metabolism values of PP-H and PV-H.

Glucose production (J_G). J_G are presented in Fig 2. In the fed rest condition, PP-H released more glucose in the incubation medium than did the PV-H. Since the DHA used was not labelled, one cannot determine if the higher glucose production was

solely the result of higher gluconeogenic activity or if the incubation with DHA modified the endogenous glucose production. No other significant difference in the J_G between PP-H and PV-H was noted in the remaining conditions. Exercise in the fasted state resulted in higher glucose production in both PP-H and PV-H which, in this case, represent a higher gluconeogenic activity.

Lactate + pyruvate production (J_{L+P}). J_{L+P} from DHA are presented in Fig. 3 and J_{L+P} from glucose are presented in Fig. 4. PP-H values were not different from PV-H values in any condition and exercise did not influence significantly the J_{L+P} in any cell type.

DISCUSSION

The main findings of the present study are that the gluconeogenic activity (glucose production in the fasted state) from DHA is similar for both PP-H and PV-H and that the glycolytic activity, as reflected by the lactate + pyruvate production from DHA or from glucose, is also not significantly different between the two cell types.

Since enriched (PP-H or PV-H) cell preparations were used, one could argue that the absence of differences between the gluconeogenic activities from DHA and the glycolytic activities of PP-H and PV-H presented here could be the result of poor cell isolation procedures i.e. that the PP-H and PV-H preparations were not truly representative of the PP-H and PV-H metabolism because of a too high degree of contamination between cell types. This conclusion is unlikely since the exact same cell preparations, when incubated with other gluconeogenic substrates such as alanine and lactate + pyruvate mixture, displayed significantly different glucose productions (PV-H > PP-H) () and also because the PP-H : PV-H ratio of the marker enzyme glutamine synthetase is less than 0.11 in all groups which is what is commonly seen in the literature (6,12). Therefore, this indicates that the hepatocyte isolation procedures performed were successful and that the absence of difference between the gluconeogenic activities from DHA and the glycolytic activities of PP-H and PV-H reported here appropriately represent the physiological reality.

The similar gluconeogenic capacity (glucose production in the fasted state) from DHA in the rested condition found between PP-H and PV-H in the present work contrasts with the results of Chen and Katz (6). They reported a 20 % lower glucose production from DHA for PV-H compared to PP-H. Gluconeogenesis from DHA appears to be strongly affected by the pyruvate kinase flux which is highly sensitive to

a decrease in cytosolic ATP/ADP ratio (16). In fact, it has been suggested that a decrease in cellular ATP concentration (following the addition of metformin) was responsible for the activation of the pyruvate kinase activity and, consequently, the inhibition of the gluconeogenic process (1). Since it is known that the levels of ATP, ADP, and Pi are equivalent in PP-H and PV-H (10), a similar gluconeogenic capacity from DHA, as seen in the present results, is in agreement with these theoretical considerations.

The flux through pyruvate kinase in PP-H and PV-H, at least when gluconeogenesis from lactate + pyruvate mixture occurs, does not appear to be significantly different (12) in PP-H or PV-H. Since this flux can be estimated in isolated hepatocytes by measuring the production of lactate and pyruvate from DHA (2), one can find that the present results corroborates that previous study. On the other hand, exercise has been shown to lower hepatic ATP levels (7,9) and this could hypothetically stimulate the flux through pyruvate kinase and, therefore, produce higher levels of lactate + pyruvate in exercised groups. Clearly, this contention is not supported by the present results since the levels of lactate + pyruvate were not affect by the exercise stimulus. Since the hepatocytes were exposed to high levels of glucagon during the exercise period (9), and that the effects of glucagon result in an inhibition of the pyruvate kinase flux (11), there is a possibility that both antagonistic effects (low level of ATP and high level of glucagon that stimulates and inhibits respectively flux through pyruvate kinase) have counteracted each other.

In summary, results from the present experiment indicate that the glucose production in the fasted state (considered to be representative of the gluconeogenic capacity) from

DHA is not different between PP-H and PV-H in the rest and in the exercise conditions and that the lactate + pyruvate production (considered to be representative of the glycolytic capacity) from DHA or from glucose, is also not significantly different between the two cell types, regardless of the diet or activity conditions. Thus, despite different enzyme levels between PP-H and PV-H, DHA metabolism is equivalent in both cell types.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and Fonds pour la formation des chercheurs et l'aide de la recherche (Gouvernement of Québec).

BIBLIOGRAPHY

1. **Argaud, D., H. Roth, N. Wiernsperger, and X. M. Lerverve.** Metformin decreases gluconeogenesis by enhancing the pyruvate kinase flux in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 213: 1341-1348, 1993.

2. **Azzout, B. and J. Peret.** Development of gluconeogenesis from dihydroxyacetone in rat hepatocytes during a feeding cycle and starvation. *Biochem. J.* 218: 975-981, 1984.

3. **Bartels, H., H. Herbort, and K. Jungermann.** Predominant periportal expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase and tyrosine aminotransferase genes in rat liver. *Histochem.* 95: 637-644, 1990.

4. **Bergmayer, H. U.** *Methods for Enzymatic Analysis.* New York: Academic, 1974,

5. **Berry, M. N., A. M. Edwards, and G. J. Barrit.** *Isolated hepatocytes preparation, properties and applications.* Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1991,

6. **Chen, K. S. and J. Katz.** Zonation of glycogen and glucose syntheses, but not glycolysis, in rat liver. *Biochem. J.* 255: 99-104, 1988.

7. **Dohm, G. L. and E. A. Newsholme.** Metabolic control of hepatic gluconeogenesis during exercise. *Biochem. J.* 212: 633-639, 1983.
8. **Gascon-Barre, M., N. Benbrahim, and C. Tremblay.** Hepatic zonation of drug metabolizing enzymes. Studies on hepatocytes isolated from the periportal of perivenous region of the liver acinus. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67: 1015-1022, 1989.
9. **Ghanbari-Niaki, A., F. Désy, and J.-M. Lavoie.** Effects of phosphate injection on metabolic and hormonal responses to exercise in fructose-injected rats. *Physiol. Behav.* 67: 747-752, 1999.
10. **Ghosh, A. K., D. Finegold, W. White, K. Zawulich, and F. M. Matschinsky.** Quantitative histochemical resolution of the oxydation-reduction and phosphate potentials within the simple hepatic acinus. *J. Biol. Chem.* 257: 5476-5481, 1982.
11. **Haynes Jr, R. C. and R. A. Picking.** The role of the inhibition of pyruvate kinase in the stimulation of gluconeogenesis by glucagon: A reevaluation. *Arch. of biochem. and biophys.* 283: 51-59, 1990.
12. **Jones, C. G. and M. A. Thiteradge.** Measurment of metabolic fluxes through pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, pyruvate deshydrogenase, pyruvate carboxylase in hepatocytes of different acinar origin. *Arch. of biochem. and biophys.* 326: 202-206, 1996.

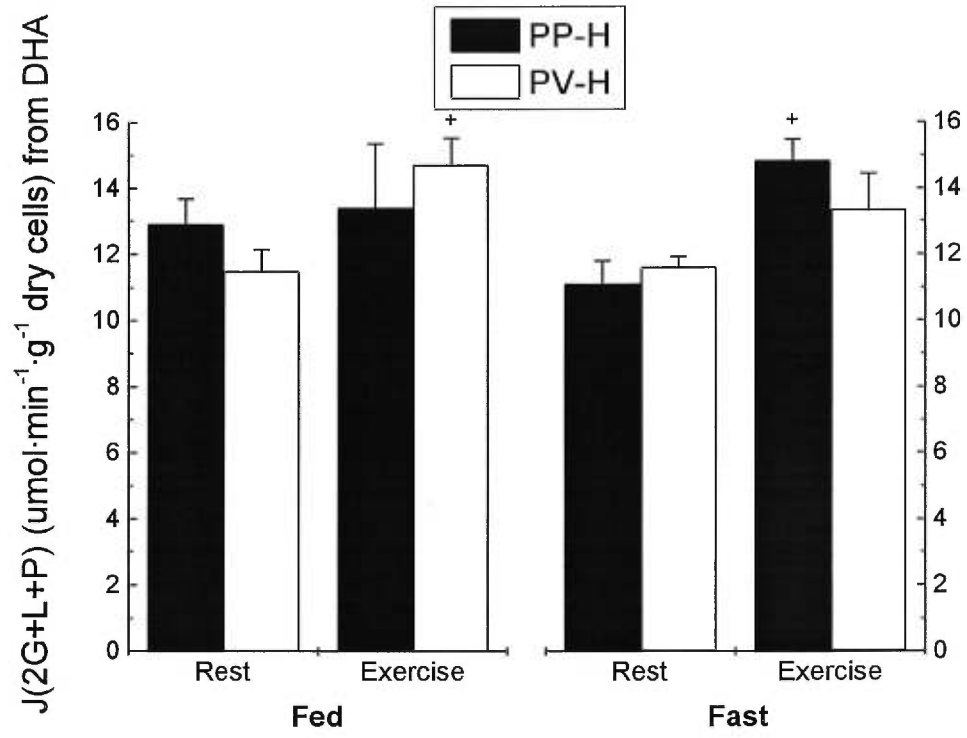
13. **Jungermann, K. and N. Katz.** Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiological reviews* 69: 708-764, 1989.
14. **Lindros, K. O. and K. E. Pentilla.** Digitonin-collagenase perfusion for efficient separation of periportal or perivenous hepatocytes. *Biochem. J.* 228: 757-760, 1985.
15. **Matsumura, T. and R. G. Thurman.** Predominance of glycolysis in pericentral regions of the liver lobule. *Eur. J. Biochem.* 140: 229-234, 1984.
16. **Pison, C. M., C. Chauvin, E. Fontaine, F. Catelloni, C. Keriél, B. Paramelle, and X. M. Leverve.** Mechanism of gluconeogenesis inhibition in rat hepatocytes isolated after in vivo hypoxia. *Am. J. Physiol.* 268: E965-E973, 1995.
17. **Quistorff, B.** Gluconeogenesis in periportal and perivenous hepatocytes of rat liver, isolated by a new high-yield digitonin/collagenase perfusion technique. *Biochem. J.* 229: 221-226, 1985.

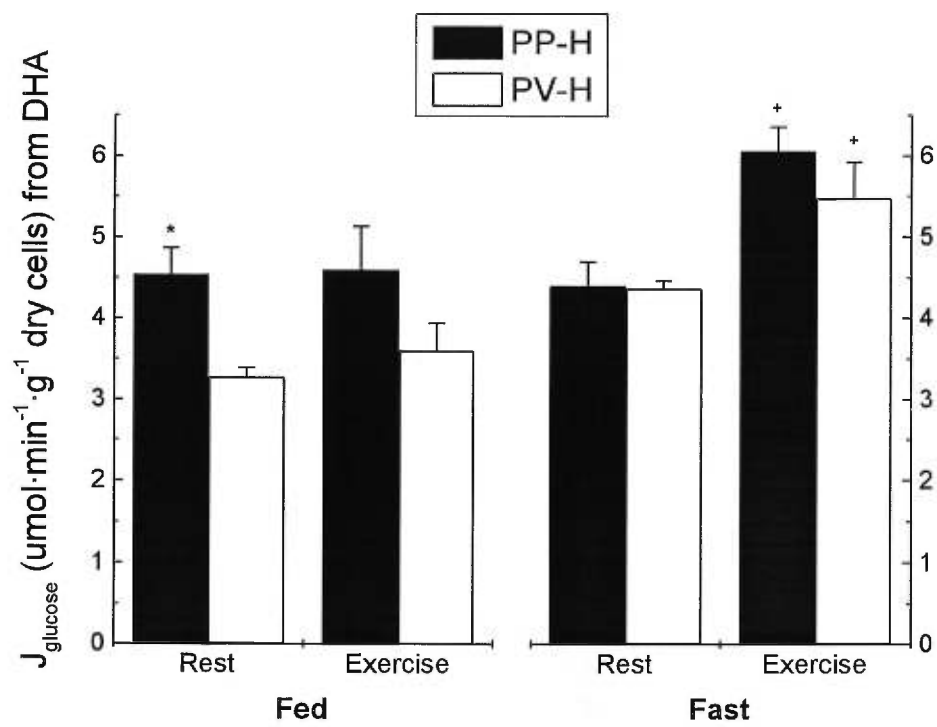
LEGENDS

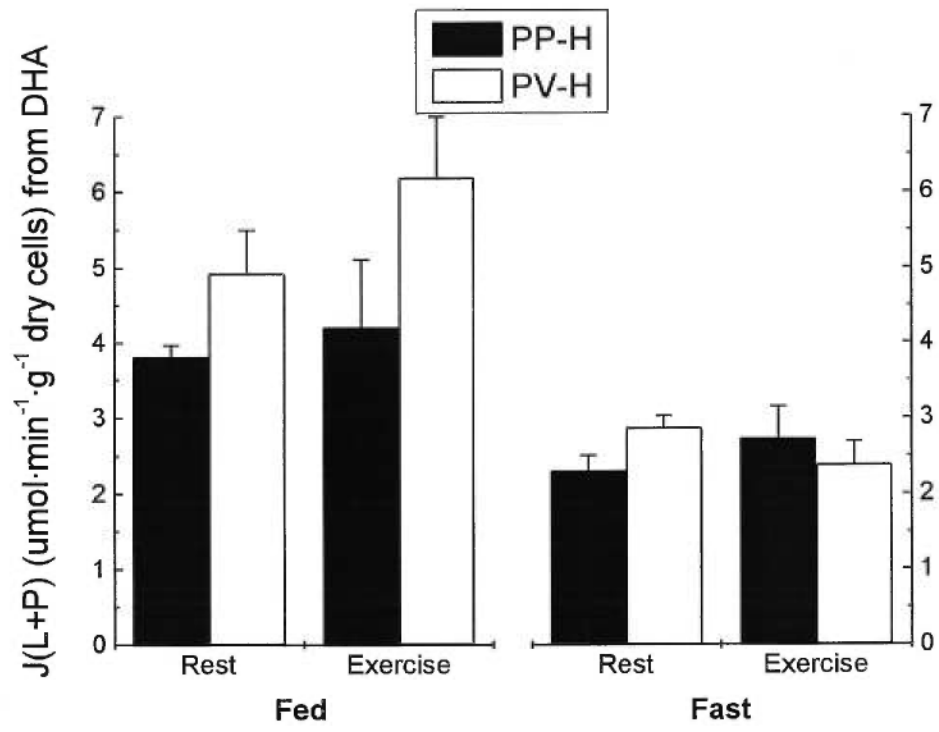
- Fig. 1. Total metabolism of DHA, J_{2G+L+P} , computed by adding 2 times the glucose flux, J_G , to the lactate + pyruvate flux, J_{L+P} , of PP-H and PV-H in the presence of DHA (20 mM). Results are means \pm SE for $n = 9$ in each group. + significantly different ($P < 0.05$) from the corresponding rest group of identical type of hepatocyte preparation.
- Fig. 2. Glucose flux, J_G , computed from linear accumulation of glucose over the incubation period of PP-H and PV-H in the presence of DHA (20 mM). Results are means \pm SE for $n = 9$ in each group. + significantly different ($P < 0.05$) from the corresponding rest group of identical type of hepatocyte preparation. * significantly different ($P < 0.05$) between PP-H and PV-H of the same nutritional and activity status.
- Fig. 3. Lactate + pyruvate flux, J_{L+P} , computed from linear accumulation of lactate + pyruvate over the incubation period of PP-H and PV-H in the presence of DHA (20 mM). Results are means \pm SE for $n = 9$ in each group.
- Fig. 4. Lactate + pyruvate flux, J_{L+P} , computed from linear accumulation of lactate + pyruvate over the incubation period of PP-H and PV-H in the presence of glucose (40 mM). Results are means \pm SE for $n = 9$ in each group.

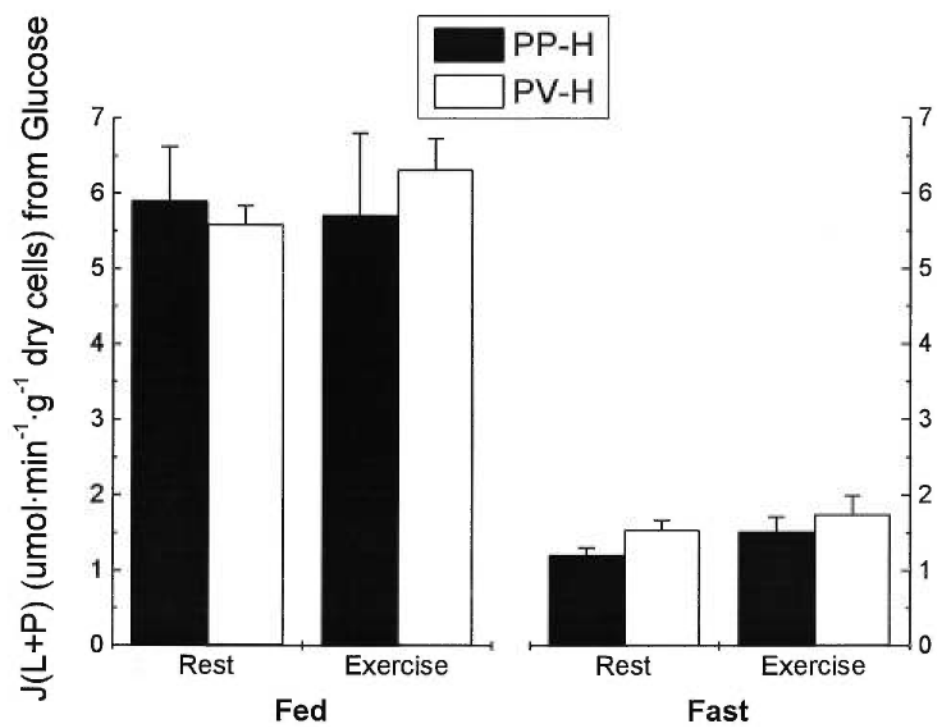
Table 1. Activity of glutamine synthase in isolated hepatocytes. Values ($\mu\text{mol}^{-1} \cdot 100 \text{ mg}^{-1}$) are the means \pm SEM.

Conditions	PP-H	PV-H	PP-H/PV-H
Fed Rest	114 \pm 14	1086 \pm 58	0.11
Fed Exercise	28 \pm 10	1126 \pm 54	0.02
Fast Rest	45 \pm 12	723 \pm 2	0.06
Fast Exercise	46 \pm 9	655 \pm 87	0.07










2.3 Mechanisms of the differentiation of exercise-induced gluconeogenesis from alanine in isolated periportal and perivenous hepatocytes

**MECHANISMS OF THE DIFFERENTIATION OF EXERCISE-INDUCED
GLUCONEOGENESIS FROM ALANINE IN ISOLATED PERIportal AND
PERIVENOUS HEPATOCYTES**

François Déry, Yan Burelle, Patrice Bélanger, Karine Couturier,
and Jean-Marc Lavoie.

Département de Kinésiologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Running title : Hepatic metabolic zonation and exercise

Address for correspondence: Dr. Jean-Marc Lavoie
Département de Kinésiologie
Université de Montréal
C.P. 6128, Succ. Centre-Ville
Montréal, (Québec), Canada H3C 3J7
Tel : (514) 343-7044
Fax : (514) 343-2181
e-mail : 

ABSTRACT

It is well established that in basal conditions, gluconeogenic capacity is higher in periportal hepatocytes (PP-H) than in perivenous hepatocytes (PV-H). However, it has been shown recently that physical activity could induce a loss of the predominant PP-H zonation of gluconeogenesis as evaluated by the respective glucose production capacities of PP-H and PV-H isolated from overnight fasted exercised rats incubated with saturating concentrations of alanine. The purpose of the present study was to investigate the mechanisms that differentiate the effects of exercise on the gluconeogenic capacity from alanine in PP-H and PV-H. S-D male rats were submitted to an overnight fast (18 h) and to a 60 min treadmill exercise bout or rest. Metabolic zonation was evaluated on isolated PP-H or PV-H obtained by selective destruction after liver perfusion with digitonin and collagenase and subsequently incubated (30 min at 37°C saturated with 95% O₂ : 5% CO₂) with increasing concentrations (0.6 up to 9.6 mM) of alanine. Results showed that glucose production in PP-H was higher than in PV-H, that exercise led to higher glucose production in both PP-H and PV-H, and that the difference between the glucose production of PP-H and PV-H seen at rest is much less after exercise but still significant for alanine concentration < 4.8 mM. Despite that PP-H show a theoretical greater capacity for gluconeogenesis from the fact gluconeogenic enzyme maximal activity and malate-aspartate shuttle capacity are predominant in the PP-H, it is demonstrated that the different glucose productions observed arise from steps upstream of pyruvate generation in the gluconeogenic pathway from alanine.

Keywords: hepatic zonation, glucose flux, liver.

INTRODUCTION

Since the proposal of the hepatic metabolic zonation concept (20), numerous studies have enlightened the fact that periportal and perivenous hepatocytes (PP-H and PV-H), possess different amounts and activities of enzyme, show different morphometric, histochemical, and biochemical characteristics and, thus, have different metabolic capacities (for review (8,10,12-14)). Regarding carbohydrate metabolism, it appears that PP-H possess higher levels of gluconeogenic enzymes and PV-H higher levels of glycolytic enzymes (14). Thus, periportal cells display a greater capacity for gluconeogenesis and perivenous cells for glycolysis. Indeed, glucose production fluxes of isolated hepatocytes incubated in the presence of gluconeogenic substrates are two-fold higher in PP-H compared to PV-H (4,11,18). The zonation of liver carbohydrate metabolism is dynamic and adapts when the glucostatic function of the liver changes in order to cope with the metabolic demands imposed by some particular physiologic situations such as starvation (>24 hrs) (29,31) or cold adaptation (21,23). Over the years, a fair amount of work has been devoted by numerous researchers to the comprehension of the exercise induced liver glucose production (glycogenolysis and gluconeogenesis) (for reviews: (27,30)) and on the specific intrahepatic mechanisms regulating gluconeogenesis from alanine during and after exercise (28). Until recently (5), the hepatic zonation has never been considered on the study of the exercise induced gluconeogenesis. In this regard, we have shown that physical activity could induce a loss of the predominant PP-H zonation of gluconeogenesis seen at rest as evaluated by the respective glucose production capacities of PP-H and PV-H isolated from overnight fasted exercised rats incubated with saturating concentrations of gluconeogenic precursors such as alanine or lactate + pyruvate (5).

The purposes of the present study were therefore threefold: 1) to determine the mechanisms responsible for the higher glucose production capacity from alanine of PP-H compared to PV-H at rest; 2) to determine the mechanisms responsible for the exercise induced glucose production capacity from alanine in both cell populations, and 3) to determine which mechanism explains that the difference of the glucose production from saturating concentrations of alanine of PP-H and PV-H exists at rest but not after exercise.

METHODOLOGY

Animal care. All experiments described in this report were conducted according to the directives of the Canadian Council on Animal Care. Male Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, Québec) weighing 280-300 g were housed in pairs and allowed pellet rat chow and tap water ad libitum for 10 to 14 days. Lights were on from 0700 until 1900, and the room temperature was maintained at 20-23 °C. Two days after their arrival, all rats were submitted once a day to a 5 day habituation running protocol on a motor-driven rodent treadmill starting at 15 m/min (0% grade) for 15 min on the first day and progressively increased to 26 m/min for 50 min (0% grade) on the fifth day.

Groups and exercise protocol. Food was removed from cages of fasted rats before 1700 the day before experimentation (\approx 18 h). Since the pool of glycogen in the fasted state can be considered as negligible, all of the glucose production was assumed to be the result of gluconeogenesis (23). On the day of the experiment, rats were divided into a rest and an exercise group. The experiments were run between 0930 and 1100. The exercise test consisted of running on the treadmill for 60 min at 26 m/min (0% grade). At the end of the running or resting period, all rats were rapidly anesthetized with pentobarbital sodium (40 mg/kg ip). PP-H and PV-H were obtained from different rats in each condition.

Isolation of hepatocytes. Selective isolation of PP-H and PV-H was made according to the technique described by Gascon-Barré et al. (7) with minor modifications. Briefly, the portal vein and the superior vena cava were cannulated with blunted needles (16 G) for selective anterograde and retrograde perfusion and

digitonin injection. Both needles were positioned to rest at approximately 1 cm to the liver. The liver was perfused in open circuit in the anterograde direction at 37°C, pH 7.4 with saturated (95% O₂, 5% CO₂) perfusion medium at a rate of 25 ml/min for 5 min using a peristaltic pump (Cole Parmer Instrument Co). The perfusion medium consisted of 118.9 mM NaCl, 4.76 mM KCl, 1.19 mM KH₂PO₄, 1.19 mM MgSO₄ (7H₂O), and 25 mM NaHCO₃. For selective destruction of PP-H or PV-H, digitonin (Boehringer Mannheim) 7 mM dissolved in a buffer containing 137 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.1 mM CaCl₂, 0.65 mM MgSO₄, and 10 mM Hepes at 90 °C was infused at 37 °C in the portal vein in the anterograde direction (PP-H destruction) or in the caval catheter in the retrograde direction (PV-H destruction) at a rate of 10 ml/min using a microinfusion pump (Harvard Apparatus Inc. mod. 55-111). The infusion was maintained until the characteristic discolouration pattern was observed (15). In most of the preparations, this was achieved in less than 30s, the procedure being commonly longer for PV-H destruction. After that, the liver was perfused in open circuit in the opposite direction of the one used for the digitonin infusion with the perfusion medium for 5 min at a rate of 40 ml/min. Following this, collagenase (Worthington Biochemical, CLS-2, 274 u/mg) 0.35 g% in perfusion medium supplemented with 2.4 mM CaCl₂, was infused at a rate of 12 ml/min for 7-8 min to achieve liver digestion. Digestion was considered complete when gentle finger pressure on a liver lobe resulted in fracture of the liver surface (2). The liver was, thereafter, excised and transferred in a petri dish where it was gently disrupted with forceps. The cell solution was filtered through a nylon mesh and centrifuged twice at (2 min, 50 x g), and the supernatant discarded. Cells were resuspended in a final volume of approximately 15 ml in ice cold perfusion medium supplemented with 2.4 mM CaCl₂ in a Falcon tube.

The upper part of the tube was gassed 1 min with 95% O₂, 5% CO₂ and left on ice for 1h before incubation.

Hepatocytes incubations. Hepatocytes were incubated at 16 mg/ml dry weight estimated from the weight of the wet packed cells (dry weight = wet weight/3.8; ref. (2)) in closed vials saturated with 95% O₂, 5% CO₂ in a final volume of 2.8 ml (118.9 mM NaCl, 4.76 mM KCl, 1.19 mM KH₂PO₄, 1.19 mM MgSO₄ (7H₂O), 25 mM NaHCO₃, 2.4 mM CaCl₂, 2% bovine serum albumin (Boehringer Mannheim) combined with oleate 2 mM (Sigma), pH 7.4, 37 °C). The dry weight of each hepatocyte preparation was subsequently determined by letting a precise amount (500 µL) of the non incubated hepatocyte solution to dry out for two days in a warm dry area. The dry weight values of each hepatocyte preparation were subsequently used in the calculations. Cells were left for an equilibration period of 20 min in the shaking (2 Hz) thermostated (37 °C) waterbath . At t = 0, either no substrate, or 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 or 9.6 mM final concentration alanine (Boehringer Mannheim) was added. Cells were incubated for 30 min and sampling (A and B) were made at t = 0 and t = 30 min. Pilot study showed that the glucose production was linear up to 30 min even for the lowest alanine concentration. For sampling A, 1000 µl of cell suspension was combined with 1000 µl of incubation medium without BSA-oleate and centrifuged (15 s, 16 000 x g). The supernatant was then deproteinized with HClO₄ (final concentration 5% vol/vol) and vortexing. After centrifugation (5 min, 16 000 x g), the new supernatant was removed and neutralised with KOH and (2N)-3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (0.3 M) for subsequent glucose and pyruvate analyses. The pellet was deproteinized with a mixture of HClO₄ 10 % and EDTA 25 nM. After centrifugation (5 min, 16 000 x g), the supernatant was removed and neutralised with KOH and (2N)-3-(N-

morpholino)propanesulfonic acid (0.3 M) for subsequent intracellular alanine analyse. For sampling B, 300 ul of cell suspension was combined with 800 ul of 0.1 mM digitonin (Boehringer Mannheim) dissolved in 0.25 M sucrose, 3 mM EDTA and 20 mM (2N)-3-(N-morpholino)propanesulfonic acid for 15 s and then centrifuged (15 s, 16 000 x g). The supernatant was then deproteinized with HClO₄ (final concentration 5% vol/vol) and vortexing. After centrifugation (5 min, 16 000 x g), the new supernatant was removed and neutralised with KOH and (2N)-3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (0.3 M) for subsequent cytosolic phosphoenolpyruvate analyse. Glucose was determined spectrophotometrically, whereas alanine, pyruvate, and phosphoenolpyruvate were determined fluorimetrically (1).

Quality control of PP-H and PV-H enriched preparations. The trypan blue exclusion test was run on each individual sample to obtain a rapid glance concerning the quality of the hepatocyte preparation and to avoid the use of an unacceptable hepatocyte preparation. Since in the present experiment glucose production from alanine was measured, we used this glucose production in the basal state (rest) as our ultimate criteria of cell viability by comparing our results of glucose fluxes to those reported in similar conditions. Similarly, we used the gluconeogenic fluxes in the basal state (rest) to verify the adequacy of our PP-H and PV-H enrichment preparations. It is well known that glucose production of PP-H from gluconeogenic precursors such as alanine are approximately two-fold higher than in PV-H (4,21). Gluconeogenic fluxes can therefore be considered a good indicator of the functionality (i.e. viability) of the cell preparation and also the enrichment in PP-H and PV-H cell preparations.

Glutamine synthetase activity was determined in PP-H and PV-H in resting and exercising animals to ensure the adequacy of the cell enriched preparations (17).

Statistical analyses were performed by an analysis of variance for non-repeated-measures or Student's t-test for unpaired samples. Statistical significance was achieved at $P < 0.05$.

RESULTS

Marker enzyme activity. Table I shows the distribution of the marker enzyme glutamine synthetase. The enzyme maximal activity is very low in PP-H compared to PV-H, indicating that satisfactory enriched cell preparations were produced.

Glucose fluxes. Fig. 1 shows the relationship between the gluconeogenic flux (J_{glucose}), and the concentration of alanine present in the incubation medium of PP-H, and PV-H isolated from rested (left), and exercised rats (right). The endogenous rate of glucose production at alanine concentration = 0 was low, and similar in PP-H and PV-H isolated from resting or exercised rats. In all experimental conditions, J_{glucose} progressively increased, and reached a plateau as alanine concentration was increased. In the resting state, J_{glucose} was higher ($P < 0.05$) in PP-H than in PV-H at all alanine concentrations of tested. The average value of the PP-H/PV-H ratio of glucose flux obtained for the various concentration of alanine was 1.63 ± 0.13 (pooled data $n = 6$). Acute exercise significantly increased ($P < 0.005$) the gluconeogenic flux in both PP-H and PV-H for saturating, and sub-saturating alanine concentrations. However, the magnitude of the exercise-induced increase in J_{glucose} was greater in PV-H than in PP-H, particularly for alanine concentrations above 2.4 mM. As a consequence, the average PP-H/PV-H ratio of glucose flux observed over the entire range of alanine concentration decreased of 22 % to reach 1.27 ± 0.03 (pooled data $n = 6$).

Relationships between intermediates and glucose production flux and among intermediates Plotting substrates against products over a wide range of values can

provide some information concerning which step in the metabolic pathway is responsible for the differences seen between the levels of the variable considered.

Fig. 2 shows the relationship between intracellular alanine concentration, and that of alanine in the incubation medium. The relation is linear over the entire range of alanine concentrations indicating that alanine transport is not limiting at high alanine concentrations, and no differences were observed between PP-H and PV-H either at rest and after acute exercise (excepted at 9.6 mM alanine concentration after acute exercise).

Fig. 3 shows the intracellular alanine concentrations plotted against the J_{glucose} . At rest, there is a clear double relationship (intracellular alanine concentrations vs J_{glucose}) between PP-H and PV-H. This indicates that at a given intracellular alanine concentration, different J_{glucose} are obtained depending on which cell population is considered. This suggest that a difference exist between PP-H and PV-H at a step of the metabolic pathway linking intracellular alanine to glucose production in the rest condition. In post exercise condition, a single relationship (intracellular alanine concentrations vs J_{glucose}) between PP-H and PV-H is observed which means that at a given intracellular alanine concentration, the same J_{glucose} is obtained regardless of the cell population considered. Besides transport, the other factor that controls gluconeogenesis from alanine is the transamination of alanine into pyruvate (3). Plotting the intracellular alanine concentrations vs pyruvate concentrations of PP-H and PV-H, as in fig. 4, permits to evaluate the transamination activity in PP-H and PV-H since the two variables are respectively the substrate and the product of the alanine transaminase. At rest, there is a double relationship (intracellular alanine concentrations vs pyruvate concentration) suggesting a higher transaminase activity in

PP-H. In the post exercise condition, a single relationship (intracellular alanine concentrations vs pyruvate concentration) between PP-H and PV-H is observed. This indicates that the difference seen between intracellular alanine concentrations and pyruvate concentrations of PP-H and PV-H at rest is not longer observed in the post exercise condition. This goes along with the conclusion drawn from Fig. 3 i.e. that no difference exist between PP-H and PV-H in the metabolic pathway linking intracellular alanine to glucose production in the post exercise condition.

At this point, the strategy is to pursue plotting intermediates concentrations downstream in the metabolic pathway against the glucose production flux until a single relationship is obtained in the rest situation. This is the case in Fig. 6 where the pyruvate concentrations are plotted against J_{glucose} . A single relationship (pyruvate concentrations vs J_{glucose}) between PP-H and PV-H is obtained. This indicates that the metabolic step(s) of the gluconeogenic pathway responsible for the differences in the J_{glucose} recorded between PP-H and PV-H are located upstream the generation of pyruvate in both rest and post exercise condition. Accordingly, when an intermediate located downstream of pyruvate in the gluconeogenic pathway (such as phosphoenolpyruvate in the present case) is plotted against J_{glucose} (fig. 7), a single relationship (phosphoenolpyruvate concentrations vs J_{glucose}) between PP-H and PV-H is again obtained in both rest and post exercise condition.

DISCUSSION

Results from the present experiment with alanine as gluconeogenic precursor confirm our previous findings (5). Indeed, in the presence of a saturating alanine concentration (9.6 mM), acute exercise significantly increased the gluconeogenic flux in both PP-H, and PV-H compared to rest. Acute exercise also nearly abolished the large difference in J_{glucose} observed between both hepatocyte populations at rest (PP-H / PV-H for J_{glucose} at 9.6 mM alanine = 1.57 at rest vs 1.14 after acute exercise). In addition, the present results show that these effects of acute exercise are also observed for sub-saturating alanine concentration as low as 0.6 mM, which is within the physiological range of alanine concentration at rest and during exercise (26).

Data obtained in isolated perfused liver, or with mixed hepatocytes preparations, indicate that gluconeogenesis from alanine is mainly controlled upstream of pyruvate, by its transport into the hepatocyte for low extracellular concentrations: below 1 mM (3,6,24) and by its transamination into pyruvate for higher concentrations (3,16). Therefore, any differences in steps other than those, between hepatocyte populations, or between rest, and exercise, will probably have a negligible effect on the glucose flux from alanine. Results from the present experiment are in line with these results, and suggest that at high alanine concentration, J_{glucose} is controlled by the same step in PP-H and PV-H, both at rest, and after exercise. In addition, in that range of alanine concentrations, differences or changes in the transamination flux seem to be

responsible for the zonation of J_{glucose} at rest, and for the stimulation, and loss of zonation of J_{glucose} induced by exercise.

The strong control exerted by the transamination step is indicated by the fact that in all experimental conditions, intracellular alanine concentration increased linearly over the entire range of extracellular alanine concentration (Fig. 2). In contrast, a clear saturation kinetics was observed in the plots relating J_{glucose} , and intracellular alanine concentration (Fig. 3), and the concentrations of pyruvate and intracellular alanine (Fig. 4). On those two plots, in the resting state, the markedly different relationships indicate that the zonation of J_{glucose} between PP-H, and PV-H is due to differences in the transamination flux of alanine into pyruvate. In the exercised state, the fact that those relationship plateaued at a higher level compared to the resting state indicate that an increase in the transamination flux was responsible for the increased J_{glucose} in both PP-H and PV-H. In addition, the fact that the double relationships observed at rest were no longer present after acute exercise suggest that a proportionally greater increase in the transamination flux in PV-H is responsible for the loss of the porto-venous zonation of J_{glucose} .

For a long time, phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) has been recognized as the key enzyme of gluconeogenesis. This was based on the view that control over a pathway flux is exerted by a rate limiting step i.e. enzyme catalysing a non-equilibrium reaction which maximal activity is low compared to the activity of the other enzymes in the pathway. As recently reviewed (25), it is well established now that control over a pathway flux can be potentially distributed over some, if not all, steps in the

pathway. Regarding alanine metabolism, control is achieved by its transport into the hepatocytes and transamination into pyruvate (6,24) and it has been shown that the effect of training on glucose production capacity from alanine was the result of increased alanine transport and transamination at low and high alanine concentrations respectively (3). Accordingly, the present results suggest that these two steps are responsible for the difference in J_{glucose} between PP-H and PV-H or between rest and exercise. This is of major importance in the light of the metabolic zonation concept because it indicates that despite a marked periportal predominance of some gluconeogenic enzyme maximal activity i.e. PEPCK, fructose 1,6-biphosphatase and glucose 6 phosphatase (12) and malate-aspartate shuttle capacity (22) this does not contribute to a different glucose production flux. This is indicated by the fact that the relationships between intracellular pyruvate, and cytosolic PEP on one hand, and J_{glucose} on the other hand, were similar in PP-H, and PV-H isolated from resting, and exercised rats (Fig. 5 and 6). Those single relationships indicate that for a given concentration of pyruvate, and PEP, the glucose flux was similar in PP-H, and PV-H. In all experimental conditions, a single relationship was also observed between the concentration of PEP, and that of pyruvate, (fig. 7) which are respectively the product and the substrate for the combined pyruvate carboxylase (PC) + PEPCK steps. This observation further rules out the possible involvement of PEPCK, and other enzymes of the PEP-pyruvate cycle. Taken together, those results thus suggest that the difference in glucose flux from alanine between PP-H, and PV-H at rest, is caused by an increased supply of pyruvate, rather than to differences in the enzymatic properties of steps located downstream of pyruvate. Similarly, the stimulation of gluconeogenesis as well as attenuation of the porto-venous zonation of J_{glucose} from alanine induced by

exercise, also seems to be caused by an increased supply of pyruvate, rather than to activation of steps located downstream of pyruvate. However one has to note that this conclusion is restricted to the gluconeogenic activity from alanine only since control over the gluconeogenic pathway from lactate + pyruvate has been proved to be strongly exerted by the phosphoenolpyruvate-pyruvate cycle (9,19). Thus, acute exercise induced glucose production from lactate + pyruvate could involved adaptations at the level of the phosphoenolpyruvate-pyruvate cycle.

In conclusion, results from the present experiment confirm our previous finding that acute exercise increases the glucose flux from alanine in PP-H and PV-H and results in a loss of zonation of gluconeogenesis from this precursor. Presumably, in addition to stimulating gluconeogenesis in PP-H, increasing the gluconeogenic capacity of PV-H represents a efficient mean for meeting the increased glucose demand during exercise. Despite that PP-H show a theoretical greater capacity for gluconeogenesis from the fact gluconeogenic enzymes maximal activity and malate-aspartate shuttle capacity are predominant in the PP-H, this does not explain the different glucose production capacities observed between PP-H and PV-H. Rather, what was seen seems to be entirely due to alteration in the first two steps in the gluconeogenic pathway from alanine, namely its transport into the hepatocyte for low extracellular concentration, and its transamination into pyruvate for high concentrations.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and Fonds pour la formation des chercheurs et l'aide de la recherche (Gouvernement of Québec).

BIBLIOGRAPHY

1. **Bergmayer, H. U.** *Methods for Enzymatic Analysis*. New York: Academic, 1974,
2. **Berry, M. N., A. M. Edwards, and G. J. Barrit.** *Isolated hepatocytes preparation, properties and applications*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1991,
3. **Burelle, Y., C. Fillipi, F. Péronnet, and X. Leverve.** Mechanisms of increased gluconeogenesis from alanine in rat isolated hepatocytes after endurance training. *Am. J. Physiol.* 278: E35-E42, 2000.
4. **Chen, K. S. and J. Katz.** Zonation of glycogen and glucose syntheses, but not glycolysis, in rat liver. *Biochem. J.* 255: 99-104, 1988.
5. **Désy, F., Y. Burelle, P. Bélanger, M. Gascon-Barre, and J. Lavoie.** Effect of acute exercise on the gluconeogenic capacity of periportal and perivenous hepatocytes. *Submitted for publication*.
6. **Fafournoux, P., C. Remesy, and C. Demigne.** Control of alanine metabolism in rat liver by transport processes or cellular metabolism. *Biochem. J.* 210: 645-652, 1983.

7. **Gascon-Barre, M., N. Benbrahim, and C. Tremblay.** Hepatic zonation of drug metabolizing enzymes. Studies on hepatocytes isolated from the periportal of perivenous region of the liver acinus. *Can. J. Physio. Pharmacol.* 67: 1015-1022, 1989.
8. **Gebhardt, R.** Metabolic zonation of the liver regulation and implications for liver function. *Pharmac. Ther.* 53: 275-354, 1992.
9. **Groen, A. K., C. W. T. van Roermund, R. C. Vervoorn, and J. M. Tager.** Control of gluconeogenesis in rat liver cells. *Biochem. J.* 237: 379-389, 1986.
10. **Gumucio, J. J.** Hepatocyte heterogeneity: the coming of age from the description of a biological curiosity to a partial understanding of its physiological meaning and regulation. *Hepatology* 9: 154-160, 1989.
11. **Jones, C. G. and M. A. Thiteradge.** Measurement of metabolic fluxes through pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, pyruvate deshydrogenase, pyruvate carboxylase in hepatocytes of different acinar origin. *Arch. of biochem. and biophys.* 326: 202-206, 1996.
12. **Jungermann, K. and N. Katz.** Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiological reviews* 69: 708-764, 1989.

13. **Jungermann, K. and T. Kietzmann.** Zonation of perenchymal and nonparenchymal metabolism in the liver. *Annu. Rev. Nutr.* 16: 179-203, 1996.
14. **Jungermann, K. and R. G. Thurman.** Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of carbohydrates. *Enzyme* 46: 33-58, 1992.
15. **Lindros, K. O. and K. E. Pentilla.** Digitonin-collagenase perfusion for efficient separation of periportal or perivenous hepatocytes. *Biochem. J.* 228: 757-760, 1985.
16. **Malette, L. E., J. H. Exton, and C. R. Park.** Effects of glucagon on amino acid transport and utilization in the perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* 244: 5724-5728, 1969.
17. **Meister, A.** Glutamine synthetase from mammalian tissues. *Methods Enzymol.* 113: 185-199, 1985.
18. **Quistorff, B.** Gluconeogenesis in periportal and perivenous hepatocytes of rat liver, isolated by a new high-yield digitonin/collagenase perfusion technique. *Biochem. J.* 229: 221-226, 1985.
19. **Rigoulet, M., X. Leverve, P. J. A. Plomb, and A. J. Meijer.** Stimulation by glucose of gluconeogenesis in hepatocytes isolated from starved rats. *Biochem. J.* 245: 661-668, 1987.

20. **Sasse, D., N. Katz, and K. Jungermann.** Functional heterogeneity of rat liver parenchyma and of isolated hepatocytes. *FEBS* 57: 83-88, 1975.

21. **Shiota, M., Y. Fujimoto, M. Inagami, M. Hiramatsu, M. Moriyama, K. Kimura, M. Ohta, and T. Sugano.** Adaptive changes in zonation for gluconeogenic capacity in liver lobules of cold-exposed rats. *Am. J. Physiol.* 265: E559-E564, 1993.

22. **Shiota, M., M. Hiramatsu, Y. Fujimoto, M. Moriyama, K. Kimura, M. Ohta, and T. Sugano.** The capacity of the malate-aspartate shuttle differs between periportal and perivenous hepatocytes from rats. *Arch. of biochem. and biophys.* 308: 349-356, 1994.

23. **Shiota, M., M. Inagami, Y. Fujimoto, M. Moriyama, K. Kimura, and T. Sugano.** Cold acclimatation induces zonal heterogeneity in gluconeogenic responses to glucagon in rat liver lobule. *Am. J. Physiol.* 268: E1184-E1191, 1995.

24. **Sips, H. J., A. K. Groen, and J. M. Tager.** Plasma-membrane transport of alanine is rate-limiting for its metabolism in rat-liver parenchymal cells. *FEBS* 119: 271-274, 1980.

25. **Thomas, S. and D. A. Fell.** The role of multiple enzyme activation in metabolic flux control. *Adv. Enzyme Regul.* 38: 65-85, 1998.

26. **Viru, A., L. Litvinoda, M. Viru, and T. Smirnova.** Glucocorticoids in metabolic control during exercise: alanine metabolism. *J. Appl. Physiol.* 76: 801-805, 1994.
27. **Wasserman, D. H.** Regulation of glucose fluxes during exercise in the postabsorptive state. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 191-218, 1995.
28. **Wasserman, D. H., P. E. Williams, D. Brooks Lacy, D. R. Green, and A. D. Cherrington.** Importance of intrahepatic mechanisms to gluconeogenesis from alanine during exercise and recovery. *Am. J. Physiol.* 254: E518-E525, 1988.
29. **Wimmer, M.** effects of starvation and refeeding a high carbohydrate diet on the intra-acinar distribution pattern of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in the liver of male and female rats. *Histochem.* 92: 331-336, 1989.
30. **Winder, W. W.** Regulation of hepatic glucose production during exercise. *Exer. Sports Sci. Rev.* 13: 1-31, 1985.
31. **Zierz, S., N. Katz, and K. Jungermann.** Distribution of pyruvate kinase L and M2 in microdissected periportal and perivenous rat liver tissue with different dietary states. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem* 364: 1447-1453, 1983.

LEGENDS

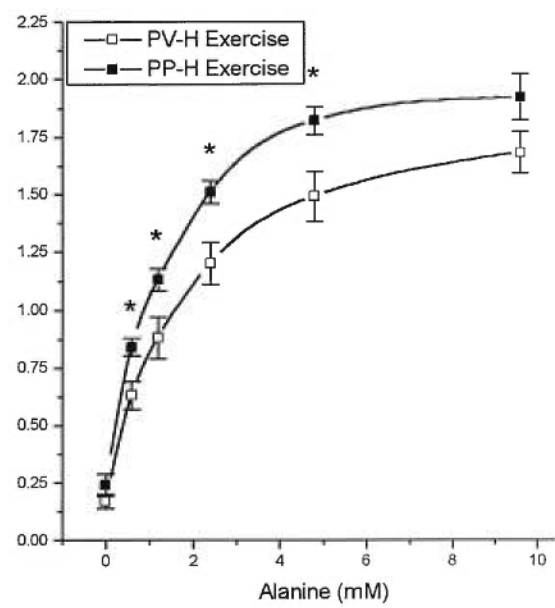
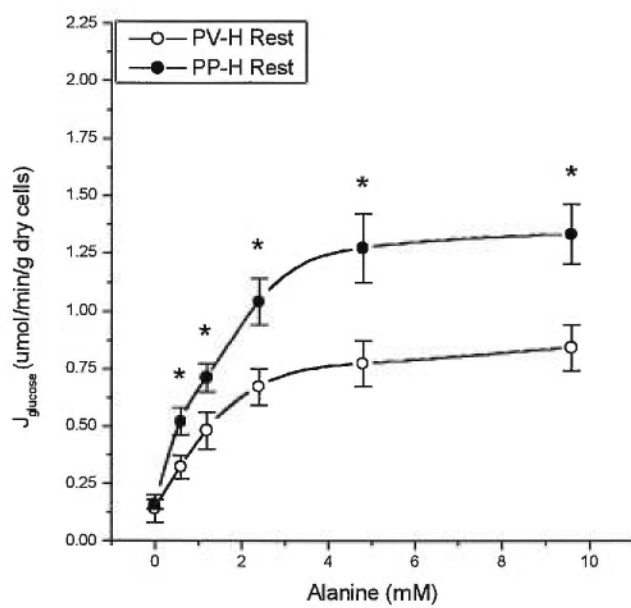
- Fig. 1. Glucose flux (J_{glucose}) of PP-H and PV-H at rest and after exercise in the presence different concentrations of alanine (0, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8, and 9.6 mM). Results are means \pm SE for $n = 8$ in each group. * significantly different ($P < 0.05$) between PP-H and PV-H of the same alanine concentration in the incubation medium.
- Fig. 2. Relationship between intra- and extracellular alanine concentrations of PP-H and PV-H at rest and after exercise. Results are means \pm SE for $n = 9$ in each group. + significantly different ($P < 0.05$) from the corresponding rest group of identical type of hepatocyte preparation.
- Fig. 3. Relationship between intracellular alanine concentrations and J_{glucose} of PP-H and PV-H at rest and after exercise. Results are means \pm SE for $n = 9$ in each group.
- Fig. 4. Relationship between intracellular alanine and pyruvate concentrations of PP-H and PV-H at rest and after exercise. Results are means \pm SE for $n = 9$ in each group.
- Fig. 5. Relationship between pyruvate concentrations and J_{glucose} of PP-H and PV-H at rest and after exercise. Results are means \pm SE for $n = 9$ in each group.

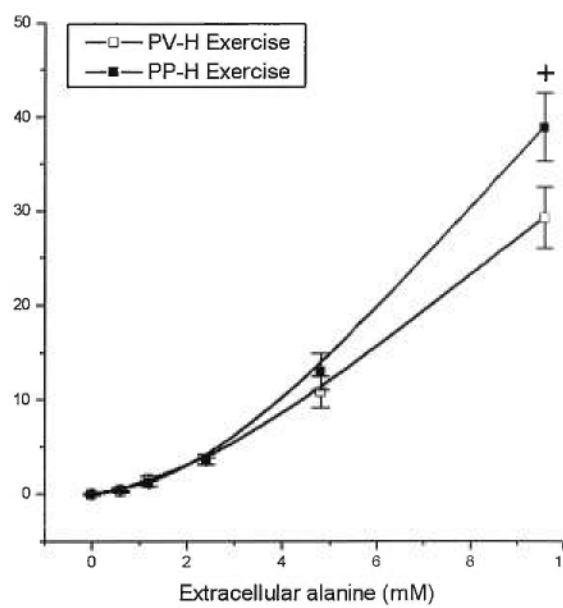
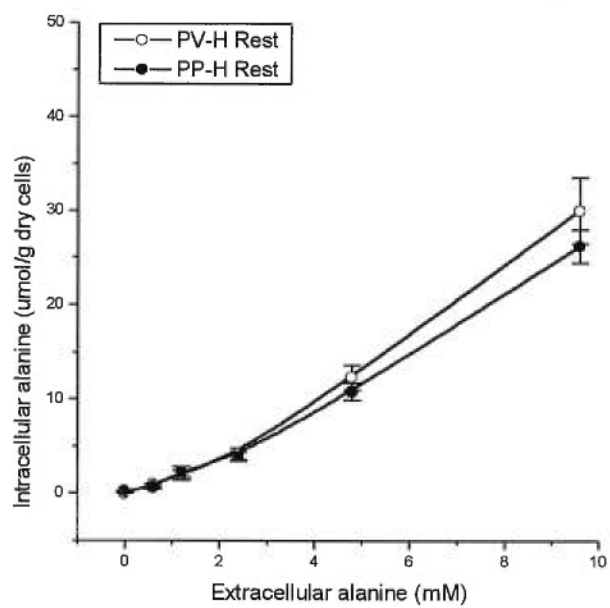
Fig. 6. Relationship between phosphoenolpyruvate concentrations and J_{glucose} of PP-H and PV-H at rest and after exercise. Results are means \pm SE for $n = 9$ in each group.

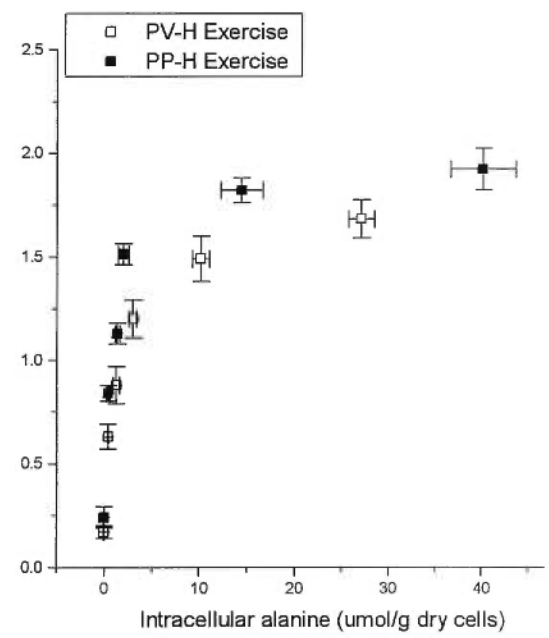
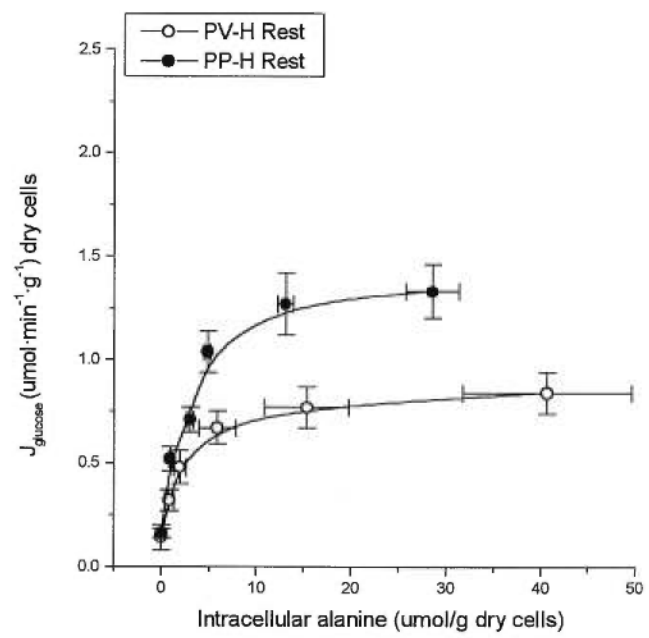
Fig. 7. Relationship between pyruvate and phosphoenolpyruvate concentrations of PP-H and PV-H at rest and after exercise. Results are means \pm SE for $n = 9$ in each group.

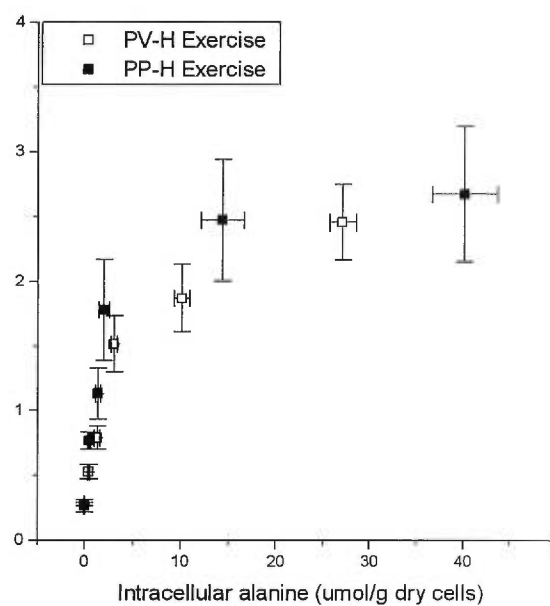
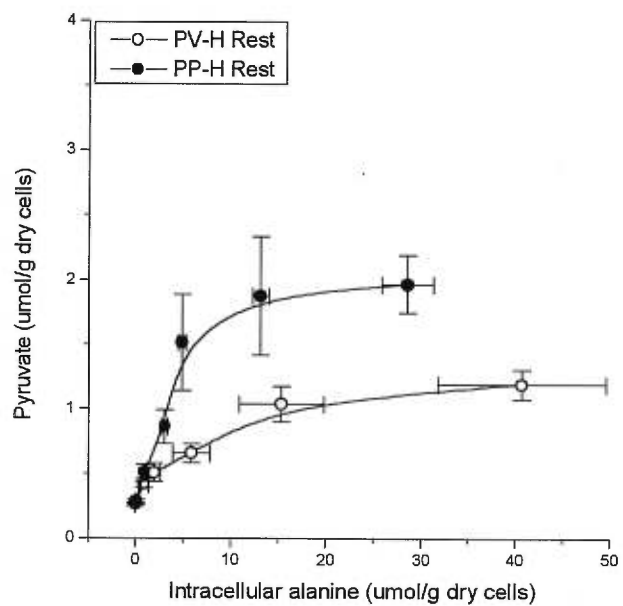
Table 1. Activity of glutamine synthetase in isolated hepatocytes. Values ($\mu\text{mol}^{-1} \cdot 100 \text{ mg}^{-1}$) are the means \pm SE.

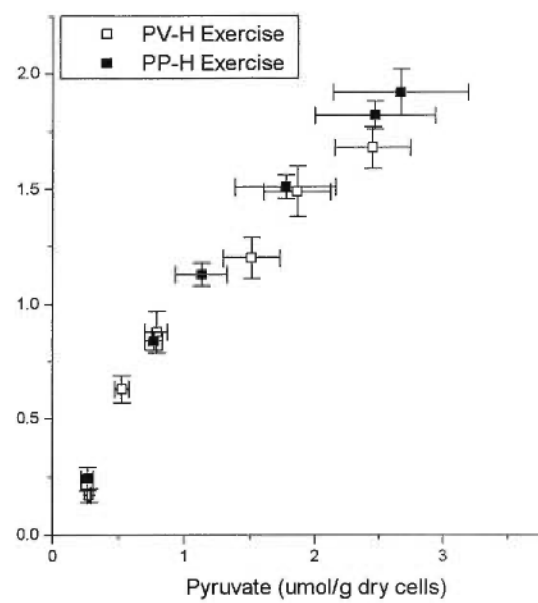
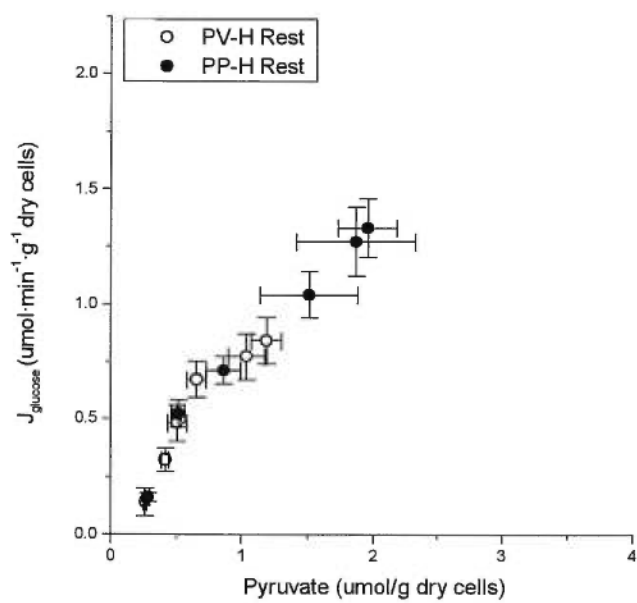
Conditions	PP-H	PV-H	PP-H/PV-H
Rest	45 ± 12	723 ± 2	0.06
Exercise	46 ± 9	655 ± 87	0.07

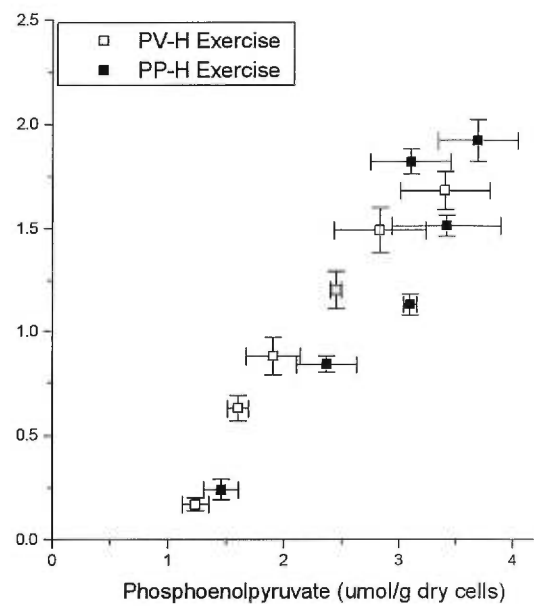
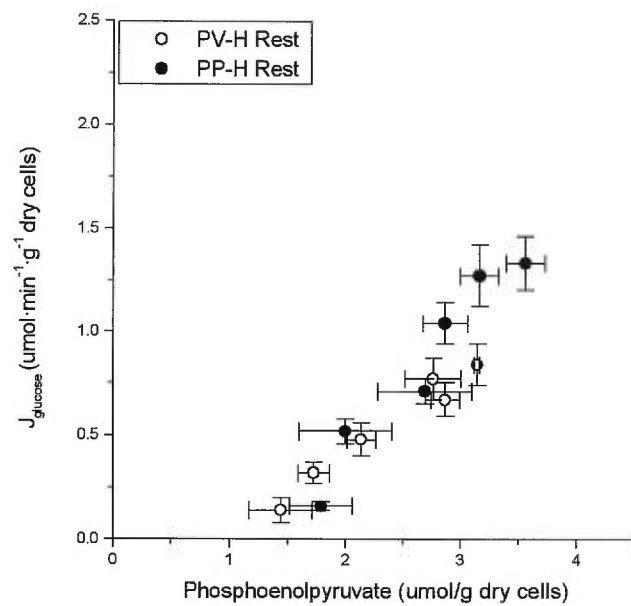


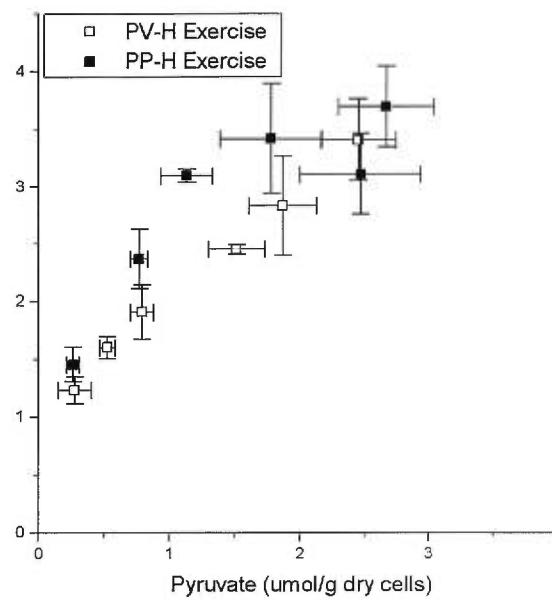
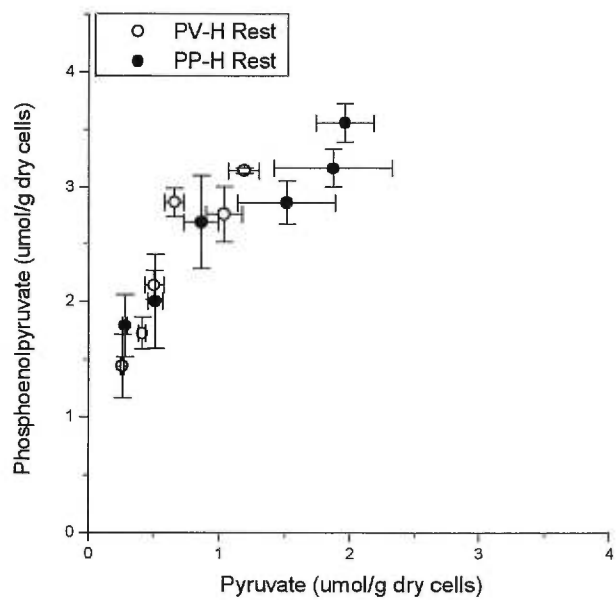












CHAPITRE 3 - DISCUSSION

3. DISCUSSION

Jusqu'à présent, aucune étude n'avait encore conciliée la zonation du métabolisme hépatique et la régulation du métabolisme énergétique à l'exercice. Pourtant, un bon nombre de travaux scientifiques ont porté sur ces deux problématiques au cours des 25 dernières années, particulièrement en ce qui a trait à la régulation du métabolisme glucidique. Les résultats des études qui ont été présentés indiquent sans équivoque que la compréhension de la réalité physiologique que constituent les adaptations du métabolisme énergétique à l'exercice est approfondie à partir du moment où l'on considère que le métabolisme hépatique ne s'opère pas uniformément par tous les hépatocytes.

Les deux premières études de cette thèse se voulaient donc davantage descriptives tandis que la troisième étude a permis de cerner des mécanismes pouvant potentiellement rendre compte des résultats observés. Les principaux thèmes de discussion ayant déjà été abordés dans les articles de la section précédente, ces derniers ne seront donc pas répétés dans la présente section. Toutefois, certaines hypothèses ou spéculations qui n'ont pas été mentionnées dans les articles sont abordées.

Lors de la première étude, les capacités de production de glucose de cellules périportales et périveineuses, obtenues de rats préalablement soumis à des conditions alimentaires (jeûne ou nourri) et des niveaux d'activité (repos ou exercice) différents ont été évaluées. Globalement, les résultats indiquent qu'au repos, les productions de

glucose des substrats exogènes s'avèrent plus élevées au sein des cellules périportales que périveineuses et ce, tant dans l'état de jeûne que bien nourri. En réponse à l'exercice, la production de glucose à partir d'alanine a été augmentée dans les deux type de cellules. Toutefois, à partir de lactate + pyruvate, la production de glucose a été augmentée seulement chez les cellules périveineuses, peu importe l'état nutritionnel. Dans l'état de jeûne, les cellules périveineuses se sont montrées influencées davantage par l'exercice que les cellules périportales de telle sorte que la différence de production de glucose des cellules périportales et périveineuses observées au repos n'est plus significative.

L'interprétation de ces résultats se trouve, en quelque sorte, limitée dans la mesure où les substrats néoglucogéniques étaient présentés de façon sélective et à des concentrations saturantes. De plus, le milieu d'incubation était dépourvu d'hormones dont les effets peuvent moduler la production de glucose des cellules. Toutes ces considérations sont le lot de l'utilisation du modèle d'hépatocytes isolés. Les gains obtenus en termes de contrôle expérimental, soit l'obtention de mélanges enrichis d'hépatocytes périportaux ou périveineux, se traduisent inévitablement en limites quant aux inférences possibles de la situation expérimentale à la situation *in vivo*. Force est de constater que ce sacrifice s'avère nécessaire dans l'étude du présent phénomène et les expérimentations présentées ont permis de démontrer que le modèle d'hépatocytes isolés permet d'afficher certaines différences acquises *in vivo* lors de la période d'exercice.

Outre les points déjà discutés dans l'article, une autre hypothèse mérite d'être considérée, soit celle des effets potentiels de l'augmentation des niveaux d'adrénaline. Plusieurs données de la littérature supportent cette hypothèse. D'abord, il est bien connu que les niveaux circulants d'adrénaline augmentent en situation d'exercice semblable à celle qui prévaut dans la première étude. Qui plus est, les effets de l'adrénaline sur l'augmentation de la production hépatique de glucose chez des rats à l'exercice ont été mis en évidence (134). Même si dans cette étude les effets de l'adrénaline se faisaient particulièrement sentir au niveau de la glycolyse, cela ne démontre pas pour autant une absence d'effet de l'adrénaline au niveau de la néoglucogenèse. Lors d'expériences sur des foies isolés et perfusés, Matsumura et Thurman ont démontré que la production de glucose de la région périveineuse augmentait davantage que celle de la région périportale en réponse à la présence d'adrénaline dans le perfusé (95). Il se pourrait donc, qu'en situation d'exercice, une augmentation des niveaux d'adrénaline circulants soit susceptible d'affecter davantage la néoglucogenèse des cellules périveineuses et, ce faisant, être responsable de la perte de zonation de la production de glucose telle qu'observée au repos.

Lors de la deuxième étude, les capacités de production de glucose à partir de DHA ainsi que les capacités de dégradation du DHA ou du glucose des cellules périportales et périveineuses, obtenues de rats préalablement soumis à des conditions alimentaires (jeûne ou nourri) et des niveaux d'activité (repos ou exercice) différents ont été évaluées. L'avantage d'utiliser un substrat tel que le DHA tient du fait qu'il est un substrat pour les deux voies métaboliques étudiées i.e. néoglucogenèse et glycolyse. Il peut donc indiquer l'aiguillage des substrats qui s'opère au sein des cellules et

notamment il est représentatif du flux à travers l'enzyme pyruvate kinase. Les résultats indiquent que les capacités de production de glucose à partir de DHA des cellules périportales et périveineuses augmentent avec l'exercice mais demeurent équivalentes entre les deux types de cellules. Les capacités glycolytiques des cellules périportales et périveineuses telles que représentées par la production de lactate + pyruvate à partir de glucose ou de DHA ne sont pas influencées par le type d'activité et ne diffèrent pas non plus selon le type de cellules. Tel que déjà mentionné dans l'article, le fait de ne pas trouver de différences entre la production de glucose des cellules périportales et celle des périveineuses s'explique relativement facilement à partir du fait que la néoglucogenèse à partir du DHA est principalement contrôlée par le ratio ATP/ADP qui semble être équivalent au sein des cellules périportales et périveineuses (51). Cependant, il ne faut pas en conclure pour autant que les niveaux d'ATP sont équivalents dans tous les hépatocytes de l'acinus. Récemment, Burns (30) a démontré qu'au sein de foies de rats ayant jeûné 48 heures perfusés avec un médium contenant 1.5 mM de lactate, le niveau d'ATP se distribuait de façon biphasique le long de l'acinus. Les plus grandes concentrations d'ATP se retrouvant donc en zone II ou zone intermédiaire, il apparaît donc que les zones périportale et périveineuse puissent, pour certaines caractéristiques, ne pas représenter réellement les valeurs limites d'un continuum comme c'est le cas pour la majorité des paramètres considérés jusqu'ici i.e. activités enzymatiques, concentration de substrats, etc. Pour ce qui est de l'ATP, ceci revêt une certaine importance puisqu'il a été démontré que les niveaux hépatique globaux d'ATP fluctuent selon les besoins énergétiques auxquels l'organisme peut faire face dont le jeûne et l'exercice (50,154). Peut-être existe-il une certaine dynamique insoupçonnée des niveaux hépatiques d'ATP qui n'a pas pu

être encore démontré en raison de l'utilisation de modèles expérimentaux 'foie total' ou 'hépatocytes périportaux et périveineux' négligeant les hépatocytes intermédiaires.

Lors de la troisième étude, les mesures de production de glucose ainsi que les concentrations de certains intermédiaires néoglucogéniques ont permis de mettre en évidence à quelle étape de la voie néoglucogénique se manifestaient les différences de production de glucose entre les cellules périportales et périveineuses ainsi que les effets de l'exercice. En outre, les résultats de cette troisième étude confirment les résultats obtenus lors de la première étude à savoir que l'exercice entraînait une augmentation de la production de glucose à partir de l'alanine au sein des cellules périportales et périveineuses et qu'il en résultait une perte de la zonation de la néoglucogenèse à partir de ce précurseur. Cette étude démontre également qu'en dépit du fait que les cellules périportales affichent une capacité néoglucogénique théorique plus grande que celle des périveineuses en raison de la prépondérance des enzymes gluconéogéniques dans la région périportale, ceci n'explique en rien les différences observées quant aux capacités de production de glucose des cellules périportales et périveineuses. Ces productions inégales de glucose s'avèrent entièrement attribuables à des différences quant aux deux premières étapes de la néoglucogenèse à partir de l'alanine, soit son transport à l'intérieur de l'hépatocyte et sa transamination en pyruvate.

Ces conclusions ne s'appliquent cependant pas à tous les substrats néoglucogéniques pouvant être utilisés par les cellules périportales et périveineuses. Tel ne serait pas le cas, par exemple, pour ce qui est de la néoglucogenèse à partir d'un mélange lactate +

pyruvate par exemple. À cet égard, les études du contrôle métabolique ont révélé que la somme des coefficients du contrôle du flux néoglucogénique des étapes formant le cycle phosphoénolpyruvate–pyruvate est de 64 % (PC : 56 %, transport de l'oxaloacétate : 3 % et PEPCK : 5 %). Mais comme le flux dépend des propriétés de toutes les enzymes qui entrent dans la constitution de la voie métabolique, la répartition du contrôle du flux peut se trouver modifiée en présence d'hormone comme le glucagon. Or, en présence de glucagon, la somme des coefficients du contrôle du flux néoglucogénique des étapes formant le cycle phosphoénolpyruvate–pyruvate grimpe à 95 % (PC : 83 %, transport de l'oxaloacétate : 4 % et PEPCK : 8 %). On peut donc en conclure que les flux néoglucogéniques des cellules périportales et périveineuses sont différents dans la mesure où les étapes contrôlant le flux à travers la voie néoglucogénique considérée sont différentes au sein des cellules périportales et périveineuses. Tel est le cas, par exemple, pour ce qui est du transport de l'alanine qui est plus élevé en région périportale qu'en région périveineuse (63).

En poussant un peu plus la réflexion, il est permis de penser qu'étant donné la différence de flux néoglucogéniques qu'affichent les cellules périportales et périveineuses dans les mêmes conditions et à partir du même substrat, la répartition du contrôle du flux néoglucogénique des cellules périportales et périveineuses soit différente. Ainsi, pour ce qui est de l'alanine, une étude du contrôle métabolique de cette voie pourrait révéler, par exemple, que le coefficient de contrôle du flux exercé par le transport de l'alanine est plus grand au sein de l'une des deux populations de cellules.

CHAPITRE 4 – CONCLUSION ET PERSPECTIVES

4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les études présentées dans le cadre de cette thèse démontrent d'abord que le modèle d'hépatocytes isolées s'avère un modèle expérimental adéquat afin d'étudier les effets de l'exercice sur le métabolisme glucidique hépatique puisque les cellules isolées affichent des caractéristiques qui perdurent suffisamment longtemps en post-exercice. Dans un deuxième temps, il est maintenant sans équivoque que les hépatocytes n'ont pas tous la même capacité de produire du glucose à partir de divers substrats et que ces capacités se trouvent modifiées en réponse à l'activité physique. De façon générale, au repos, les hépatocytes périportaux ont une plus grande capacité de production de glucose que les cellules périveineuses. Toutefois, avec la demande néoglucogénique imposée par l'activité physique, la capacité de production de glucose des hépatocytes périveineux augmente davantage que celle des hépatocytes périportaux de manière à assister en quelque sorte ces dernières afin d'assurer une activité néoglucogénique suffisante.

Comme ces études sont les premières à juxtaposer les connaissances de deux domaines de recherche i.e. zonation métabolique hépatique et métabolisme hépatique à l'exercice, et que, de toute évidence, cet exercice apparaît favorable à une compréhension approfondie de ces deux domaines, il est à penser que tout reste encore à faire et que la présente thèse ne fait que marquer le début d'une fructueuse ère de recherche à ce sujet.

Concernant la néoglucogénèse, il serait possible d'évaluer l'effets de certains facteurs dans les réponses observées, notamment les effets des variations des taux circulants

des hormones pancréatiques ou de la glycémie. Ainsi, on pourrait procéder à un verrouillage sélectif de l'un ou l'autre de ces facteurs au cours de la séance d'exercice et conséquemment en mesurer l'importance.

Outre la néoglucogenèse, l'autre composante de la production hépatique de glucose, la glycogénolyse méritent aussi d'être investiguée. Il est déjà connu que le métabolisme du glycogène est plus rapide dans la zone périportale (49), ce qui signifie que le glycogène se trouvant dans cette zone est dégradé et resynthétisé plus rapidement et en plus grande quantité que le glycogène de la région périveineuse. À ce sujet, la question de la glycogénolyse hépatique induite par l'activité physique aigüe demeure entière.

Parmi les autres éléments qu'il serait tout à fait indiqué d'explorer les effets de l'entraînement. Il est bien établi que la capacité de production de glucose des hépatocytes de rats entraînés est supérieure à celle de rats sédentaires (28). Toutefois, rien n'est encore établi quant aux mécanismes d'adaptation respectifs des cellules périportales et périveineuses d'une part et, d'autre part, quant aux réponses à l'exercice aigu de rats entraînés.

Un autre facteur dont l'étude est relativement récente et dont il n'a pas encore été question est le contrôle du volume cellulaire maintenant reconnu comme un déterminant important du métabolisme cellulaire (62,64). De façon générale, un environnement hyperosmolaire ou la présence de certains composés comme le glucagon, serait associé à un rétrécissement ou réduction du volume cellulaire ce qui

entraînerait un signal catabolique (glycogénolyse) dans la cellule tandis qu'un environnement hypo-osmolaire ou la présence de certains composés comme l'insuline, serait associé à un gonflement ou accroissement du volume cellulaire ce qui entraînerait un signal anabolique dans la cellule (glycogénèse). Puisque le métabolisme du glycogène hépatique est particulier aux différentes zones du foie, l'effet des variations des volumes cellulaires induits par l'activité physique se devra sans doute d'être étudié.

RÉFÉRENCES

1. **Aggarwal, S. R., K. O. Lindros, and T. N. Palmer.** Glucagon stimulates phosphorylation of different peptides in isolated periportal and perivenous hepatocytes. *FEBS 377*: 439-443, 1995.

2. **Agius, L., M. Peak, and G. M. M. Alberti.** Regulation of glycogen synthesis from glucose and gluconeogenic precursors by insulin in periportal and perivenous rat hepatocytes. *Biochem. J.* 266: 91-102, 1990.

3. **Agius, L. and D. Tosh.** Acinar zonation of cytosolic but not organelle-bound activities of phosphoenolpyruvate carboxykinase and aspartate aminotransferase in guinea-pig liver. *Biochem. J.* 271: 387-391, 1990.

4. **Aiston, S. and L. Agius.** Leptin enhances glycogen storage in hepatocytes by inhibition of phosphorylase and exerts an additive effect with insulin. *Diabetes* 45: 15-20, 1999.

5. **Andersen, B., A. Nath, and K. Jungermann.** Heterogenous distribution of phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver parenchyma, isolated and cultured hepatocytes. *Eur. J. Cell. Biol.* 28: 47-53, 1982.

6. **Andersen, B., S. Zierz, and K. Jungermann.** Alteration in zonation of succinate dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase in regenerating rat liver. *Histochem.* 80: 97-101, 1984.

7. **Anundi, I., F. C. Kauffman, and R. G. Thurman.** Gluconeogenesis from fructose predominates in periportal regions of the liver lobule. *J. Biol. Chem.* 262: 9529-9534, 1987.
8. **Asada-Kubota, M., K. Kanai, and S. Kanamura.** Development of ultrastructural heterogeneity among hepatocytes in the mouse. *Anat. Rec.* 202: 395-405, 1982.
9. **Babcock, M. B. and R. R. Cardell.** Hepatic glycogen patterns in fasted and fed rats. *Am. J. Anat.* 140: 299-338, 1974.
10. **Balks, H.-J. and K. Jungermann.** Regulation of peripheral insulin/glucagon levels by rat liver. *Eur. J. Biochem.* 141: 645-650, 1984.
11. **Bartels, H., H. Herbort, and K. Jungermann.** Predominant periportal expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase and tyrosine aminotransferase genes in rat liver. *Histochem.* 95: 637-644, 1990.
12. **Bartels, H., H. Linnemann, and K. Jungermann.** Predominant localization of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in the periportal zone of rat liver parenchyma demonstrated by in situ hybridization. *FEBS* 248: 188-194, 1989.
13. **Bartels, H., B. Vogt, and K. Jungermann.** Glycogen synthesis from pyruvate in the periportal and from glucose in the perivenous zone in perfused livers from fasted rats. *FEBS* 221: 277-283, 1987.

14. **Bartels, H., B. Vogt, and K. Jungermann.** Glycogen synthesis via the indirect gluconeogenic pathway in the periportal and via the direct glucose utilizing pathway in the perivenous zone of perfused liver. *Histochem.* 89: 253-260, 1988.

15. **Bass, N. M., J. A. Manning, and R. A. Weisiger.** Increased sinusoidal volume and solute extraction during retrograde liver perfusion. *Am. J. Physiol.* 256: G1041-G1048, 1989.

16. **Bengtsson, B. G., K.-H. Kiessling, A. Smith-Kielland, and J. Morland.** Partial separation and biochemical characteristics of periportal and perivenous hepatocytes from rat liver. *Eur. J. Biochem.* 118: 591-597, 1981.

17. **Berger, C. M., P. J. Sharis, D. P. Bracy, D. B. Lacy, and D. H. Wasserman.** Sensitivity of exercise-induced increase in hepatic glucose production to glucose supply and demand. *Am. J. Physiol.* 30: E411-E421, 1994.

18. **Bilir, B. M., T. W. L. Gong, V. Kwasiborski, C. S. Shen, C. S. Fillmore, C. M. Berkowitz, and J. J. Gumucio.** Novel control of the position-dependent expression of genes in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 268: 19776-19784, 1993.

19. **Bittner, R., H.-J. Bohme, L. Didt, W. Goltzsch, E. Hofmann, M. J. Levin, and G. Sparmann.** Developmental changes in the levels of hepatic enzymes and their relation to metabolic functions. *Adv. Enzyme Regul.* 17: 37-57, 1979.

20. **Bollen, M., S. Keppens, and W. Stalmans.** Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem. J.* 336: 19-31, 1998.

21. **Boon, L., and A. J. Meijer.** Role of amino-acide transport across the plasma membrane in the control of metabolic pathways in hepatocytes. In: *Molecular Mechanisms of Transport*, edited by E. Quagliariello and F. Palmieri. Amsterdam: Elsevier, 1992, p. 283-290

22. **Bouwens, L., M. Baekeland, R. De Zanger, and E. Wisse.** Quantification, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology* 6: 718-722, 1986.

23. **Bouwens, L., P. DeBlessier, K. Vanderkerken, B. Geerts, and E. Wisse.** Liver cell heterogeneity: functions of non parenchymal cell. *Enzyme* 46: 155-168, 1992.

24. **Bracht, A., J. Constantin, E. L. Ishii-Iwamoto, and F. Suzuki-Kemmelmeier.** Zonation of gluconeogenesis from lactate and pyruvate in the rat liver studied by means of anterograde and retrograde bivascular perfusion. *Biochimica. et Biophysica Acta.* 1199: 298-304, 1994.

25. **Brinkmann, N. Katz, D. Sasse, and K. Jungermann.** Increase of the gluconeogenic and decrease of the glycolytic capacity of rat liver with a change of the metabolic zonation after partial hepatectomy. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem* 359: 1561-1571, 1978.

26. **Burcelin, R., M. Carmen, M.-T. Guillam, and B. Thorens.** Liver hyperplasia and paradoxical regulation of glycogen metabolism and glucose-sensitive gene expression in GLUT2-null Hepatocytes. Further evidence for the existense of a membrane-based glucose release pathway. *J. Biol. Chem.* 275: 10930-10936, 2000.

27. **Burcelin, R., C. Mrejen, J.-F. Decaux, S. Hauguel De Mouzon, J. Girard, and M. J. Charron.** In vivo and in vitro regulation of hepatic glucagon receptor mRNA concentration by glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 14: 8088-8093, 1998.

28. **Burelle, Y., C. Fillipi, F. Péronnet, and X. Leverve.** Mechanisms of increased gluconeogenesis from alanine in rat isolated hepatocytes after endurance training. *Am. J. Physiol.* 278: E35-E42, 2000.

29. **Burger, H.-J., R. Gebhardt, C. Mayer, and D. Mecke.** Different capacities for amino acid transport in periportal and perivenous hepatocytes isolated by digitonin/collagenase perfusion. *Hepatology* 9: 22-28, 1989.

30. **Burns, S. P., R. D. Cohen, R. A. Iles, R. A. Bailey, M. Desai, J. P. Germain, and T. C. H. Going.** Zonation of gluconeogenesis, ketogenesis and intracellular pH in livers from normal and diabetic ketoacidotic rats: evidence for intralobular redistribution of metabolic events in ketoacidosis. *Biochem. J.* 343: 273-280, 1999.
31. **Burns, S. P., R. D. Cohen, R. A. Iles, J. P. Germain, T. C. H. Going, S. J. W. Evans, and P. Royston.** A method for determination in situ of variations within the hepatic lobule of hepatocyte function and metabolite concentrations. *Biochem. J.* 319: 377-383, 1996.
32. **Cai, Z.-S., B. A. Luxon, and E. I. Forker.** Intralobular zonal heterogeneity and hepatic indicator dilution curves. *Am. J. Physiol.* 268: G189-G199, 1995.
33. **Carlos Junqueira, L., J. Carneiro, and R. O. Kelly.** Glands associated with the digestive tract. In: *Basic Histology*, Anonymous Norwalk: Appelton & Lange, 1992, p. 312-335.
34. **Caster, W. O., J. Pncelet, A. B. Simon, and W. D. Armstrong.** Tissue weights of the rat; I. Normal values determined by dissection and chemical methods. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 91: 122-126, 1956.
35. **Chatzipanagiotou, S., A. Nath, B. Vogt, and K. Jungermann.** Alteration in the capacities as well as in the zonal and cellular distributions of pyruvate kinase L and M2 in regenerating rat liver. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 336: 271-280, 1985.

36. **Chen, K. S. and J. Katz.** Zonation of glycogen and glucose syntheses, but not glycolysis, in rat liver. *Biochem. J.* 255: 99-104, 1988.

37. **Chen, L., G. J. Davis, D. W. Crabb, and L. Lumeng.** Intrasplenic transplantation of isolated periportal and perivenous hepatocytes as long-term system for study of liver-specific gene expression. *Hepatology* 19: 989-998, 1994.

38. **Chiquoine, A. D.** The distribution of glucose-6-phosphatase in the liver and kidney of the mouse. *J. Histo. Cyto.* 1: 429-435, 1953.

39. **Cline, G. W. and G. I. Shulman.** Quantitative analysis of the pathways of glycogen repletion in periportal and perivenous hepatocytes in vivo. *J. Biol. Chem.* 266: 4094-4098, 1991.

40. **Cline, G. W. and G. I. Shulman.** Mass and positional isotopomer analysis of glucose metabolism in periportal and pericentral hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 270: 28062-28067, 1995.

41. **Corrin, B. and K. Aterman.** The pattern of glycogen distribution in the liver. *Am. J. Anat.* 122: 57-72, 1968.

42. **Dohm, G. L., G. J. Kasperek, and H. A. Barakat.** Time course of changes in gluconeogenic enzyme activities during exercise and recovery. *Am. J. Physiol.* 249: E6-E11, 1985.
43. **Dohm, G. L. and E. A. Newsholme.** Metabolic control of hepatic gluconeogenesis during exercise. *Biochem. J.* 212: 633-639, 1983.
44. **Ebert, S., R. Hildebrandt, and I. Haubitz.** Sinusoidal profiles of lactate dehydrogenase activity in rat liver. *Histochem.* 87: 371-375, 1987.
45. **Eilers, F., S. Modaressi, and K. Jungermann.** Predominant periportal expression of the fructose1-,6-biphosphatase gene in rat liver: dynamics during the daily feeding rhythm and sarvation-refeeding cycle. *Histochem Cell Biol* 103: 293-300, 1995.
46. **Fafournoux, P., C. Remesy, and C. Demigne.** Control of alanine metabolism in rat liver by transport processes or cellular metabolism. *Biochem. J.* 210: 645-652, 1983.
47. **Fischer, W., M. Ick, and N. Katz.** Reciprocal distribution of hexokinase and glucokinase in the periportal and perivenous zone of the rat liver acinus. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem* 363: 375-380, 1982.

48. **Frederiks, W. M., F. Marx, and C. J. F. Van Noorden.** Quantitative histochemical assessment of the heterogeneity of glycogen phosphorylase activity in liver parenchyma of fasted rats using the semipermeable membrane technique and the PAS reaction. *Histochemical Journal* 19: 150-156, 1987.
49. **Gebhardt, R.** Metabolic zonation of the liver regulation and implications for liver function. *Pharmac. Ther.* 53: 275-354, 1992.
50. **Ghanbari-Niaki, A., F. Désy, and J. Lavoie.** Effects of phosphate injection on metabolic and hormonal responses to exercise in fructose-injected rats. *Physiol. behav.* 67: 747-752, 1999.
51. **Ghosh, A. K., D. Finegold, W. White, K. Zawalich, and F. M. Matschinsky.** Quantitative histochemical resolution of the oxydation-reduction and phosphate potentials within the simple hepatic acinus. *J. Biol. Chem.* 257: 5476-5481, 1982.
52. **Gorgens, H. W., R. Hildebrandt, and I. Haubitz.** Distribution pattern of alanine aminotransferase activity in rat liver. *Histochem.* 88: 383-386, 1988.
53. **Gorska, M. and J. Gorski.** Failure to demonstrate the effect of glucose on insulin removal by perfused rat liver. *Endocrinologia experimentalis* 24: 369-373, 1990.

54. **Granner, D. K., P. A. Mayes, R. K. Murray, and V. W. Rodwell.** *Harper Précis de Biochimie*. Québec/Paris: Les Presses de l'Université Laval et les Éditions Eska, 1989, -797.
55. **Guder, W. G. and U. Schmidt.** Liver cell heterogeneity. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem* 357: 1793-1800, 1976.
56. **Guillam, M.-T., R. Burcelin, and B. Thorens.** Normal hepatic glucose production in the absence of GLUT2 reveals an alternative pathway for glucose release from hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 12317-12321, 1998.
57. **Gumucio, J. J.** Hepatocyte heterogeneity: the coming of age from the description of a biological curiosity to a partial understanding of its physiological meaning and regulation. *Hepatology* 9: 154-160, 1989.
58. **Gumucio, J. J. and D. L. Miller.** Functional implication of liver cell heterogeneity. *Gastroenterology* 80: 393-403, 1981.
59. **Gumucio, J. J., D. L. Miller, M. D. Krauss, and C. S. Zanolli.** Transport of fluorescent compounds into hepatocytes and the resultant zonal labeling of the hepatic acinus in the rat. *Gastroenterology* 80: 639-646, 1981.

60. **Gupta, S., P. Rajvanshi, R. P. Sokhi, S. Vaidya, A. Irani, and G. R. Gorla.** Position-specific gene expression in the liver lobule is directed by the microenvironment and not by the previous cell differentiation state. *J. Biol. Chem.* 274: 2157-2165, 1999.
61. **Hagopian, W. A. and H. S. Tager.** Hepatic glucagon metabolism. *J. Clin. Invest.* 79: 409-417, 1986.
62. **Haussinger, D.** The role of cellular hydration in the regulation of cell function. *Biochem. J.* 313: 697-710, 1996.
63. **Haussinger, D., W. H. Lamers, and A. F. M. Moorman.** Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of amino acids and ammonia. *Enzyme* 46: 72-93, 1992.
64. **Haussinger, D. and F. Lang.** Cell volume in the regulation of hepatic function : a mechanism for metabolic control. *Biochimica. et Biophysica Acta.* 1071: 331-350, 1991.
65. **Hevener, A. L., R. N. Bergman, and C. M. Donovan.** Novel glucosensor for hypoglycemic detection localized to the portal vein. *Diabetes* 46: 1521-1525, 1997.
66. **Hildebrandt, R.** Microbiochemical approach to liver cell heterogeneity around terminal hepatic venules. *Histochem.* 78: 539-544, 1983.

67. **Hildebrandt, R. and A. Schleicher.** Image analysis of the histochemical demonstration of glucose-6-phosphatase activity in rat liver. *Histochem.* 86: 181-190, 1986.
68. **Ikezawa, Y., K. Yamatani, A. Ogawa, H. Ohnuma, M. Igarashi, M. Daimon, D. Manaka, and H. Sasaki.** Effects of glucagon on glycogenolysis and gluconeogenesis are region-specific in periportal and perivenous hepatocytes. *J. Lab. Clin. Med.* 132: 547-555, 1998.
69. **Ishida, T., R. M. Lewis, C. J. Hartley, M. L. Entman, and J. B. Field.** Comparison of hepatic extraction of insulin and glucagon in conscious and anesthetized dogs. *Endo* 112: 1098-1109, 1983.
70. **John-Alder, H. B., R. M. McAllister, and R. L. Terjung.** Reduced running endurance in gluconeogenesis-inhibited rats. *Am. J. Physiol.* 251: R137-R142, 1986.
71. **Jones, C. G. and M. A. Thiteradge.** Measurement of metabolic fluxes through pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, pyruvate deshydrogenase, pyruvate carboxylase in hepatocytes of different acinar origin. *Arch. of biochem. and biophys.* 326: 202-206, 1996.

72. **Jungermann, K.** Dynamics of zonal hepatocyte heterogeneity. Perinatal development and adaptative alterations during regeneration after partial hepatectomy. *Acta hist.* 89-98, 1986.
73. **Jungermann, K., A. Gardemann, U. Beuers, C. Ballé, J. Sannemann, K. Beckh, and H. Hartmann.** Regulation of liver metabolism by the hepatic nerves. *Adv. Enzyme Regul.* 26: 63-88, 1987.
74. **Jungermann, K. and N. Katz.** Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiological Reviews* 69: 708-764, 1989.
75. **Jungermann, K. and T. Kietzmann.** Zonation of perenchymal and nonparenchymal metabolism in the liver. *Annu. Rev. Nutr.* 16: 179-203, 1996.
76. **Jungermann, K. and T. Kietzmann.** Role of oxygen in the zonation of carbohydrate metabolism and gene expression in liver. *Kidney International* 51: 402-412, 1997.
77. **Jungermann, K. and R. G. Thurman.** Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of carbohydrates. *Enzyme* 46: 33-58, 1992.
78. **Kanamura, S. and M. Asada-Kubota.** The heterogeneity of hepatocytes during the post natal development of the mouse. *Anat. Embryol.* 158: 151-159, 1980.

79. **Katz, J. and J. D. McGarry.** The glucose paradox. *J. Clin. Invest.* 74: 1901-1909, 1984.
80. **Katz, J. and J. A. Tayek.** Gluconeogenesis and the Cori cycle in 12-, 20-, and 40-h-fasted humans. *Am. J. Physiol.* 275: E537-E542, 1998.
81. **Katz, N. and K. Jungermann.** Autoregulatory shift from fructolysis to lactate gluconeogenesis in rat hepatocyte suspensions. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem* 357: 359-375, 1976.
82. **Katz, N., H. F. Teutsch, K. Jungermann, and D. Sasse.** Perinatal development of the metabolic zonation of hamster liver parenchyma. *FEBS* 69: 23-26, 1976.
83. **Katz, N., H. F. Teutsch, K. Jungermann, and D. Sasse.** Heterogeneous reciprocal localization of fructose-1,6-bis-phosphatase and of glucokinase in microdissected periportal and perivenous rat liver tissue. *FEBS* 83: 272-276, 1977.
84. **Katz, N., H. F. Teutsch, D. Sasse, and K. Jungermann.** Heterogeneous distribution of glucose-6-phosphatase in microdissected periportal and perivenous rat liver tissue. *FEBS* 76: 226-230, 1977.
85. **Kinugasa, A. and R. G. Thurman.** Differential effect of glucagon on gluconeogenesis in periportal and pericentral regions of the liver lobule. *Biochem. J.* 236: 425-430, 1986.

86. **Krones, A., T. Kietzmann, and K. Jungermann.** Periportal localization of glucagon receptor mRNA in rat liver and regulation of its expression by glucose and oxygen in hepatocytes cultures. *FEBS* 421: 136-140, 1998.
87. **Krones, A., T. Kietzmann, and K. Jungermann.** Perivenous localization of insulin receptor protein in rat liver, and regulation of its expression by glucose and oxygen in hepatocytes cultures. *Biochem. J.* 348: 433-438, 2000.
88. **Kuwajima, M., S. Golden, J. Katz, R. H. Unger, D. W. Foster, and J. D. McGarry.** Active hepatic glycogen synthesis from gluconeogenic precursors despite high tissue levels of fructose 2,6-biphosphate. *J. Biol. Chem.* 261: 2632-2637, 1986.
89. **Landau, B. R., J. Wahren, V. Chandramouli, W. C. Schumann, and K. Ekberg.** Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state. *J. Clin. Invest.* 98: 378-385, 1996.
90. **Lawrence, G. M., M. A. Jepson, I. P. Trayer, and D. G. Walker.** The compartmentation of glycolytic and gluconeogenic enzymes in rat kidney and liver and its significance to renal and hepatic metabolism. *Histochemical Journal* 18: 45-53, 1986.

91. **Lawrence, G. M., I. P. Trayer, and D. G. Walker.** Histochemical and immunohistochemical localization of heokinase isoenzymes in normal rat liver. *Histochemical Journal* 16: 1099-1111, 1984.
92. **Lee, S.-M. and M. G. Clemens.** Subacinar distribution of hepatocytes membrane potential response to stimulation of gluconeogenesis. *Am. J. Physiol.* 263: G319-G326, 1992.
93. **Lindros, K. O. and K. E. Pentilla.** Digitonin-collagenase perfusion for efficient separation of periportal or perivenous hepatocytes. *Biochem. J.* 228: 757-760, 1985.
94. **Loud, A. V.** A quantitative stereological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cells. *J. Cell. Biol.* 37: 27-46, 1968.
95. **Matsumura, T., T. Kashiwagi, H. Meren, and R. G. Thurman.** Gluconeogenesis predominates in periportal regions of the liver lobule. *Eur. J. Biochem.* 144: 409-415, 1984.
96. **Matsumura, T., F. C. Kauffman, H. Meren, and R. G. Thurman.** O₂ uptake in periportal and pericentral regions of liver lobule in perfused liver. *Am. J. Physiol.* 250: G800-G805, 1986.

97. **Matsumura, T. and R. G. Thurman.** Measuring rates of O₂ uptake in periportal and pericentral regions of liver lobule: stop-flow experiments with perfused liver. *Am. J. Physiol.* 244: G656-G659, 1983.
98. **Matsumura, T. and R. G. Thurman.** Predominance of glycolysis in pericentral regions of the liver lobule. *Eur. J. Biochem.* 140: 229-234, 1984.
99. **Miethke, H., B. Wittig, A. Nath, and K. Jungermann.** Gluconeogenic-glycolytic capacities and metabolic zonation in liver of rats with streptozotocin, non-ketotic as compared to alloxan, ketotic diabetes. *Histochem.* 85: 483-489, 1986.
100. **Miethke, H., B. Wittig, A. Nath, S. Zierz, and K. Jungermann.** Metabolic zonation in liver of diabetic rats. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 366: 493-501, 1985.
101. **Moore, M. C., A. D. Cherrington, G. W. Cline, M. J. Pagliassotti, E. M. Jones, D. W. Neal, C. Badet, and G. I. Shulman.** Sources of carbon for hepatic glycogen synthesis in the conscious dog. *J. Clin. Invest.* 88: 578-587, 1991.
102. **Moorman, A. F. M., P. A. J. de Boer, R. Charles, and W. H. Lamers.** Pericentral expression pattern of glucokinase mRNA in the rat liver lobulus. *FEBS* 287: 47-52, 1991.

103. **Morrison, G., I. Karl, R. Schwartz, and R. E. Shank.** The quantitative histochemistry of the normal human liver lobule. *J. Lab. Clin. Med.* 65: 248-256, 1965.
104. **Newgard, C. B., L. J. Hirsch, D. W. Foster, and J. D. McGarry.** Studies on the mechanism by which exogenous glucose is converted into glycogen in the rat. *J. Biol. Chem.* 258: 8046-8052, 1982.
105. **Newgard, C. B., S. V. Moore, D. W. Foster, and J. D. McGarry.** Efficient hepatic glycogen synthesis in refeeding rats requires continued carbon flow through the gluconeogenic pathway. *J. Biol. Chem.* 259: 6958-6963, 1984.
106. **Novikoff, A. B.** Cell heterogeneity within the hepatic lobule of the rat (staining reactions). *J. Histo. Cyto.* 7: 240-244, 1959.
107. **Nuber, R., H. F. Teutsch, and D. Sasse.** Metabolic zonation in thioacetamide-induced liver cirrhosis. *Histochem.* 69: 277-288, 1980.
108. **Ogawa, A., K. Kurita, Y. Ikezawa, M. Igarashi, T. Kuzumaki, M. Daimon, T. Kato, K. Yamatani, and H. Sasaki.** Functional localization of glucose transporter 2 in rat liver. *J. Histo. Cyto.* 44: 1231-1236, 1996.
109. **Olavarria, J. M., O. G. R. Godeken, R. Sandruss, and M. Flawia.** Recovery of liver glycogen in fasted rats. *BBA* 165: 185-188, 1968.

110. **Peak, M. and L. Agius.** Differential incorporation of glucogenic precursors and glucose into glycogen in periportal and perivenous rat hepatocytes. *Bio. Soc. Trans.* 18: 587-588, 1990.
111. **Pessin, J. E. and G. I. Bell.** Mammalian facilitative glucose transporter family: structure and molecular regulation. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 911-930, 1992.
112. **Pilkis, S. J. and D. K. Granner.** Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 885-909, 1992.
113. **Pilkis, S. J., D. M. Regen, T. H. Clauss, and A. D. Cherrington.** Role of hepatic glycolysis and gluconeogenesis in glycogen synthesis. *BioEssays* 2: 273-276, 1985.
114. **Probst, I., P. Schwartz, and K. Jungermann.** Induction in primary of gluconeogenic and glycolytic hepatocytes resembling periportal and perivenous cells. *Eur. J. Biochem.* 126: 271-278, 1982.
115. **Quistorff, B.** Gluconeogenesis in periportal and perivenous hepatocytes of rat liver, isolated by a new high-yield digitonin/collagenase perfusion technique. *Biochem. J.* 229: 221-226, 1985.

116. **Quistorff, B., J. Dich, and N. Grunnet.** Periportal and perivenous hepatocyte retain their zonal characteristics in primary culture. *Biochem. Biophys. Research Comm.* 139: 1055-1061, 1986.
117. **Quistorff, B. and N. Grunnet.** Dual-digitonin-pulse perfusion. Concurrent sampling of periportal and perivenous cytosol of rat liver for determination of metabolites and enzyme activities. *Biochem. J.* 243: 87-95, 1987.
118. **Reilly, F. D., P. A. McCuskey, and R. S. McCuskey.** Intrahepatic distribution of nerves in the rat. *Anat. Rec.* 191: 55-68, 1978.
119. **Richards, W. L. and V. R. Potter.** Scanning microdensitometry of glycogen zonation in the livers of rats adapted to a controlled feeding schedule and to 30, 60 or 90 % casein diets. *Am. J. Anat.* 157: 71-85, 1980.
120. **Richter, E. A., B. Kiens, H. Galbo, and B. Saltin.** *Skeletal muscle metabolism in exercise and diabetes.* New York and London: Plenum Press, 1998,
121. **Sasse, D.** Dynamics of liver glycogen The topochemistry of glycogen synthesis, glycogen content and glycogenolysis under the experimental conditions of glycogen accumulation and depletion. *Histochem.* 237-254, 1975.
122. **Sasse, D. and H. Hoffmann.** Postnatal differentiation of sex-specific distribution patterns of G6Pase, G6PDH and ME in the rat liver. *Histochem.* 75: 31-42, 1982.

123. **Sasse, D., N. Katz, and K. Jungermann.** Functional heterogeneity of rat liver parenchyma and of isolated hepatocytes. *FEBS* 57: 83-88, 1975.
124. **Sasse, D., U. M. Spornitz, and I. Piotr Maly.** Liver architecture. *Enzyme* 46: 8-32, 1992.
125. **Sasse, D., H. F. Teutsch, N. Katz, and K. Jungermann.** The development of functional heterogeneity in the liver parenchyma of the golden hamster. *Anat. Embryol.* 156: 153-156, 1979.
126. **Schmidt, U., H. Schmid, and W. G. Guder.** Liver cell heterogeneity. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem* 359: 193-198, 1978.
127. **Seseke, F. G., A. Gardemann, and K. Jungermann.** Signal propagation via gap junctions, a key step in the regulation of liver metabolism by the sympathetic nerves. *FEBS* 301: 265-270, 1992.
128. **Shank, R. E., G. Morrison, C. H. Cheng, I. Karl, and R. Schwartz.** Cell heterogeneity within the hepatic lobule (quantitative histochemistry). *J. Histo. Cyto.* 7: 237-239, 1959.

129. **Shiota, M., Y. Fujimoto, M. Inagami, M. Hiramatsu, M. Moriyama, K. Kimura, M. Ohta, and T. Sugano.** Adaptative changes in zonation for gluconeogenic capacity in liver lobules of cold-exposed rats. *Am. J. Physiol.* 265: E559-E564, 1993.
130. **Shiota, M., M. Hiramatsu, Y. Fujimoto, M. Moriyama, K. Kimura, M. Ohta, and T. Sugano.** The capacity of the malate-aspartate shuttle differs between periportal and perivenous hepatocytes from rats. *Arch. of biochem. and biophys.* 308: 349-356, 1994.
131. **Shiota, M., M. Inagami, Y. Fujimoto, M. Moriyama, K. Kimura, and T. Sugano.** Cold acclimatation induces zonal heterogeneity in gluconeogenic responses to glucagon in rat liver lobule. *Am. J. Physiol.* 268: E1184-E1191, 1995.
132. **Sigal, S. H., s. Brill, A. S. Fiorino, and L. M. Reid.** The liver as a stem cell and lineage system. *Am. J. Physiol.* 263: G139-G148, 1992.
133. **Sips, H. J., A. K. Groen, and J. M. Tager.** Plasma-membrane transport of alanine is rate-limiting for its metabolism in rat-liver parenchymal cells. *FEBS* 119: 271-274, 1980.
134. **Sonne, B., K. J. Mikines, E. A. Richter, N. J. Christensen, and H. Galbo.** Role of liver nerves and adrenal medulla in glucose turnover of running rats. *J. Appl. Physiol.* 59: 1640-1646, 1985.

135. **Staricoff, M. A., R. D. Cohen, and J. P. Monson.** Carrier-mediated lactate entry into isolated hepatocytes from fed and starved rats : zonal distribution and temperature dependence. *Bio. Rep.* 15: 99-109, 1995.
136. **Tai, M., D. L. Schneider, B. Thorens, and H. F. Lodish.** Restricted expression of the erythroid/brain glucose transporter isoform to perivenous hepatocytes in rats. *J. Clin. Invest.* 86: 986-992, 1990.
137. **Te Koppele, J. M. and R. G. Thurman.** Phagocytosis by Kupffer cells predominates in pericentral regions of the liver lobule. *Am. J. Physiol.* 259: G814-G821, 1990.
138. **Teutsch, H. F.** Improved method for the histochemical demonstration of glucose-6-phosphatase activity. *Histochem.* 57: 107-117, 1978.
139. **Teutsch, H. F.** Quantitative determination of G6Pase activity in histochemically defined zones of the liver acinus. *Histochem.* 58: 281-288, 1978.
140. **Teutsch, H. F.** Chemomorphology of liver parenchyma. *Prog. Histochem. Cytochem.* 14: 1981.
141. **Teutsch, H. F.** Sex-specific regionality of liver metabolism during starvation; with special reference to the heterogeneity of lobular periphery. *Histochem.* 81: 87-92, 1984.

142. **Teutsch, H. F.** Quantitative histochemical assessment of regional differences in hepatic glucose uptake and release. *Histochem.* 82: 159-164, 1985.
143. **Teutsch, H. F.** A new sample isolation procedure for microchemical analysis of functional liver cell heterogeneity. *J. Histo. Cyto.* 34: 263-267, 1986.
144. **Teutsch, H. F.** Regionality of glucose-6-phosphate hydrolysis in the liver lobule of the rat: metabolic heterogeneity of 'portal' and 'septal' sinusoids. *Hepatology* 8: 311-317, 1988.
145. **Teutsch, H. F. and O. H. Lowry.** Sex specific regional differences in hepatic glucokinase activity. *Biochem. Biophys. Research Comm.* 106: 533-538, 1982.
146. **Thorens, B.** Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. *Am. J. Physiol.* 270: G541-G553, 1996.
147. **Tosh, D., G. M. M. Alberti, and L. Agius.** Glucagon regulation of gluconeogenesis and ketogenesis in periportal and perivenous rat hepatocytes. *Biochem. J.* 256: 197-204, 1988.
148. **Tosh, D., G. M. M. Alberti, and L. Agius.** Hypophysectomy does not alter the acinar zonation of gluconeogenesis or the mitochondrial redox state in the rat liver. *Biochem. J.* 260: 183-187, 1989.

149. **Toyoda, Y., I. Miwa, M. Kamiya, S. Ogiso, J. Okuda, and T. Nonogaki.** Changes in subcellular and zonal distribution of glucokinase in rat liver during postnatal development. *FEBS* 359: 81-84, 1995.
150. **Trus, M., K. Zawalich, D. Gaynor, and F. Matschinsky.** Hexokinase and glucokinase distribution in the liver lobule. *J. Histo. Cyto.* 28: 579-581, 1980.
151. **Van Noorden, C. J. F., I. M. C. Vogels, and J. James.** Adaptative sex-dependent changes in the zonation of carbohydrate and lipid metabolism in rat liver lobules after partial hepatectomy. *Hepatology* 20: 714-724, 1994.
152. **Van Schaftingen, E.** Glycolysis revisited. *Diabetologia* 36: 581-588, 1993.
153. **Vernon, R. G. and D. G. Walker.** Changes in activity of some enzymes involved in glucose utilization and formation in developing rat liver. *Biochem. J.* 106: 321-329, 1968.
154. **Wals, P. A., M. Palacin, and J. Katz.** The zonation of liver and the distribution of fructose 2,6-biophosphate in rat liver. *The Journal of Biological Chemistry* 263: 4876-4881, 1988.
155. **Wasserman, D. H.** Regulation of glucose fluxes during exercise in the postabsorptive state. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 191-218, 1995.

156. **Wasserman, D. H., P. E. Williams, D. Brooks Lacy, D. Bracy, and A. D. Cherrington.** Hepatic nerves are not essential to the increase in hepatic glucose production during muscular work. *Am. J. Physiol.* 259: E195-E203, 1990.

157. **Wasserman, D. H., P. E. Williams, D. Brooks Lacy, D. R. Green, and A. D. Cherrington.** Importance of intrahepatic mechanisms to gluconeogenesis from alanine during exercise and recovery. *Am. J. Physiol.* 254: E518-E525, 1988.

158. **Welsh, F. A.** Distribution of glycogen within the liver lobule. *J. Histo. Cyto.* 20: 112-115, 1972.

159. **Wiersma, M. M. L., J. Vissing, K. J. Mikines, A. B. Steffens, and H. Galbo.** Effect of liver denervation on glucose production during running in guinea pigs. *Am. J. Physiol.* 268: R72-R77, 1995.

160. **Wimmer, M.** The effect of sex hormones on the acinar distribution pattern of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in rat liver. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 370: 683-690, 1989.

161. **Wimmer, M.** Effects of starvation and refeeding a high carbohydrate diet on the intra-acinar distribution pattern of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in the liver of male and female rats. *Histochem.* 92: 331-336, 1989.

162. **Wimmer, M.** Phosphoenolpyruvate carboxykinase activity patterns in the liver acinus of diabetic and diabetic and estrogen treated rats. *Histochem.* 93: 49-53, 1989.
163. **Wimmer, M., C. Luttringer, and M. Colombi.** The development of the acinar heterotopic pattern of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in the newborn rat. *Histochem.* 94: 55-59, 1990.
164. **Wimmer, M., C. Luttringer, and M. Colombi.** Changes in the acinar activity patterns of phosphoenolpyruvate carboxykinase in livers of male and female rats upon feeding a high protein and a high fat diet. *Histochem.* 93: 257-262, 1990.
165. **Wimmer, M. and D. Pette.** Microphotometric studies on intraacinar enzyme distribution in rat liver. *Histochem.* 64: 23-33, 1979.
166. **Wisse, E., R. De Zanger, K. Charels, P. Van Der Smissen, and R. S. McCuskey.** The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology* 5: 683-692, 1985.
167. **Witters, L. A., A. Christensen, K. Fassihi, A. N. King, J. Widmer, and B. Quistorff.** Application of dual-digitonin-pulse perfusion to the study of hepatic mRNA zonation. *Biochem. J.* 294: 809-812, 1993.

168. **Wittig, B., S. Zierz, G. Gubernatis, A. Nath, and K. Jungermann.** Glucostat capacity and metabolic zonation in rat liver after portocaval anastomosis. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 366: 713-722, 1985.
169. **Wolfe, D. and K. Jungermann.** Long-term effects of physiological oxygen concentrations on glycolysis and gluconeogenesis in hepatocyte cultures. *Eur. J. Biochem.* 151: 299-303, 1985.
170. **Wolfe, D., H. Schmid, and K. Jungermann.** Short-term modulation of glycogen metabolism, glycolysis and gluconeogenesis by physiological oxygen concentrations in hepatocyte cultures. *Eur. J. Biochem.* 135: 405-412, 1983.
171. **Zierz, S., N. Katz, and K. Jungermann.** Distribution of pyruvate kinase L and M2 in microdissected periportal and perivenous rat liver tissue with different dietary states. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem* 364: 1447-1453, 1983.