



HAL
open science

**Caractérisation et étude de la régulation des
transporteurs d'acides aminés chez une espèce phare de
l'aquaculture française: la truite arc-en-ciel
(*Oncorhynchus mykiss*)**

Soizig Le Garrec

► **To cite this version:**

Soizig Le Garrec. Caractérisation et étude de la régulation des transporteurs d'acides aminés chez une espèce phare de l'aquaculture française: la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Médecine humaine et pathologie. Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2024. Français. NNT: 2024PAUU3017. tel-04818325

HAL Id: tel-04818325

<https://theses.hal.science/tel-04818325v1>

Submitted on 4 Dec 2024

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

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

THESE DE DOCTORAT

Présentée et soutenue le : 17 Octobre 2024

Par : Soizig LE GARREC

Thèse pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour

Spécialité Biochimie, biologie cellulaire et moléculaire, physiologie et Nutrition

Caractérisation et étude de la régulation des transporteurs d'acides aminés chez une espèce phare de l'aquaculture française : la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)

Thèse dirigée par : Florian BEAUMATIN / Iban SEILIEZ

JURY

Présidente du jury :

- Anne DEVIN

Directrice de recherche - CNRS

Rapporteurs

- David MAZURAI
- Corinne SAGNE

Chargé de recherche - IFREMER

Chargée de recherche - INSERM

Examineurs

- Alain BRUHAT

Directeur de recherche - INRAE

Directeurs

- Florian BEAUMATIN
- Iban SEILIEZ

Enseignant-chercheur - UPPA

Directeur de recherche - INRAE

UNIVERSITE DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR

Laboratoire NuMeA

Soizig Le Garrec - Doctorante – soizig.le-garrec@inrae.fr



REMERCIEMENTS

Durant ce travail de thèse effectué au laboratoire Nutrition Métabolisme Aquaculture (NuMÉA – INRAe) de Saint-Pée sur Nivelle, j'ai eu l'occasion de rencontrer de nombreuses personnes. Une thèse ne se réalisant pas seul mais représentant le fruit de nombreuses collaborations, j'aimerais remercier toutes les personnes ayant participé, de près ou de loin, à l'élaboration de ce travail.

Premièrement, je tiens à remercier les membres du jury ayant accepté d'évaluer mon travail : David Mazurais et Corinne Sagné en qualité de rapporteurs ainsi qu'Alain Bruhat et Anne Devin en qualité d'examineurs.

Un grand merci à mes directeurs de thèse : Florian Beaumatin et Iban Seiliez. Ces trois années passées à vos côtés ont été d'une richesse scientifique incomparable : merci pour l'apprentissage que vous m'avez offert mais surtout merci de m'avoir transmis votre amour de la science ; bien que je ne pourrais probablement jamais comparer, je ne pense pas pouvoir mieux tomber qu'avec vous comme directeurs. Pour cela, merci infiniment !

Je tiens également à remercier toutes les personnes ayant contribué scientifiquement et/ou techniquement à l'élaboration de ce travail. Tout d'abord, un grand merci à Karine Pinel pour m'avoir formé techniquement à quasiment toutes les techniques que je maîtrise aujourd'hui : ce fut une grande chance de pouvoir travailler avec toi, tant sur le plan professionnel que personnel (pour lequel tu as également été d'une grande aide !). Un grand merci également à Akintha Ganot, avec qui j'ai eu l'occasion de travailler pendant 2 ans, mais également à Ophélie Iorfida que j'ai pu encadrer durant son stage de BUT : une sacrée équipe ! Merci à Cécile Hérault, pour ton appui solide lors de ces analyses diaboliques de contenu intracellulaire en AA par UPLC, une folle histoire !!! Je remercie également l'ensemble de l'équipe de culture cell, aussi constitué de Emilio, Sarah, Linda... tout ce temps passé dans ce mini labo tout froid était tout de même fort sympa ! Enfin, un grand merci à Jacques Labonne pour ta précieuse aide dans ce travail, ce fut vraiment très intéressant d'échanger avec toi et d'en apprendre davantage sur les statistiques et la modélisation. Merci à tous !

Je remercie évidemment l'ensemble de l'aquapôle de l'INRAe (une liste serait bien trop longue) : nous nous croisons quotidiennement et passer un bon moment autour d'un café le matin permet, finalement tout autant, de garantir un travail efficace !

Evidemment, toutes arrivées le 01 octobre 2021 et soutenant à quelques semaines d'intervalle, mille mercis au Osasuna Gang !!! Même si vous faisiez partie d'Ecoflop et qu'il était parfois difficile de se comprendre (tu travailles sur quoi déjà, j'ai pas compris ?), vous avez été un pilier remarquable durant ces trois belles années passées à vos côtés : merci Mélanie (on attend le prochain Melfest avec impatience), merci Edel (à quand la prochaine séparation par un couloir

de la mort ?) et merci² Stéllia (ma petite étoile qui a toujours éclairée ce chemin de thèse). Également un grand merci à l'ensemble de l'UMT (une sacrée bande de joyeux lurons !) : les vieux déjà partis (Laura, Léa, Simon, Marius : votre époque était sacrément folle) et les jeunes fraîchement arrivés : Ambra, Steffi, Stephano, Alan, Eva, Gaëlle ((+Antoine), vous êtes arrivés trop tard), on compte sur vous pour la suite des événements !

Pour terminer, j'aimerais remercier l'ensemble de mon entourage (breton) : les copains de Concarneau pour toutes ces années et votre soutien moral durant ces trois années (merci Jeeaanee), les copains de fac de Brest (merci TT et lélé : comme quoi compter des bigorneaux et des algues ouvre des portes surprenantes !).

En passant par Brest, je me permets une petite digression pour remercier l'ensemble du laboratoire PHYTNESS de l'Ifremer : c'est avec vous que j'ai réalisé mes premières expériences dans la Recherche et pour cela merci beaucoup. Un deuxième merci pour toi, David, cette fois-ci plus personnel : merci de m'avoir aidé à atteindre Saint-Pée sur Nivelle !

Je remercie également ma famille : l'ensemble de ma patrie Le Garrec ainsi que ma grand-mère : merci pour ton soutien indéfectible depuis des années (mais aussi merci pour cet apprentissage et approfondissement de la langue française !). Je remercie également ma mère, à qui je dédie en quelques sortes cette thèse, merci de m'avoir toujours laissé le choix et accompagné peu importe la direction. Enfin, un géantissime merci Marius, à qui j'ai probablement donné plus de travail qu'à n'importe qui.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
PRELIMINAIRE	1
I. Les acides aminés, nutriments essentiels à la cellule	3
A. Acides aminés : constituants des protéines	3
a. Généralités	3
b. Des Acides Aminés plus essentiels que d'autres ?	4
B. Rôles fonctionnels des acides aminés dans le métabolisme cellulaire	6
C. Rôles fonctionnels des acides aminés dans la signalisation cellulaire	8
a. Implications des AA dans la signalisation mTOR	9
b. Activation de la voie GCN2 par les acides aminés	15
c. Dialogue entre mTOR et GCN2	21
II. Les Transporteurs d'Acides Aminés	24
A. Généralités sur le transport membranaire	24
B. Classification des Transporteurs d'Acides Aminés	26
C. Rôles biologiques des TAA	34
a. Implication des TAA dans l'absorption intestinale des AA	34
b. TAA et neurotransmission	36
c. Implication des TAA dans le développement	37
d. Implication des TAA dans la réponse immunitaire	37
e. Les TAA intracellulaires	38
D. Pathologies liées aux TAA chez les mammifères	43
a. Pathologies liées à la perte de fonction des TAA	44
b. Transporteurs d'acides aminés et cancers	45
c. Transporteurs d'acides aminés et diabète	46
E. Méthodes pour l'étude des TAA	46
III. Régulation des Transporteurs d'acides aminés	49
A. Régulations transcriptionnelles des TAA	49
a. GCN2 et l'ERAA (Elément de Réponse aux Acides Aminés)	50

b. Stress oxydant et l'ARE (Antioxidant Response Element)	51
c. Glucose et le ChORE (Carbohydrate Response element)	51
d. Biogénèse lysosomale et le réseau CLEAR (Coordinated Lysosomal Expression And Regulation)	52
B. Régulations post-traductionnelles des TAA	54
IV. Homéostasie des acides aminés et transporteurs d'acides aminés chez les poissons téléostéens : focus sur la truite arc-en-ciel	58
A. Contextualisation : introduction à l'aquaculture et défis associés	58
a. Expansion de l'aquaculture dans le monde	58
b. Alimentation de la truite arc-en-ciel	60
c. Nouvelles sources protéiques : des avantages mais aussi des inconvénients	62
B. Signalisation des AA chez les poissons téléostéens et la truite arc-en-ciel	65
a. mTOR chez les poissons téléostéens	65
b. GCN2 chez les poissons téléostéens	68
C. Connaissances des TAA chez les poissons téléostéens et la truite arc-en-ciel	69
a. L'événement de duplication du génome et généralités	69
b. Caractérisation des TAA dans la neurotransmission et le développement	72
c. Caractérisation des TAA pour leur implication dans l'absorption des AA chez les espèces d'intérêt agronomique	73
OBJECTIFS	76
PUBLICATION : Dissecting the nutritional regulations of a whole amino acid transporter family from a complex genome species: A holistic approach turning weaknesses into strengths	81
DISCUSSION	132
<i>L'analyse globale de l'expression des TAA chez la TAC a mis en évidence, en plus d'une corrélation apparente entre TAA dérégulés et AA absorbés, l'existence de groupes de régulation en réponse aux conditions nutritionnelles. Y a-t-il une logique apparente dans ces régulations ?</i>	133
<i>Les carences en un seul AA démontrent généralement une réponse transcriptionnelle forte des TAA, avec tout de même des différences de profils selon l'AA considéré. Serait-il possible d'utiliser les TAA comme des biomarqueurs de carence spécifique en AA ?</i>	136

Si les AAE n'induisent pas des réponses homogènes pour la régulation des TAA, qu'en est-il des AANE ? _____ **139**

Bien que le mécanisme régissant la régulation des TAA du groupe A ait été déterminé dans notre étude, les régulations inhérentes aux groupes B et C restent, pour le moment, inconnues. Quels mécanismes pourraient alors régir la régulation de ces deux derniers groupes ? _____ **145**

L'analyse des régulations des TAA a mis en lumière l'existence d'un potentiel ERAA dans les promoteurs des TAA du groupe A : ERAA fonctionnels et possibilité d'extension aux autres groupes ? _____ **151**

La réponse AA dépendante de nos TAA a été validée in vivo. Cependant, la composition en glucides du régime utilisé a potentiellement induit des régulations différentielles des TAA : qu'en est-il de la régulation des TAA par les glucides ? _____ **154**

Malgré une potentielle conservation des fonctions globales des TAA chez la TAC, la double duplication entière du génome induit une diversité de régulation. _____ **157**

En intégrant la dérégulation des TAA, l'absorption des AA et l'activation de mTORC1, cette étude a potentiellement mis en évidence de nouveaux AA activateurs de mTOR. _____ **163**

L'étude des régulations globales des TAA et de leurs effets sur l'homéostasie des AA a ici porté sur une espèce d'intérêt agronomique connue, mais pourtant non considérée comme modèle pour des études fondamentales. Du fait de son génome complexe, de nombreux outils moléculaires sont peu aisés à mettre en pratique. Néanmoins, notre étude démontre que la stratégie adoptée, relativement simple à mettre en œuvre, permet une caractérisation des mécanismes d'intérêts ; ainsi potentiellement applicable aux espèces modèles mais également à tous les autres modèles moins conventionnels. _____ **167**

CONCLUSION _____ **171**

BIBLIOGRAPHIE _____ **174**

COMMUNICATIONS _____ **205**

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Formule et classification des 20 acides aminés protéinogènes chez les eucaryotes	4
Figure 2 : Représentation schématique de toutes les inter-conversions possibles entre AA	6
Figure 3 : Insertion de tous les AA protéinogènes dans le cycle de Krebs pour la production de glucose ou d'acides gras	7
Figure 4 : Organisation des complexes mTORC1 et mTORC2 avec leurs différents partenaires et les fonctions globales de chaque complexes	10
Figure 5 : Facteurs et effecteurs responsables de l'activation de mTORC1	12
Figure 6 : Effets de l'activation de mTORC1 sur ces cibles en aval et fonctions cellulaires associées	14
Figure 7 : Les 4 kinases de la RIS, activées par des stress différents, convergent vers le même point : la phosphorylation de eIF2 α et l'activation de ATF4	17
Figure 8 : Mécanisme d'activation de la kinase GCN2	19
Figure 9 : Transcription de gènes cibles par ATF4 pour répondre à la carence en AA	20
Figure 10 : Les différents types de transporteurs permettant l'absorption des molécules essentielles à la cellule	25
Figure 11 : Asymétrie de publication en fonction du nombre moyen de publication pour les principales familles de protéines connues chez les mammifères	26
Figure 12 : Transporteurs d'Acides Aminés impliqués dans l'absorption intestinale des AA	36
Figure 13 : Ensemble des TAA retrouvés à la membrane lysosomale permettant l'efflux d'AA	39
Figure 14 : Représentation des TAA mitochondriaux identifiés et de leur implication dans le métabolisme	42
Figure 15 : Représentation des principales voies de régulations transcriptionnelles des TAA	53
Figure 16 : Représentation des principales régulations post-traductionnelles des TAA membranaires	57
Figure 17 : Utilisation mondiale des produits issus de la pêche et de l'aquaculture	59
Figure 18 : Production mondiale d'animaux aquatiques par les secteurs de la pêche et de l'aquaculture	59
Figure 19 : Production française de truite arc-en-ciel de 1950 à 2022	60
Figure 20 : Evolution du prix des farines de poissons	61
Figure 21 : Inclusion (%) de diverses sources d'ingrédients dans le régime alimentaire des saumons norvégiens aquacoles	62
Figure 22 : Production mondiale de farines de poisson de 1990 à 2023 et projections estimées pour les 10 prochaines années	62
Figure 23 : Evènements de duplication au cours de l'évolution ayant conduit à un doublement théorique du nombre de gènes chez les téléostéens et un quadruplement pour les salmonidés	70
Figure 24 : Proportion des TAA étudiés/identifiés chez chaque espèce de téléostéens concernée	72

Figure 25 : Nombre de publications, pour chaque espèce de téléostéens, relatant d'un ou plusieurs TAA	72
Figure 26 : Représentation schématique des principales questions posées durant ce travail de thèse	80
Figure 27 : Distribution des propriétés des TAA selon les groupes de régulation identifiés	135
Figure 28 : Dérégulations des groupes de TAA par les carences spécifiques en un AA	137
Figure 29 : Dérégulation des TAA par l'excès d'AANE	140
Figure 30 : Induction de GCN2 par l'excès d'AANE	141
Figure 31 : Identité des TAA surexprimés par un excès d'AANE et regroupement selon leur groupe de régulation	141
Figure 32 : Dérégulation des TAA par la carence en AANE	143
Figure 33 : Induction de GCN2 par la carence en AANE	143
Figure 34 : Identité des TAA surexprimés par une carence en AANE et regroupement selon leur groupe de régulation	144
Figure 35 : Dépendance de l'expression de l'ARNm et de l'abondance protéique en présence d'AA et des sérum	146
Figure 36 : Réponse des TAA à un traitement à la rapamycine	150
Figure 37 : Motifs des éléments de réponse aux AA (ERAA) identifiés dans le génome de la TAC	152
Figure 38 : Réponses des paralogues d'ATF4 à un traitement à la rapamycine	153
Figure 39 : Régulation transcriptionnelle des TAA par le glucose	155
Figure 40 : Présence de l'élément de réponse aux glucides (ChORE) humain dans les régions promotrices des TAA de la TAC	157
Figure 41 : Représentation des quatre destinées possibles aux paralogues issues de la duplication du génome	158
Figure 42 : Arbre phylogénétique d'alignement des séquences protéiques des paralogues de slc1a2 et slc1a9 (gauche) et slc1a7 et slc1a8 (droite) chez la TAC et le poisson zèbre	162
Figure 43 : Identité protéique de la Leucine pocket de Sestrine 2 chez plusieurs espèces	165

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des acides aminés essentiels (AAE) et non essentiels (AANE) chez l'Homme	5
Tableau 2 : Classification de tous les TAA connus, à ce jour, chez les mammifères	28
Tableau 3 : Profils en AA (% de protéine totale) de différentes farines végétales communément utilisées comme aliment aquacole, comparativement au profil en AA des farines de poissons	63
Tableau 4 : Répertoire des TAA identifiés chez les poissons téléostéens, en comparaison au répertoire mammifère	71

LISTE DES ABREVIATIONS

4E-BP1 : eukaryotic initiation factor 4E-binding proteins 1

4f2hc : 4F2 cell surface antigen Heavy Chain

A : Anionique

AA : Acide Aminé

AAA : Acide Aminé Anionique

AAC : Acide Aminé Cationique

AACE : Acide Aminé Conditionnellement Essentiel

AAE : Acide Aminé Essentiel

AAF : Acide Aminé Fonctionnel

AAN : Acide Aminé Neutre

AANE : Acide Aminé Non Essentiel

AAR : Acide aminé Ramifié

ABC : ATP-Binding Cassette

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNr : Acide DésoxyriboNucléique ribosomale

ADP : Adénosine DiPhosphate

AGC1 : Aspartate Glutamate Carrier 1-2

AGT1 : aspartate/glutamate transporter 1

AKT : Protéine Kinase B

Ala : Alanine

ARE : Antioxydant Response Element

Arg : Arginine

ARN : Acid RiboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ARNt : Acide RiboNucléique de transfert

Asc-1-2 : alanine-serine-cysteine transporter 1-2

ASCT1-2 : Amino acid Sodium-Dependent Cotransporter 1-2

Asn : Asparagine

ASNS : Asparagine Synthétase

Asp : Aspartate

ATB⁰⁺ : Sodium- and chloride-dependent neutral and basic amino acid transporter B(0+)

ATF3-4 : Activating Transcription Factor 3-4

ATG13 : Autophagy-Related protein 13

ATP : Adénosine TriPhosphate

B⁰⁺AT : b(0,+)-type amino acid transporter

B⁰AT1-2-3 : Sodium-Dependent Neutral Amino Acid Transporter 1-2-3

bFGF : basic fibroblast growth factor

BGT1 : Betaine/Glycine Transporter 1

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

bZIP : basic-region leucine zipper

C : Cationique

c9orf72 : Chromosom 9 open reading frame 72

CAD : carbamoyl phosphate synthetase

Can1 : Arginine Permease 1

CASTOR1 : Cytosolic arginine sensor for mTORC1 subunit 1

CAT1-2-3-4 : Cationic amino acid transporter 1-2-3-4

ChIP-seq : Chromatin immunoprecipitation sequencing

CHOP : C/EBP Homologous Protein

ChORE : Carbohydrate Response element

ChREBP : Carbohydrate-responsive element-Binding Protein

Cit : Citrulline

CLEAR : Coordinated Lysosomal Expression And Regulation

CTNS : Cystinosin

Cys : Cystéine

D-AA : Acide Aminé Dextrogyre

EAAT1-2-3-4-5 : Excitatory Amino Acid Transporter 1-2-3-4-5

EAO : Espèce reactive de l'oxygène

egr-1 : Early growth response protein 1

eIF2 : eukaryotic translation initiation factor 2

eIF2B : eukaryotic translation initiation factor 2B

eIF2 α : alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2

eIF4A : eukaryotic translation initiation factor 4A

eIF4E : eukaryotic translation initiation factor 4E

eIF4F : eukaryotic translation initiation factor 4F

elk-1 : ETS-like transcription factor 1

ER : Elément de réponse

ERAA : Elément de Réponse aux Acides Aminés

ERK1-2 : Extracellular signal-regulated kinase 1-2

ETV7 : ETS Variant Transcription Factor 7

FBXO22 : F-box only protein 22

Fra : Fos-related antigen

FT : Facteur de Transcription
G6PD : Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase
GABA : Acide γ -AminoButyrique
GADD34 : Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein 34
Gat1-2-3 : GABA Amino acid Transporter 1-2-3
GATOR1-2 : GAP Activity Towards Rags 1-2
GC2 : Glutamate Carrier 1-2
GCN12-2-20 : General Control Non-derepressible 1-2-20
Gln : Glutamine
Glu : Glutamate
Gly : Glycine
GlyT1-2 : Glycine Transporter 1-2
Hif1 α : Hypoxia-Inducible Factor 1- α
His : Histidine
HisRS : l'histidyl-ARNt synthétase
HRI : heme-regulated eIF2 α kinase
IGFI-II : insulin like growth factor I-II
Ile : Isoleucine
L : Lysosome
L-15 : Leibovitz-15 medium
L-AA : Acide Aminé lévogyre
LAT1-2-3-4 : Large neutral amino acids transporter small subunit 1-2-3-4
Leu : Leucine
Lup1 : Lysine Permease 1
Lys : Lysine
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase 2
MCT7 : MonoCarboxylate Transporter 7
MEM : Minimal Essential Medium
Met : Méthionine
mLST8 : mammalian Lethal with SEC13 protein 8
MP : Membrane Plasmique
Mt : Mitochondrie
MTHFD2 : MethyleneTetraHydroFolate Dehydrogenase 2
mTOR : mechanistic Target Of Rapamycin
mTORC1-2-3 : mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1 - 2 - 3
MTS : Mitochondrial Targetign Sequence
Mup1 : Méthionine Permease 1
Myc : Myc proto-oncogene protein
N : Neutre

Nedd4-2 : Neural precursor cell-Expressed Developmentally down-regulated protein 4-2
NH $_4^+$: Ammonium
NO : Oxyde Nitrique
NRF2 : Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NTT4 : Neurotransmitter Transporter 4
Orn : Ornithine
Ornt1-2-3 : Ornithine transporter 1-2-3
PAT1-2-3-4 : Proton-coupled amino acid transporter 1-2-3-4
Pb : Paire de Base
PDCD4 : Programmed Cell Death 4
PEPCK : Phosphoenol-pyruvate carboxykinase
PERK : PKR-like ER kinase
PFKP : Phosphofructokinase, platelet type
PGC1 α : PPAR- γ coactivator 1 α
Phe : Phénylalanine
PI3K : Phospholinositide 3-Kinase
PKA-B-C : Protéine Kinase A-B-C
PKR : double-stranded RNA-dependent protein kinase
PPAR γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ
pqlc2 : proline-glutamine loop containing 2
Pro : Proline
PROT : Proline Transporter
Rag A-B-C-D : Ras-related GTP-binding protein A-B-C-D
Rag-GTPases : Ras-related GTP-binding protein
rBAT : related B⁰-Associated Transporter
RE : Réticulum Endoplasmique
REDD1 : Regulated in Development and DNA damage response 1
Rheb : Ras homologue enriched in brain
RICTOR : rapamycin-insensitive companion of mTOR
RIS : Réponse Intégrée au Stress
RP : Requered Protein
Rtdi-MI : Rainbow Trout distal intestine-Milano Italy
RTgutGC : Rainbow Trout gut Germany Canada
RTH-149 : Rainbow Trout Hepatoma-149
RTL-W1 : Rainbow Trout Liver-Waterloo 1

RTpi-MI : Rainbow Trout proximal intestine-
Milano Italy
S : Symport
S6K1 : p70 S6 kinase 1
SAH : S-adenosylhomocystéine
SAM : S-adenosylmethionine
SAMC : S-adenosylmethionine Carrier
SAMTOR : S-adenosylmethionine sensor
upstream of mTORC1
SAR1B : Secretion Associated Ras related
GTPase 1B
Ser : Sérine
SFXN1-2-3 : Sidéoflexine 1-2-3
shRNA : short hairpin RNA
SIRNA : Silencing RNA
SIT1 : Sodium-Independent Transporter 1
SNAT1-2-3-4-5-6-7-8-10 : Sodium-coupled
neutral amino acid symporter 1-2-3-4-5-6-7-8-
10
SREBP : Sterol Regulatory Element-Binding
Protein
T : unité de Traffic
TAA : Transporteurs d'Acide Aminé
TAAA : Transporteur d'Acide Aminé Anionique
TAAC : Transporteur d'Acide Aminé Cationique
TAAN : Transporteur d'Acide Aminé Neutre
TAC : Truite Arc-en-Ciel
TAT1 : T-type aromatique amini acide
transporter
Tat2 : Tryptophane Permease 2
TAUT : Taurine Transporter
TFEB/TFE3 : transcription factor EB/E3
TGF1 : transforming growth factor β 1
Thr : Thréonine
TRB3 : Tribbles homolog 3
Trp : Tryptophane
TSC : Tuberos Sclerosis Complex
Tyr : Tyrosine
U : Uniport
UBF : Upstream Binding Factor
ULK-1 : UNC-5-Like autophagy activating Kinase
uORF : short upstream Open Reading Frame
UV : Ultra-Violet
V : Vésicule

Val : Valine
V-ATPase : V-type proton ATPase
VGLUT1-2-3 : Vesicular glutamate transporter
1-2-3
VIAAT : Vesicular Inhibitory Amino Acid
Transport
WIPI2 : WD repeat domain Phosphoinositide-
Interacting protein 2
xCT : Cystine/glutamate transporter
XT2 : Ortholog of orphan transporter XT2
y⁺LAT1-2 : Y+L amino acid transporter 1-2
YY1 : yin-yang 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

PRELIMINAIRE

Cette thèse s'inscrit dans un contexte d'essor de l'aquaculture au niveau mondial, un secteur très prometteur pour garantir l'alimentation d'une population mondiale en constante augmentation. L'aquaculture fait cependant face à certaines limites contraignant sa pérennisation. L'une de ces limites s'inscrit notamment dans la recherche de nouveaux aliments aquacoles plus durables, en alternative aux farines et huiles de poisson aujourd'hui utilisées. Pour la truite arc-en-ciel (TAC, *Oncorhynchus mykiss*), première espèce de poisson élevée en France, une inclusion totale de ces nouveaux aliments, principalement végétaux, dans l'alimentation ne permet pas d'offrir des taux de croissances convenables des animaux, en partie à cause d'un déséquilibre en AA. La TAC étant carnivore, avec de forts besoins alimentaires en protéines, mieux comprendre le contrôle de l'homéostasie en ces nutriments pour cette espèce apparaît comme un premier pas vers l'amélioration de son régime alimentaire.

En plus de constituer les sous-unités des protéines, composants fondamentaux cellulaires, les AA possèdent de nombreux rôles aux niveaux métaboliques et signalétiques, les rendant ainsi cruciaux pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. Les AA doivent cependant atteindre le milieu intracellulaire pour effectuer l'ensemble de leurs fonctions et, comme ils ne peuvent pas diffuser librement à travers les membranes biologiques, ils sont dépendants de transporteurs : les Transporteurs d'Acides Aminés (TAA). Ces derniers, principalement décrits chez l'Homme, sont très nombreux et possèdent des propriétés de transport très diverses : l'homéostasie cellulaire des 20 AA protéinogènes est ainsi assurée par plus de 70 TAA différents chez l'Homme.

De manière à pouvoir s'adapter continuellement aux fluctuations environnementales, notamment nutritives, il est connu que, chez les mammifères, ces TAA peuvent être régulés aux niveaux transcriptionnel et post-traductionnel par de nombreux facteurs, notamment la disponibilité en AA.

Bien que certains TAA soient très étudiés dans le domaine médical, de par leur implication dans de nombreuses pathologies, les connaissances sur les TAA chez les poissons téléostéens restent faibles. En effet, peu de données existent quant à leur implication dans le

contrôle de l'homéostasie cellulaire des AA et leur régulation par les conditions nutritionnelles, principalement du fait qu'une majorité d'entre eux n'a encore jamais été identifiée, ni donc étudiée, chez les poissons.

Dans le but d'apporter de nouveaux éléments de réponse quant aux mécanismes contrôlant l'homéostasie de ces nutriments essentiels à la TAC, identifier leurs portes d'entrée au niveau cellulaire ainsi que la régulation de ces dernières par les conditions nutritives apparaît pertinent pour permettre l'amélioration des régimes alimentaires des animaux d'élevage.

I. Les acides aminés, nutriments essentiels à la cellule

A. Acides aminés : constituants des protéines

a. Généralités

Les Acides Aminés (AA), composés communs à tous les êtres vivants, des bactéries aux mammifères, sont définis comme des molécules organiques comportant un groupement amine ($-NH_2$) et un groupement carboxylique ($-COOH$)¹. Les AA constituent les unités de base des protéines : macromolécules constitutives du vivant. Les protéines possèdent de nombreuses fonctions biochimiques et biologiques et, du fait qu'elles constituent plus de la moitié de la masse sèche d'une cellule², sont considérées comme des composés fondamentaux des tissus des animaux^{1,3}. Parmi les fonctions biochimiques assurées par les protéines la catalyse enzymatique, la transduction de signal, la capacité à fixer d'autres molécules ainsi que leur rôle comme composant structurel des cellules et organismes⁴ illustrent leur rôle essentiel au bon fonctionnement de tout organisme vivant.

La définition stricte d'un AA englobe plus de 300 molécules différentes⁵, mais il n'existe en réalité que 20 AA qui entrent dans la constitution des protéines car possédant un codon ADN qui leur permet d'être incorporés aux protéines chez les eucaryotes⁴. Ces AA protéinogènes possèdent des propriétés physiques et chimiques différentes, et peuvent notamment être distingués selon leur charge, leur polarité ou encore leur conformation (Figure 1).

Bien que non protéinogènes, d'autres AA sont essentiels aux organismes vivants. C'est notamment le cas de la taurine, impliquée dans différents processus physiologiques^{6,7}, de l'ornithine et de la citrulline, qui interviennent dans le cycle de l'urée (référé plus tard, partie I.B.), de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) impliqué dans la neurotransmission⁸, ou encore de la sélénocystéine intervenant dans la composition des sélénoprotéines⁹.

Par leur conformation moléculaire, les AA sont des molécules chirales* possédant deux formes énantiomères : lévogyre (L-AA) et dextrogyre (D-AA). Bien que les deux formes de chaque AA soient retrouvées dans la nature, les L-AA sont physiologiquement dominants car

* Cela est vrai pour tous les AA protéinogènes hormis la glycine, petit AA avec pour chaîne latérale un seul atome d'hydrogène. La glycine est alors dite achirale et ne possède pas de forme lévogyre et dextrogyre.

ou encore du stade de développement considéré. Bien que les AANE soient considérés comme synthétisés en quantité suffisante par l'organisme pour couvrir ses besoins, leur nécessité biologique peut être modifiée selon le statut physiologique, les facteurs environnementaux ou le statut pathologique de l'organisme. Cela révèle alors l'existence d'AA conditionnellement essentiels (AACE) pour lesquels, sous certaines conditions, le taux d'utilisation par l'organisme est supérieur à leur taux de synthèse, nécessitant alors un apport extérieur pour couvrir les besoins¹².

Tableau 1: Classification des acides aminés essentiels (AAE) et non essentiels (AANE) chez l'Homme. Les acides aminés conditionnellement essentiels (AACE) sont représentés en violet. Adapté de Wu, 2013¹¹

AAE	AANE
Histidine	Alanine
Isoleucine	Asparagine
Leucine	Aspartate
Lysine	Sérine
Méthionine	Proline
Phénylalanine	<i>Arginine</i>
Thréonine	<i>Cystéine</i>
Tryptophane	<i>Glutamine</i>
Tyrosine	<i>Glutamate</i>
Valine	<i>Glycine</i>

Aujourd'hui, la distinction entre AAE et AANE se base principalement sur le maintien de la croissance et de l'équilibre azoté en cas de déficience d'un AA distinct : s'il y a maintien, alors l'AA n'est pas essentiel ; mais s'il y a diminution de ces facteurs, alors l'AA est considéré comme essentiel¹¹. Cette méthode de classification est cependant de plus en plus discutée car, à ce jour, aucune donnée expérimentale n'atteste que les AANE sont synthétisés en quantité suffisante par l'organisme pour assurer une croissance et une santé optimales¹³. De plus, bien que capables d'être synthétisés par l'organisme, les substrats de néosynthèse des

Comme illustré sur la Figure 3, la majorité des AA peuvent alimenter le cycle de Krebs et ainsi participer à la production d'énergie et au métabolisme cellulaire. Hormis la lysine et la leucine, tous les AA sont considérés comme glucoformateurs et peuvent participer à la formation de glucose *via* la néoglucogénèse. De plus, une partie des AA (Lys, Leu, Phe, Ile, Thr, Tyr, Trp), dits cétoformateurs, peuvent conduire à la formation de corps cétoniques, comme l'acétyl-CoA, qui intervient par la suite dans la biosynthèse des acides gras et cholestérols. Les AA occupent donc une fonction centrale dans le maintien du métabolisme cellulaire, ces multiples conversions permettant également d'offrir une forme de stockage de l'énergie fournie par les AA, *via* une conversion en molécules « stockables » sur le long terme.

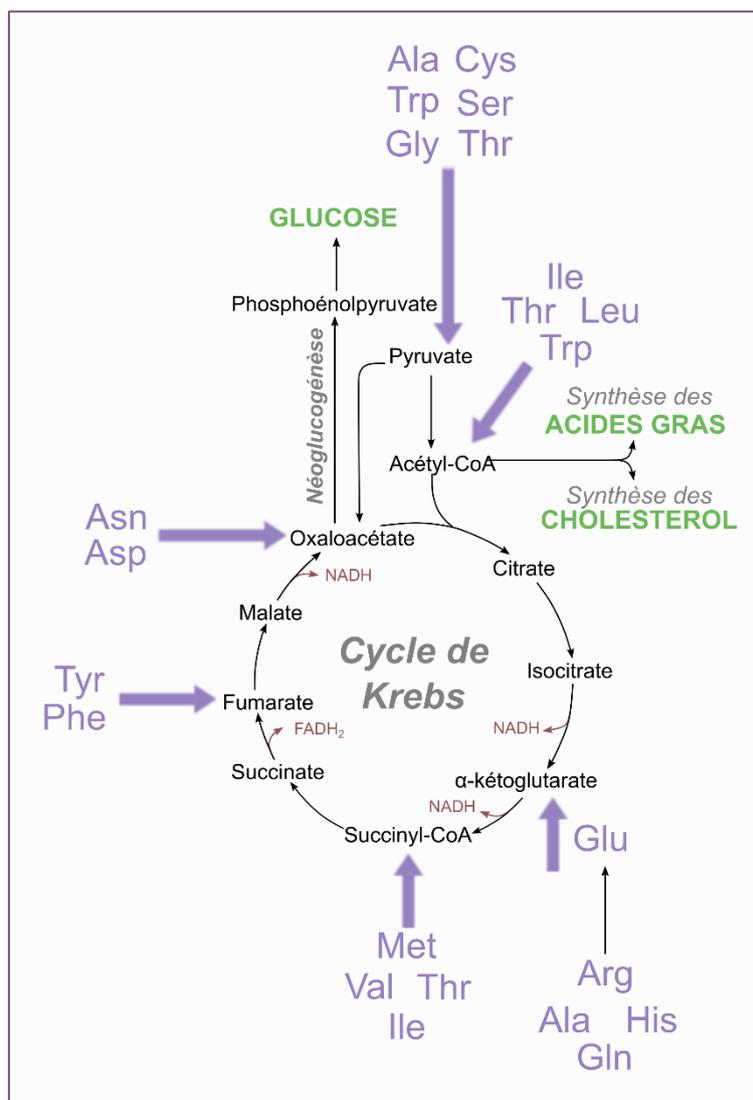


Figure 3 : Insertion de tous les AA protéinogènes dans le cycle de Krebs pour la production de glucose ou d'acides gras. NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide), FADH₂ (Flavine Adénine Dinucléotide), D'après Chandel, 2021¹⁴

Pour l'incorporation de leur chaîne carbonée dans le cycle de Krebs, les AA doivent être désaminés, entraînant la formation d'ion ammonium (NH₄⁺). Ce composé est toxique pour la

cellule et doit donc être soit incorporé à d'autres molécules et ainsi participer, par exemple, à la synthèse de nucléotides, soit être excrété par l'organisme, notamment sous la forme d'urée chez la majorité des vertébrés¹⁴. Cette dernière option est permise par le cycle de l'urée qui fait intervenir plusieurs AA tel que l'Arginine, mais aussi l'ornithine et la citrulline, deux AA non protéinogènes mais, ce faisant, cruciaux pour le métabolisme cellulaire. A noter que le cycle de l'urée et le cycle de Krebs sont reliés métaboliquement par un intermédiaire commun (le fumarate), permettant également une alimentation, certes moindre, du cycle de Krebs durant la transformation de l'ammonium en urée¹⁴.

Enfin, bien qu'il soit difficile d'offrir une liste exhaustive de toutes les implications des AA dans le métabolisme cellulaire, de nombreux autres cas spécifiques existent ; citons en exemples l'implication de l'arginine dans la production d'oxyde nitrique (NO), espèce réactive de l'oxygène (EAO) impliqué dans la relaxation musculaire^{14,15}, le rôle de la méthionine dans la méthylation de l'ADN¹⁶, ou encore l'implication de la cystéine, glycine et glutamate pour la formation de glutathion, tripeptide possédant un rôle crucial dans la protection antioxydante des cellules¹⁷.

Tous ces éléments illustrant l'insertion des AA dans le métabolisme cellulaire démontrent leur versatilité et leur rôle central dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. En plus de former les protéines constitutives de l'organisme, ils participent à son métabolisme et soutiennent alors l'anabolisme et la croissance de l'organisme. Cependant, un autre rôle, tout aussi primordial, est également assuré par les AA : leur capacité de molécule signal. Par cette fonction, les AA régulent diverses fonctions biologiques¹⁸ et participent ainsi, d'une autre manière, au maintien de l'homéostasie cellulaire.

C. Rôles fonctionnels des acides aminés dans la signalisation cellulaire

La signalisation cellulaire est un processus par lequel un stimulus sera ressenti par la cellule et sera converti, par une série de réactions biochimiques, en une réponse spécifique assurant une fonction cellulaire comme la croissance ou la survie¹⁹. Par le biais de toutes ces voies de signalisation, la cellule peut alors détecter les changements dans son environnement et s'y adapter continuellement. Les stimuli ressentis sont nombreux. Parmi eux, les AA jouent un rôle important : leur disponibilité est, comme illustré précédemment, essentielle à la survie et

à la croissance cellulaire. Deux voies signalétiques existent pour permettre à la cellule de répondre à la disponibilité en AA : la voie mTOR (*mechanistic Target of Rapamycin*), qui ressentira leur présence pour promouvoir l'anabolisme cellulaire et la voie GCN2 (*General Control Non-derepressible 2*) qui ressentira l'absence d'AA et permettra à la cellule de s'adapter au stress lié à la carence en favorisant les processus cataboliques.

a. Implications des AA dans la signalisation mTOR

La voie de signalisation mTOR est un régulateur majeur de l'homéostasie cellulaire par sa capacité à reconnaître et intégrer un grand nombre de signaux intrinsèques et extrinsèques, dans le but de maintenir et ordonner le métabolisme cellulaire²⁰. Le pivot central de cette signalisation est une protéine de type Sérine/Thréonine kinase appelée mTOR. De manière succincte, cette voie ressent de nombreux paramètres cellulaires convergeant tous vers mTOR, qui ordonnera par la suite un ensemble de réponses en lien avec ces informations de manière à promouvoir l'anabolisme cellulaire. En interagissant avec de multiples partenaires, mTOR s'organise en réalité sous forme de deux complexes protéiques qui se distinguent par la présence de certains partenaires spécifiques. Ainsi, il est possible de distinguer les complexes mTORC1 (*mechanistic Target of Rapamycin Complex 1*) et mTORC2 (*mechanistic Target of Rapamycin Complex 2*)²¹.

Organisation et fonctions des complexes mTORC1 et mTORC2

Bien que constitués de la même protéine de base, mTOR, ces deux complexes constitués de différents partenaires possèdent des modes de régulation et des rôles biologiques distincts. De manière générale, est associé à mTORC1 le contrôle de l'anabolisme cellulaire par l'activation de la production de protéines, lipides et nucléotides et par la répression des processus cataboliques comme l'autophagie ; alors qu'à mTORC2 est plus généralement associé le contrôle de la survie cellulaire et du cytosquelette²². mTORC1 et mTORC2 possèdent respectivement 4 et 5 partenaires, dont deux communs, qui assurent leur stabilisation, leur localisation ainsi que le contrôle de leur activité de kinase²⁰ (Figure 4).

mTOR a été découvert par le biais de son inhibiteur : la rapamycine. Lorsque des cellules étaient exposées à celle-ci, un arrêt de la croissance était observé. L'étude du mode d'action de la rapamycine a alors mis en évidence la voie mTOR. Cependant, la rapamycine

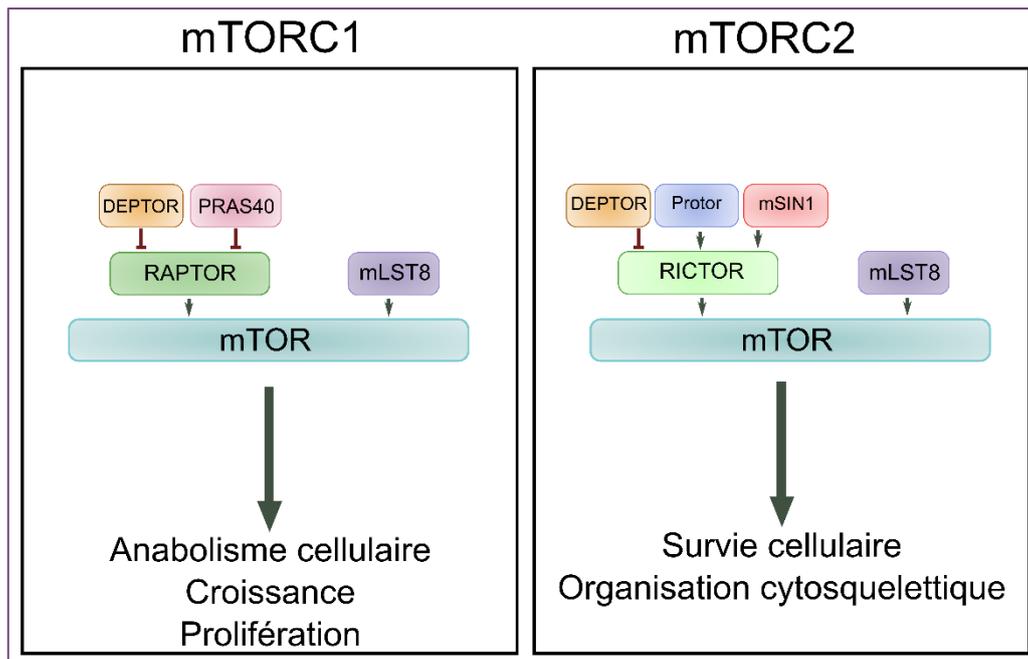


Figure 4 : Organisation des complexes mTORC1 et mTORC2 avec leurs différents partenaires et les fonctions globales de chaque complexe. Les flèches indiquent une action positive; les flèche barrées une action négative. DEPTOR (DEP domain-containing mTOR-interacting protein), PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40 kDa), RAPTOR (Regulatory-associated protein of mTOR), mLST8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8), mSIN1 (mammalian stress-activated MAP kinase-interacting protein 1), RICTOR (rapamycin-insensitive companion of mTOR), Protor (Proline-rich protein 5)

n'est effective que sur mTORC1, mTORC2 y étant relativement insensible*. Etant donné que la délétion de la plupart des protéines de chaque complexe est létale, notamment celle de mLST8, cruciale pour l'interaction entre RICTOR et mTOR dans le complexe de mTORC2²⁴, l'étude du rôle et des modes de régulation de mTORC2 reste plus difficile que pour mTORC1. C'est en partie pour cela qu'aujourd'hui les mécanismes propres à mTORC1 sont bien mieux décrits que ceux de mTORC2.

Aujourd'hui, seul mTORC1 a été démontré comme ressentant les AA et ordonnant une réponse spécifique en leur présence. Ainsi, nous ne nous intéressons qu'à ce complexe et non à mTORC2*.

* A noter tout de même qu'un effet inhibiteur de la rapamycine sur l'activation de mTORC2 peut être observé, mais cela ne s'applique qu'avec des temps d'exposition longs et des concentrations modérées²³.

* On note aujourd'hui l'émergence d'un potentiel troisième complexe de mTOR, mTORC3, qui serait lui aussi insensible à la rapamycine et posséderait des partenaires différents à mTORC1 et mTORC2. Hormis ETV7 (ETS Variant Transcription Factor 7), décrit comme un constituant essentiel et spécifique à mTORC3, les partenaires de ce nouveau complexe restent pour aujourd'hui encore inconnus. Ces cibles finales seraient cependant relativement similaires à celles de mTORC1 et mTORC2²³.

Mécanismes d'activation de mTORC1

Pour maintenir et ordonner le métabolisme et l'homéostasie cellulaire, mTORC1 a la capacité de ressentir un grand nombre de signaux cellulaires. Les principaux signaux ressentis par ce complexe, et qui entraîneront son activation, sont les facteurs de croissance, le statut énergétique, la présence d'oxygène, de glucose et, bien sûr, les AA. Les mécanismes de détection de ces facteurs sont nombreux mais convergent tous vers deux mécanismes d'activation complémentaires de mTORC1 : l'axe du *Tuberous Sclerosis Complex* (TSC), dont la phosphorylation en présence d'oxygène, de glucose, de facteurs de croissance et d'un statut énergétique favorable entraîne l'inhibition de ce complexe et permet l'activation de mTORC1 ; et par l'axe des complexes protéiques impliquant les Rag-GTPase (*Ras-related GTP-binding protein*), où la présence d'AA permettra le recrutement de mTORC1 à la membrane lysosomale et son activation^{20,21} (Figure 5). A noter que pour une activation optimale de mTORC1, tous les stimuli ressentis doivent être présents et que les relations avec deux partenaires lysosomaux sont obligatoires : Rheb (*Ras homologue enriched in brain*) et la V-ATPase (V-type proton ATPase)^{21,25}

Les effecteurs qui transmettent l'information de la présence d'AA à mTORC1 sont identifiés depuis peu et il semblerait que d'autres restent encore à découvrir²³. Parmi les détecteurs d'AA cytosoliques connus aujourd'hui, les mieux décrits sont CASTOR 1 (*Cytosolic arginine sensor for mTORC1 subunit 1*), détecteur d'arginine et Sestrine 2, détecteur de leucine. Lorsque l'AA en question se fixe à son effecteur, cela entraîne la perte d'interaction entre ce dernier et le complexe protéique GATOR2 (*GAP Activity Towards Rags 2*)²¹. Cela empêchera GATOR2 de réprimer le complexe GATOR1 (*GAP Activity Towards Rags 1*) qui, lui, par son activité de protéine activant les GTPases pourra, en association avec Ragulator, activer les hétérodimères de Rags (Rag A/B et Rag C/D) ancrés à la membrane lysosomale et chargés du recrutement de mTORC1 pour son activation²².

Un autre détecteur relativement bien décrit est SAMTOR (*S-adenosylmethionine sensor upstream of mTORC1*) qui, lui, ressent la S-adenosylmethionine (SAM), un métabolite secondaire de la méthionine. SAMTOR interagit quant à lui avec GATOR1 qu'il inhibe en absence de SAM. En se liant à SAMTOR, la SAM abolit cette interaction avec GATOR1 et permet l'activation de mTORC1^{23,26}. Enfin, il semblerait que la glutamine puisse également être ressentie par mTORC1, bien que les mécanismes sous-jacents restent encore à clarifier.

La présence de glutamine activerait mTORC1 de manière Rags dépendante à travers la glutaminolyse et la production d' α -kétoglutarate, intermédiaire activant mTORC1²⁷, mais des mécanismes d'activation Rags-indépendants ont également été reportés²⁶.

En plus de ces détecteurs cytosoliques, d'autres effecteurs sensibles aux AA et retrouvés à la membrane lysosomale sont nécessaires à l'activation de mTORC1 : les transporteurs d'AA (TAA). Cet aspect de l'activation de mTORC1 sera plus amplement étayé dans la Partie II.C.

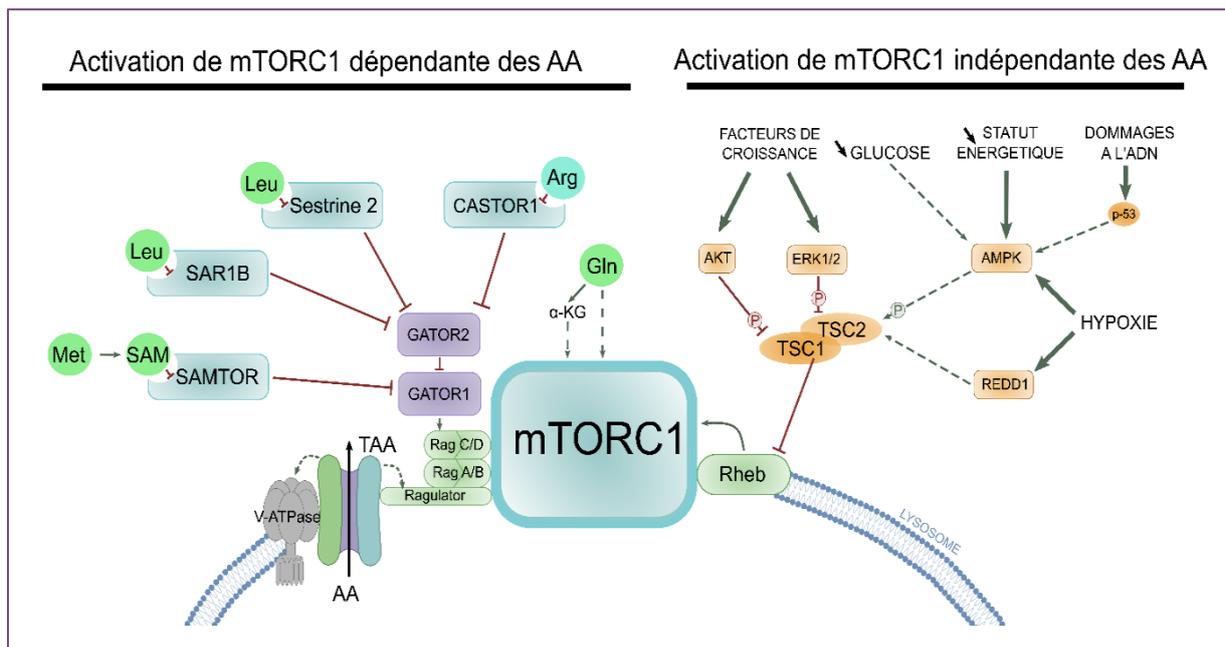


Figure 5 : Facteurs et effecteurs responsables de l'activation de mTORC1 ; avec différenciation de l'activation de mTORC1 dépendante, ou non, des AA. Les flèches rouges barrées désignent une action d'inhibition, les flèches vertes une action de stimulation. TAA : transporteur d'acide aminé ; AKT : Protéine Kinase B ; ERK1/2 : Extracellular signal-regulated kinase 1/2 ; AMPK : Adénosine MonoPhosphate -activated protein kinase ; p-53 : protéine 53 kDa ; REDD1 : Regulated in development and DNA damage response 1.

Une question intéressante se pose du fait qu'en l'état des connaissances actuelles, la signalisation mTOR ne ressentirait finalement que 4 des 20 AA protéinogènes, dont 3 des 11 pourtant essentiels et 2 de façon indirecte. Etant donné la récente découverte des effecteurs précédemment cités, il se pourrait que de nouveaux détecteurs d'AA soient décrits dans les prochaines années. Un détecteur de leucine cytosolique a, d'ailleurs, été identifié il y a peu de temps : SAR1B (*Secretion Associated Ras related GTPase 1B*), dont le fonctionnement apparaît relativement similaire à Sestrine 2 mais de manière beaucoup plus affine²⁸. De même, il a été démontré que Sestrine 2 pouvait aussi reconnaître la méthionine et l'isoleucine, bien que cette reconnaissance demande des concentrations 10 et 25 fois plus fortes que la leucine, respectivement, chez les mammifères²⁹.

Lorsque tous les éléments permettant l'activation de mTORC1 sont présents, ce dernier ordonnera alors la réponse d'une condition cellulaire optimale, permettant un anabolisme actif. Pour le permettre et sous condition d'activation, mTORC1 possède alors de nombreux effecteurs en aval pour orchestrer la réponse cellulaire.

Réponse ordonnée sous l'activation de mTORC1

Pour garantir l'anabolisme cellulaire, mTORC1 contrôle et active 3 procédés majeurs : la synthèse protéique, l'accumulation de biomasse (*via* la stimulation de la synthèse de lipides, nucléotides, glucose et le maintien de l'homéostasie énergétique), et la répression des processus cataboliques comme l'autophagie (Figure 6)²².

La synthèse protéique représente l'un des mécanismes assurant l'anabolisme cellulaire le plus énergivore³⁰ et mTORC1 régule donc finement ce processus en réponse aux stimuli ressentis. Le contrôle de la synthèse protéique par mTORC1 passe par deux cibles de phosphorylation principales : 4E-BP1 (*eukaryotic initiation factor 4E-binding proteins 1*) et S6K1 (*p70 S6 kinase 1*). La phosphorylation de 4E-BP1 par mTORC1 permettra son inhibition et la libération de eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*), un composant essentiel du complexe protéique de liaison cap-dépendante eIF4F (*eukaryotic translation initiation factor 4F*). Cette libération permettra alors de promouvoir la traduction protéique globale cap-dépendante²². La phosphorylation d'une deuxième cible de mTORC1, S6K1, entraînera une stimulation de son activité de kinase et promouvra la phosphorylation de la protéine ribosomale S6. S6 est un composant de la sous-unité ribosomale 40S, sa phosphorylation activant également de cette manière la traduction et la biogénèse protéique. De plus, la phosphorylation de S6K1 permet la stimulation de la biogénèse ribosomale *via* la phosphorylation du facteur de transcription de l'ADNr UBF (*Upstream Binding Factor*)³¹. Enfin, S6K1 participe également au maintien de la traduction protéique cap-dépendante en activant eIF2B (*eukaryotic translation initiation factor 2B*) et en induisant la dégradation de PDCD4 (*Programmed Cell Death 4*), un inhibiteur de eIF4A (*eukaryotic translation initiation factor 4A*)²².

Pour promouvoir l'accumulation de biomasse nécessaire en conditions anaboliques, mTORC1 stimulera la biosynthèse lipidique, nucléotidique et soutiendra également le métabolisme énergétique en favorisant la glycolyse et en soutenant la biosynthèse mitochondriale³¹. La biosynthèse lipidique étant cruciale pour la formation et l'expansion des

membranes biologiques, l'activation de mTORC1 entraînera une stimulation de deux facteurs de transcription clés pour la biogénèse lipidique : SREBP (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein*) et PPAR γ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ*)²¹. Pour fournir les composants nécessaires à la réplication de l'ADN et à la biogénèse ribosomale, il a aussi été démontré que mTORC1 promeut la synthèse de purines et de pyrimidines pour la formation de nucléotides, notamment *via* l'activation de la transcription de plusieurs enzymes clés dans cette voie, comme la MTHFD2 (*MethyleneTetraHydroFolate Dehydrogenase 2*) et la CAD (*carbamoyl phosphate synthetase*). L'activation de mTORC1 stimulera également la production d'énergie par l'utilisation du glucose par la glycolyse, pour, d'une part produire de l'énergie et, d'autre part rendre disponible les corps carbonés nécessaires à la biosynthèse de lipides et de nucléotides. Cette stimulation de la glycolyse en conditions d'activation est notamment permise par l'activation du facteur de transcription HIF1 α (*Hypoxia-Inducible Factor 1- α*) qui entraînera la transcription d'enzymes clés de la glycolyse comme G6PD (*Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase*) ou PFKP (*Phosphofructokinase, platelet type*)^{22,32}, mais également de transporteurs de glucose pour favoriser son entrée dans la cellule³¹. Enfin, par

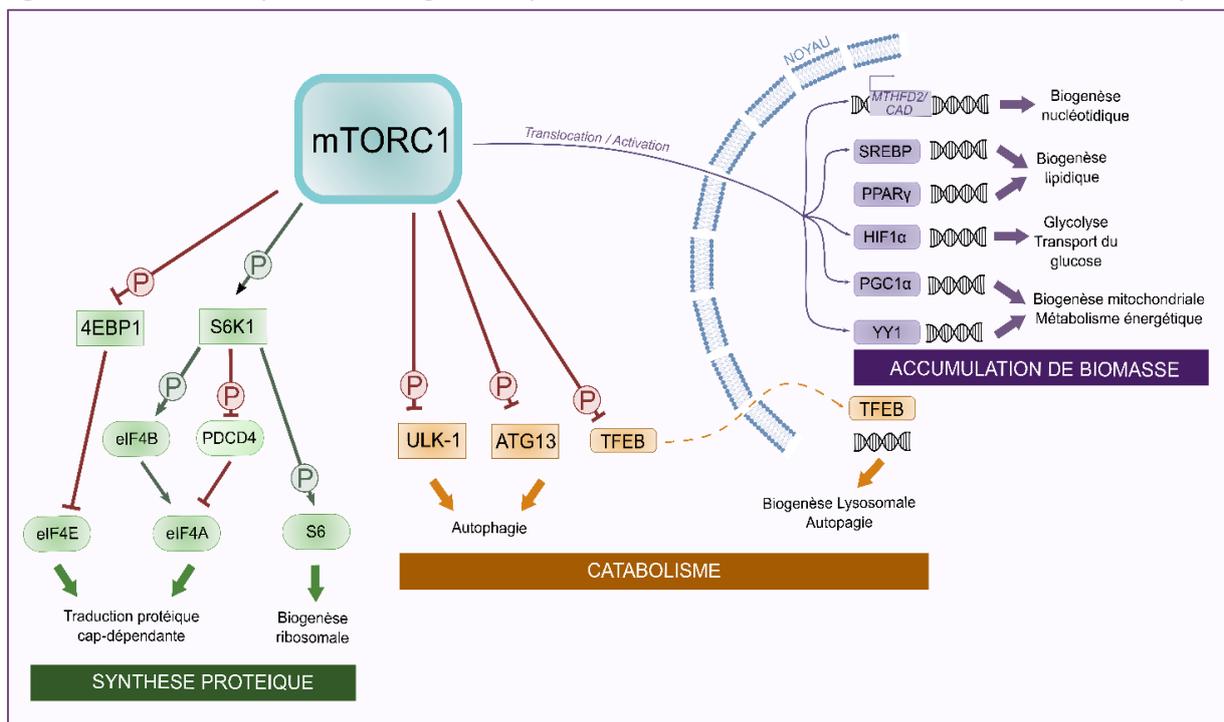


Figure 6 : Effets de l'activation de mTORC1 sur ces cibles en aval et fonctions cellulaires associées. Les flèches vertes indiquent un effet stimulateur, les flèches rouges barrées un effet inhibiteur.

l'activation des facteurs de transcription PGC1 α (*PPAR- γ coactivator 1 α*) et YY1 (*yin-yang 1*), mTORC1 contrôlera aussi la biogénèse mitochondriale et le métabolisme énergétique³³.

Enfin, cet anabolisme cellulaire induit sous l'activation de mTORC1 s'accompagne d'une répression des processus cataboliques et, notamment, de l'autophagie, dans le but d'éviter un cycle futile de dégradation des composés néosynthétisés²². Ce processus permet la dégradation des composants cellulaires anciens ou endommagés (dont les organites) afin de recycler leurs constituants et les rendre à nouveau disponibles pour la cellule. Comme l'activation de mTORC1 est la conséquence de conditions cellulaires favorables à l'anabolisme, les processus autophagiques ne sont donc pas nécessaires à stimuler pour maintenir l'homéostasie cellulaire. mTORC1 réprimera cette voie *via*, notamment, la phosphorylation de ULK-1 (*UNC-5-Like autophagy activating Kinase*) et de ATG13 (*Autophagy-Related protein 13*), les rendant ainsi inactifs et stoppant alors la biogénèse des autophagosomes³⁴. mTORC1 réprimera également d'autres cibles de l'autophagie intervenant dans l'élongation et la maturation des autophagosomes, comme par exemple en phosphorylant WIPI2 (*WD repeat domain Phosphoinositide-Interacting protein 2*). Finalement, mTORC1 possède un point de contrôle sur les processus cataboliques *via* la répression de TFEB/TFE3 (*transcription factor EB/E3*), facteur de transcription promouvant l'expression de nombreux gènes relatifs à la biogénèse lysosomale, à l'autophagie et aux processus cataboliques³⁵. Evidemment, en condition de carence nutritive et de désactivation de mTORC1, sa délocalisation du lysosome entraînera une déphosphorylation de ces cibles et donc une activation de l'autophagie et une inhibition des processus anaboliques.

En ressentant l'ensemble des facteurs énergétiques et nutritifs cellulaires, mTORC1 contrôle donc la balance entre anabolisme et catabolisme et promeut, lors de son activation, une croissance cellulaire accrue, et ce, en grande partie, *via* la signalisation liée aux AA. Ainsi, en plus de leur participation à la formation des protéines et au maintien du métabolisme cellulaire, les AA, par leur présence, contrôlent de nombreux points de l'homéostasie globale de la cellule.

b. Activation de la voie GCN2 par les acides aminés

Comme illustré précédemment, la présence d'AA est cruciale pour de nombreux processus cellulaires. Leur absence ou même leur diminution intracellulaire constitue donc un stress pour la cellule et une perturbation de l'homéostasie. Il est donc primordial pour une cellule de pouvoir apprécier son pool intracellulaire d'AA. Ainsi, contrairement à la voie mTOR activée

par la présence d'AA, la voie signalétique GCN2 ressent l'absence d'AA et permet la mise en place de mécanismes afin que la cellule puisse s'adapter à cette carence.

La Réponse intégrée au stress

GCN2 intervient dans une voie signalétique plus large nommée la Réponse Intégrée au Stress (RIS)³⁶, constituée de 4 kinases différentes (Figure 7). Bien que conservant des domaines kinases homologues, ces 4 effecteurs possèdent des domaines de régulation bien distincts et permettent de répondre spécifiquement à des stress différents³⁷. La RIS est ainsi constituée de GCN2, qui répond à la carence en AA, mais également de PKR (*double-stranded RNA-dependent protein kinase*) répondant à l'infection virale, de PERK (*PKR-like ER kinase*) répondant au stress du réticulum endoplasmique, et de HRI (*heme-regulated eIF2 α kinase*) répondant à la carence en hème (Figure 7).

Lorsque ces 4 kinases ressentent leur stress associé, elles s'homodimérisent et s'auto-phosphorylent, induisant leur activation et celle de la RIS qui, elle, converge en un seul et même point : la phosphorylation de eIF2 α (*alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2*) ; principal régulateur du complexe eIF2 chargé d'initier la traduction des protéines via la reconnaissance du codon « Start » des ARNm³⁶. Cette phosphorylation de eIF2 α engendre une inactivation du complexe eIF2, inhibant ainsi la traduction cap-dépendante des protéines. Cet arrêt de la traduction globale permet de conserver l'énergie cellulaire pour des fonctions essentielles et ainsi promouvoir la survie en condition de stress³⁸.

En parallèle de cette inhibition de la traduction protéique globale, la phosphorylation de eIF2 α permet la traduction d'ARNm spécifiques comportant une uORF (*short upstream Open Reading Frame*)³⁷ dont la traduction ne nécessite pas une reconnaissance par le complexe eIF2 ; elle est basée sur une réinitialisation continue ou sur un recrutement direct des ribosomes au site de traduction³⁶. La traduction de ces gènes spécifiques permettra à la cellule de faire face à cette situation de stress ; l'un des effecteurs majeurs induits lors de cette réponse est le facteur de transcription ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*), qui ira par la suite induire la transcription de gènes cibles (Figure 7).

Une idée intéressante est que, bien qu'ils ressentent 4 stress bien distincts, les effecteurs de la RIS convergent tous vers un même point avec la phosphorylation de eIF2 α et l'induction de ATF4. Malgré cela, en fonction de l'effecteur activé, une réponse spécifique est observée

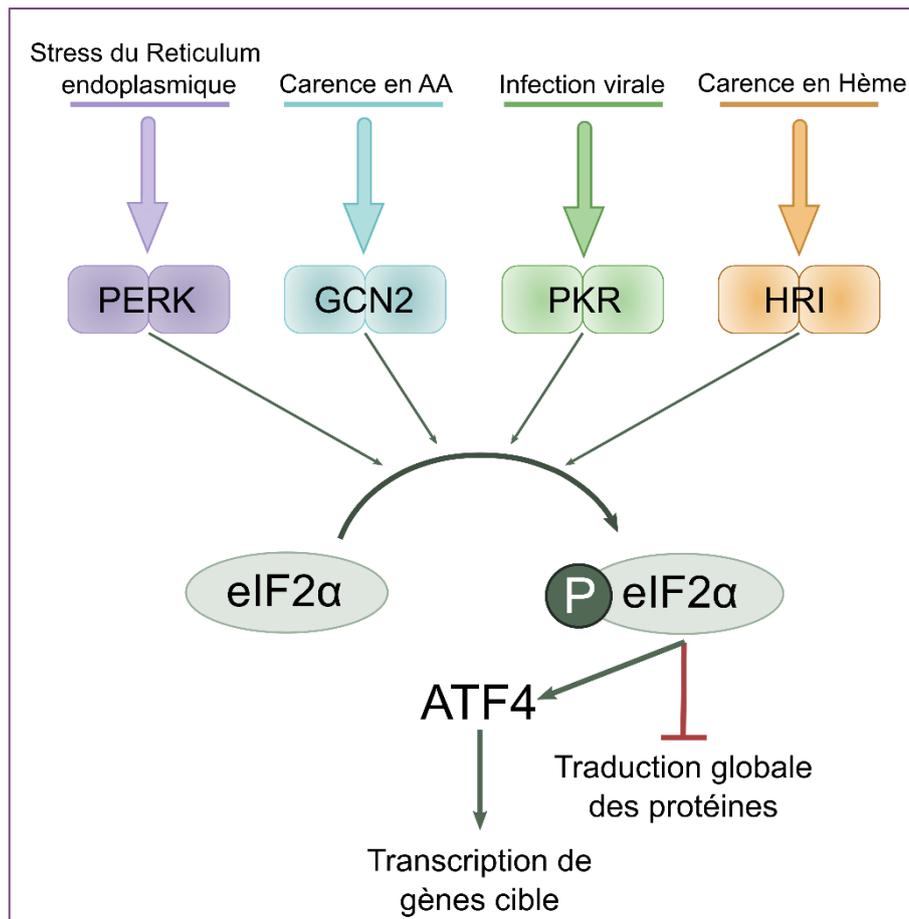


Figure 7 : Les 4 kinases de la RIS, activées par des stress différents, convergent vers le même point : la phosphorylation de eIF2α et l'activation de ATF4. Les flèches vertes indiquent une action positive, la flèche rouge barrée une action d'inhibition.

selon le stress occasionné : rétablir l'homéostasie lors d'une infection virale ne demande effectivement pas les mêmes ajustements que répondre à une carence en AA. Plusieurs hypothèses ont alors été avancées pour expliquer cette sélectivité de réponse, malgré une activation commune de la RIS. L'une des principales explications est que ATF4 induit la transcription génique en formant un dimère, soit avec lui-même, soit en s'associant à d'autres facteurs de transcription. Bien que plus d'une centaine de partenaires potentiels pour ATF4 existe³⁹, une vingtaine a aujourd'hui été réellement décrite³⁶. Le choix de partenaire de dimérisation d'ATF4 permet alors d'obtenir une réponse spécifique du stress occasionné^{36,40,41}. Cette réponse spécifique serait également favorisée par d'autres mécanismes, par exemple la traduction préférentielle des ARNm majoritairement transcrits sous un stress distinct, ou encore la présence de promoteurs et d'épissage de l'ARNm alternatifs en fonction du stress activant la RIS⁴².

Bien que les 4 effecteurs de la RIS ordonnent des réponses spécifiques selon le stress ressenti, ils partagent tout de même des fonctions communes et peuvent alors agir en coopération dans certains cas³⁶. Par exemple, GCN2 et PERK ont été démontrés comme coopérant avec PKR en réponse à une infection virale^{43,44}. De plus, des exemples de « remplacement » ont été démontrés lorsque l'un des effecteurs était désactivé : par exemple la désactivation de GCN2 entraînera une suractivation de PERK⁴⁵ et *vice versa*^{46,47}.

Activation de GCN2 en condition de carence en AA

Comme évoqué précédemment, l'activation de la RIS *via* GCN2 prend place lors d'une carence en AA. Le mécanisme de détection de la carence se fait principalement par le ressenti de l'accumulation des ARNt non chargés par GCN2, traduisant un manque en AA nécessaires à la synthèse protéique^{36,48,49}. Ces ARNt non chargés interagissent alors avec un domaine spécifique de GCN2 : le domaine relatif à l'histidyl-ARNt synthétase (HisRS), engendrant une homodimérisation et un changement conformationnel de la kinase, qui permet son autophosphorylation et la rend ainsi active⁵⁰ (Figure 8). Tous les ARNt non chargés peuvent être ressentis par GCN2^{48,51}. Cependant, les ARNt spécifiques aux AAE sont principalement décrits pour se lier à GCN2, comme l'ARNt^{His}, l'ARNt^{Lys}, l'ARNt^{Val} ou encore l'ARNt^{Trp}⁵².

Bien que la reconnaissance de l'accumulation des ARNt non chargés soit le mécanisme principal et majoritairement décrit pour l'activation de GCN2 en carence, d'autres effecteurs sont impliqués. Une autre kinase homologue à GCN2, GCN1 (*General Control Non-derepressible 1*) est en effet cruciale pour l'activation de GCN2 par les ARNt car elle permettrait leur recrutement et leur transfert vers l'HisRS^{48,49}. Une autre kinase homologue, GCN20 (*General Control Non-derepressible 20*), aurait également une implication dans l'activation de GCN2 par les ARNt. Cependant sa présence n'a pas encore été démontrée chez les vertébrés où aucun homologue n'a, à ce jour, été identifié⁴⁹ *. En plus de GCN1 et GCN20, de nouveaux éléments démontrent l'implication des ribosomes dans l'activation de GCN2. Il a en effet été démontré *in vitro* que la liaison de GCN2 aux ribosomes (sur le domaine nommé « *P-stalk* ») permettait son activation de manière indépendante de la présence d'ARNt non chargés⁵³. Malgré l'action majeure et principale des ARNt non chargés sur l'activation de

* La majorité des données sur l'activation de GCN2 sont obtenues chez la levure. Les homologues sont, par la suite, retrouvés chez les modèles mammifères (principalement).

GCN2, il apparaît alors que d'autres effecteurs sont impliqués dans ce processus. Toutefois, leurs modes d'actions ainsi que leurs régulations restent encore à éclaircir⁴⁹.

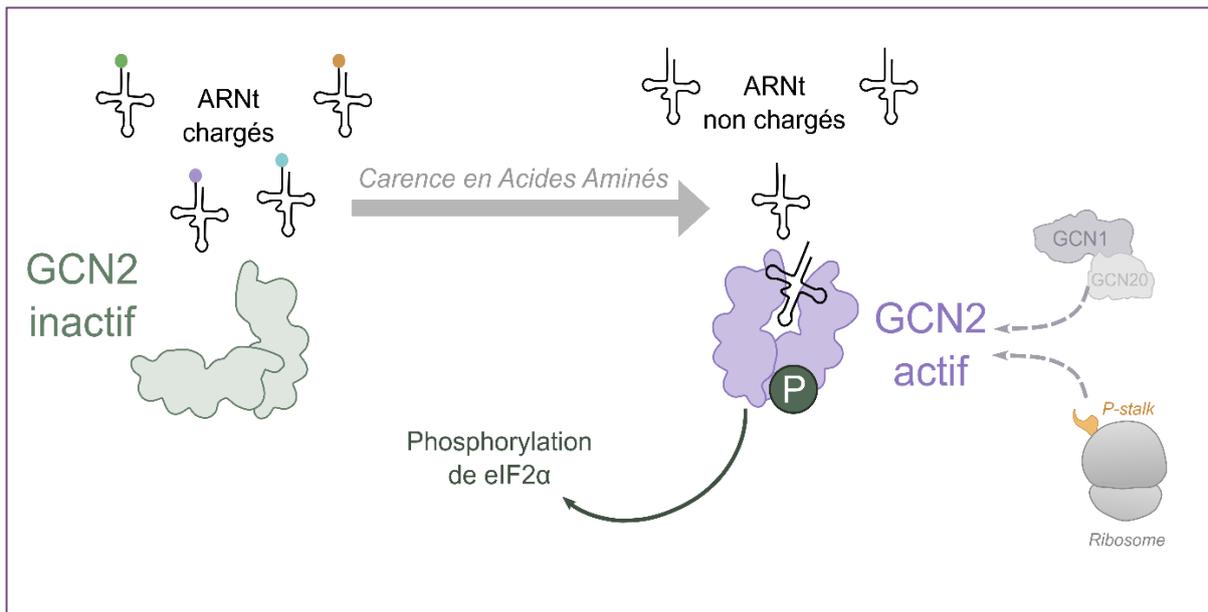


Figure 8 : Mécanisme d'activation de la kinase GCN2 ; par la présence des ARNt non chargés, ainsi que de ses deux autres effecteurs.

Les AA sont les activateurs principaux de GCN2. Il a cependant pu être démontré que d'autres facteurs pouvaient activer cette voie, par exemple les radiations UV, l'augmentation de la salinité ou une déficience en glucose^{36,54}. Bien que ces facteurs induisent la phosphorylation de eIF2α, il se pourrait que cela soit lié à des facteurs indirects associés à la consommation d'AA : une consommation rapide de l'arginine pour la synthèse d'oxyde nitrique sous radiation UV³⁶, une consommation d'AA comme source d'énergie pendant une déficience en glucose⁵⁴, une perturbation du transport des AA lors d'une élévation de la salinité (référé plus tard, partie II.B.).

Transcription de gènes cibles

L'acteur clé qui ordonnera la réponse de l'activation de la RIS est l'induction du facteur de transcription ATF4. ATF4 fait partie des facteurs de transcription dits à « *basic-region leucine zipper* » (bZIP) : la région basique permet l'interaction avec l'ADN et le domaine « *Leucine Zipper* » l'interaction avec d'autres partenaires afin de former un homodimère ou un hétérodimère^{55,56}. Comme tout facteur de transcription, ATF4 reconnaîtra et interagira avec une région spécifique de l'ADN afin d'induire la transcription du gène cible. Cette région spécifique, nommée élément de réponse aux AA (ERAA, ou élément de réponse C/EBP-ATF)⁵⁷ a été premièrement décrite comme déterminante à la surexpression du gène CHOP (*C/EBP*

Homologous Protein) dépendante de la carence en AA⁵⁸, avant même que le lien avec GCN2 et ATF4 ne soit établi^{59–61}. Cette région spécifique reconnue par ATF4 et sur laquelle il se fixera

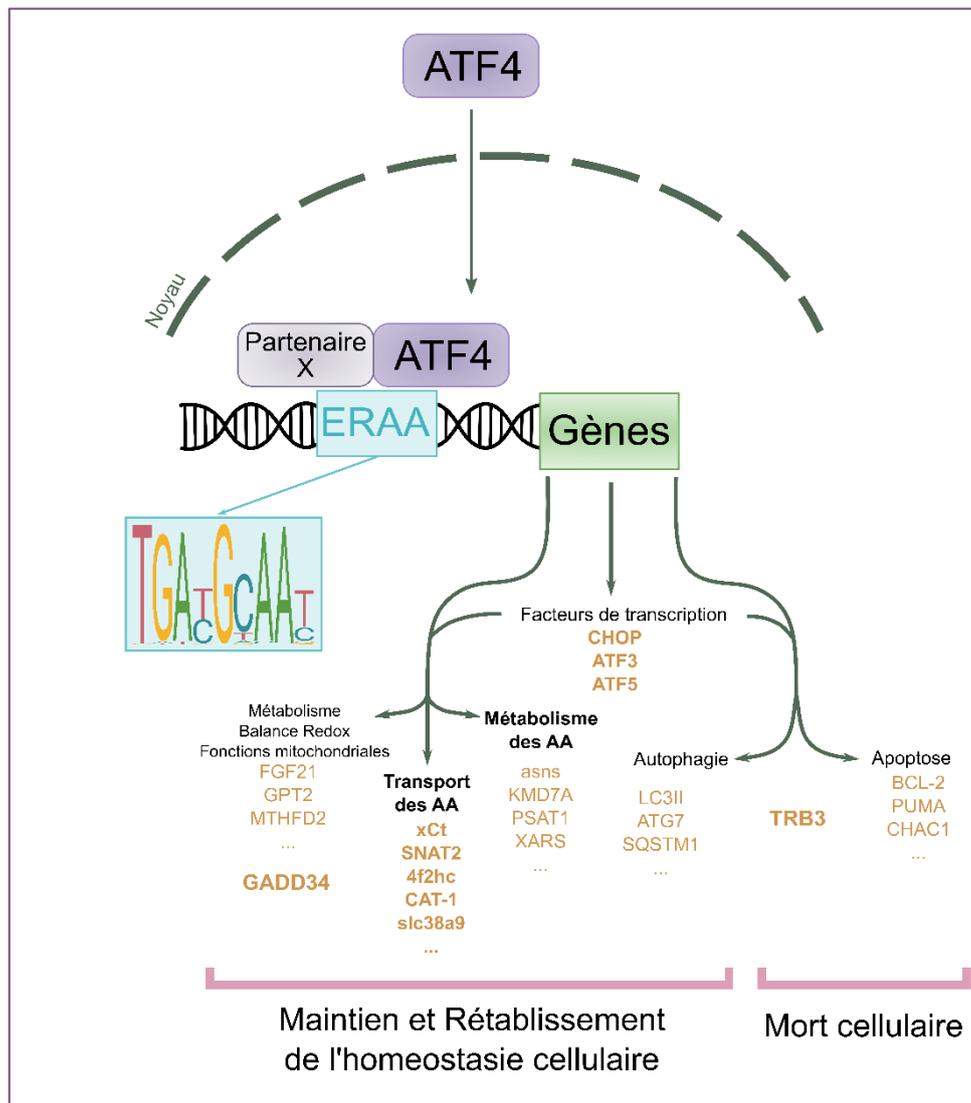


Figure 9 : Transcription de gènes cibles par ATF4 pour répondre à la carence en AA. ATF4 et son partenaire reconnaissent l'élément de réponse aux AA (ERAA) sur lequel ils se fixent et induisent l'expression du gène cible. Deux issues sont possibles lors de l'activation de GCN2 : si le stress est mitigé alors les gènes transcrits participeront au maintien et au rétablissement de l'homéostasie cellulaire ; si le stress est trop sévère alors l'activation de GCN2 induira la mort cellulaire. Adapté de Wortel et al., 2017⁶³ et Neill et Masson, 2023³⁹.

pour induire la transcription du gène cible est constituée d'une dizaine de nucléotides selon un motif consensus (Figure 9). Les gènes possédant cet ERAA sont nombreux et seraient potentiellement plus de 16 000 chez les mammifères⁶², bien qu'aujourd'hui environ 200 soient réellement décrits³⁹.

Les gènes ainsi préférentiellement transcrits par ATF4 permettront à l'organisme de faire face au stress lié à la carence en AA. ATF4 est ainsi démontré comme activateur de gènes impliqués dans le métabolisme des AA, leur transport, mais également dans d'autres fonctions

biologiques connectées, comme dans le maintien de la balance réduction-oxydation (Redox) ou les fonctions mitochondriales (Figure 9)^{55,57}. ATF4 induira également l'expression d'autres facteurs de transcription, notamment celle de CHOP ou de ATF3 (*Activating Transcription Factor 3*), avec lesquels il pourra dimériser et apporter une réponse adaptée au stress liée à la carence : avec ATF3 comme partenaire, ATF4 induira ainsi principalement des gènes qui permettront le rétablissement de l'homéostasie cellulaire, tandis qu'avec CHOP, ATF4 aura plutôt tendance à induire des gènes favorisant la mort cellulaire³⁶.

ATF4 a également la capacité d'induire des gènes à rétroaction négative sur la RIS, comme TRB3 (*Tribbles homolog 3*) qui aura pour effet d'inhiber la transcription dépendante de CHOP et ATF4, de manière à affiner et atténuer la réponse de la RIS⁵⁹. Un autre gène sous le contrôle d'ATF4 qui a un effet négatif sur la RIS est GADD34 (*Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein 34*). Ce dernier, pourtant induit par ATF4, fait partie du complexe chargé de la déphosphorylation de eIF2 α pour permettre la reprise de la traduction cap-dépendante des protéines et, si le stress induisant la RIS est mitigé ou terminé, signer la fin de celle-ci³⁶. Au contraire, si le stress activant la RIS dure dans le temps et se trouve trop important pour garantir le maintien de l'homéostasie cellulaire, l'activation de cette même voie induira la mort cellulaire (Figure 9).

c. Dialogue entre mTOR et GCN2

Bien qu'offrant des réponses différentes à la disponibilité en AA, les voies signalétiques mTOR et GCN2 orchestrent des réponses cellulaires en lien avec une même famille de nutriments. De cette manière, plusieurs lignes d'évidences convergent sur des dialogues possibles entre ces deux voies.

Il a notamment été démontré que mTORC1 était désactivé lors d'une carence en AA de manière GCN2 – ATF4 dépendante⁶⁴, *via* l'induction de certaines cibles d'ATF4. Par exemple, une activation de GCN2 en condition de carence induit l'expression de Sestrine 2, détecteur de Leucine⁶⁵. Le gène de Sestrine 2 possède un ERAA dans sa région promotrice et l'augmentation de sa présence en condition de carence entraînera alors une plus forte inactivation de mTORC1, la déficience en leucine causée par la carence ne permettant pas d'inhiber l'effet répresseur qu'exerce Sestrine 2 sur mTORC1. A noter que d'autres effecteurs de mTORC1 sont induits de manière GCN2 – ATF4 dépendante. C'est, par exemple, le cas de

4E-BP1, inhibiteur de la traduction globale des protéines, ou encore celui REDD1 (*Regulated in Development and DNA damage response 1*), inhibiteur de mTORC1 répondant au statut énergétique cellulaire⁶⁶. TRB3, une autre cible activée en situation de carence en AA *via* GCN2 – ATF4, est également considéré comme un régulateur de l'activation de mTOR, notamment *via* son rôle d'inhibiteur de la signalisation de l'insuline et des facteurs de croissance par AKT⁶⁷. De cette manière, même si les autres facteurs activant mTORC1 sont présents, l'absence stricte d'AA et l'activation de GCN2 permettront un contrôle supplémentaire sur l'activation de mTORC1. Cette inactivation de mTORC1 *via* TRB3 est également impliquée dans l'activation de l'autophagie et la mort cellulaire par apoptose⁶⁸, participant ainsi à l'issue de mort cellulaire orchestrée par la RIS lors de stress sévères ou de longue durée. Des mécanismes GCN2 dépendants mais ATF4 indépendants ont également été reportés pour l'inhibition de mTORC1 par la carence en AA, où les phosphorylations de GCN2 et eIF2 α seraient nécessaires à l'inactivation précoce de mTORC1 en réponse à une carence en Arginine et Leucine⁶⁹.

A l'inverse, il a aussi été démontré que l'activation de mTORC1 réprimait la voie GCN2 – ATF4, notamment *via* la sous-expression de certains transporteurs d'AA activés par GCN2^{66,70}. mTORC1 réprime également la traduction de ATF4 de manière 4E-BP1 dépendante, atténuant ainsi son action en condition d'activation de la voie mTOR⁶⁶. Cependant, cette même étude met en lumière un rôle de l'activation de mTORC1 dans le contrôle de la stabilité de l'ARNm d'ATF4 et de sa traduction, démontrant des relations fines entre mTORC1 et ATF4, dont les rôles restent encore potentiellement à éclaircir.

Enfin, une étude récente a mis en lumière une interaction étroite entre GCN2 et mTORC1. Ge et ses collaborateurs ont en effet démontré qu'en condition d'activation de GCN2 par l'accumulation d'ARNt non chargés, l'autophosphorylation de la kinase entraînait la phosphorylation de FBXO22 (*F-box only protein 22*), protéine impliquée dans l'ubiquitination de nombreuses cibles. Ainsi, la phosphorylation de FBXO22 permet sa rétention cytoplasmique et l'ubiquitination (réversible) de mTORC1, induisant une perte de reconnaissance de ces substrats, et son inactivation⁷¹. La mise en lumière de ce nouveau mode d'action de GCN2 sur l'activation de mTORC1 permettrait également d'expliquer comment ce complexe peut être inactivé par n'importe quelle carence en AA, et non ceux spécifiques aux détecteurs aujourd'hui répertoriés.

Du fait du rôle des AA dans la constitution des protéines, au niveau métabolique mais également en tant que molécules signales, leur présence intracellulaire et leur homéostasie est cruciale à maintenir. Cependant, ces molécules ne peuvent diffuser librement à travers les membranes biologiques. La présence et la régulation du pool intracellulaire d'AA sont, de ce fait, principalement permises grâce à l'existence de protéines transmembranaires spécifiques : les Transporteurs d'Acides Aminés (TAA)¹⁸.

II. Les Transporteurs d'Acides Aminés

A. Généralités sur le transport membranaire

La membrane plasmique cellulaire permet d'isoler le milieu intracellulaire du milieu extérieur. Cependant, une cellule a besoin de communiquer avec l'extérieur, notamment pour recevoir les molécules et nutriments essentiels à sa survie et rejeter ses déchets métaboliques. Hormis pour les petites molécules comme le dioxyde de carbone ou le dioxygène capables de diffuser librement à travers la membrane, l'absorption des molécules essentielles à la vie comme l'eau, les ions et les nutriments est permise grâce à la présence de transporteurs insérés dans la membrane plasmique⁷². L'importance biologique des transporteurs et leur rôle dans l'homéostasie cellulaire sont illustrés par le fait qu'ils représenteraient environ 10% des gènes codés par le génome humain⁷².

Deux types de transport sont différenciés : les transports actifs et passifs de ces molécules essentielles (Figure 10). Le transport passif consiste en une diffusion facilitée du composé dans le sens de son gradient de concentration à travers le transporteur ; c'est le cas pour l'absorption de l'eau à travers les aquaporines, d'ions inorganiques à travers les canaux ioniques, mais aussi pour l'absorption de certains sucres et AA⁷³. A l'inverse, le transport actif permettra l'absorption d'un composé contre son gradient de concentration, mais nécessitera un couplage énergétique à son absorption⁷², le type de couplage énergétique permettant de distinguer les transports actifs primaire et secondaire. Le transport actif primaire nécessite un couplage avec l'ATP pour l'absorption du composé, ce qui est le cas des pompes ioniques et des transporteurs de la famille ABC (*ATP-Binding Cassette*), pour lesquels l'hydrolyse de l'ATP permettra l'absorption d'ions, de sucres ou de lipides. Ce pompage des ions par les transporteurs actifs primaires permettra alors aux transporteurs actifs secondaires d'absorber leur substrat, dont l'absorption de certains AA, qui se fera grâce au gradient électrochimique⁷³.

Bien que l'absorption des AA dépende de transports passifs et actifs secondaires, les Transporteurs d'Acides Aminés (TAA) appartiennent tous à une même famille de protéines : la famille des SLC (*SoLute Carrier*). Cette famille génique, largement conservée chez les

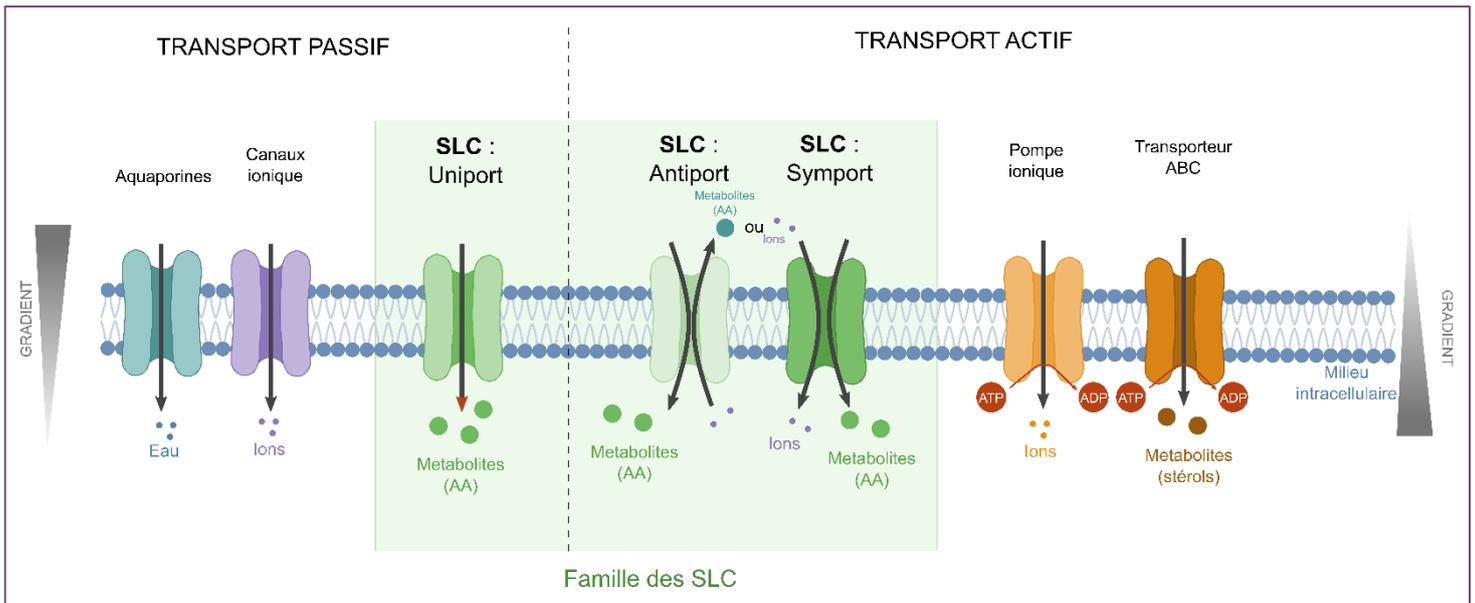


Figure 10 : Les différents types de transporteurs permettant l'absorption des molécules essentielles à la cellule. Les différentes modalités d'absorption retrouvés chez les SLC sont détaillées. ATP : Adénosine Triphosphate, ADP : Adénosine Diphosphate

organismes vivants, des procaryotes aux eucaryotes⁷⁴, constitue la plus grande famille de transporteurs transmembranaires d'une cellule. Elle est chargée de l'absorption d'un large spectre de molécules (ions, sucres, AA, etc.) dont les transporteurs représentent plus de 450 membres différents, classés en plus de 50 sous-familles distinctes. La famille des SLC représente également la deuxième plus grande famille de protéines membranaires codée par le génome humain⁷⁵.

Malgré l'identification de ce grand nombre de membres et de sous-familles, un manque accru de connaissances entoure aujourd'hui la famille des SLC. Comme illustré sur la figure 11, la famille des SLC constitue l'une des familles de protéines les moins étudiées, avec un faible nombre de publications mais, surtout, la famille de protéines la plus asymétrique : l'effort de publication est, depuis des décennies, focalisé sur seulement quelques membres de la famille, alors que la moitié des SLC n'ont fait l'objet que d'une quinzaine de publications, ou moins⁷⁵. La question légitimement posée est alors de comprendre pourquoi les SLC sont si peu étudiés et caractérisés. A cela, plusieurs hypothèses ont été avancées. Les premières raisons seraient que, en plus de leur grand nombre, il s'agit de protéines membranaires, de relative faible abondance⁷², rendant l'étude de leur structure et propriétés physico-chimiques difficiles ; ainsi que leur purification et leur identification en spectrométrie de masse peu aisées. De plus, bien que le spectre de composés transportés soit large, il est évident que, sur plus de 450 membres, des redondances de substrat existent entre les différents transporteurs. C'est

principalement pour cela qu'étudier le rôle biologique d'un transporteur donné devient difficile à appréhender, du fait des spécificités chevauchantes des autres transporteurs et de leur potentiels effets compensatoires⁷⁵.

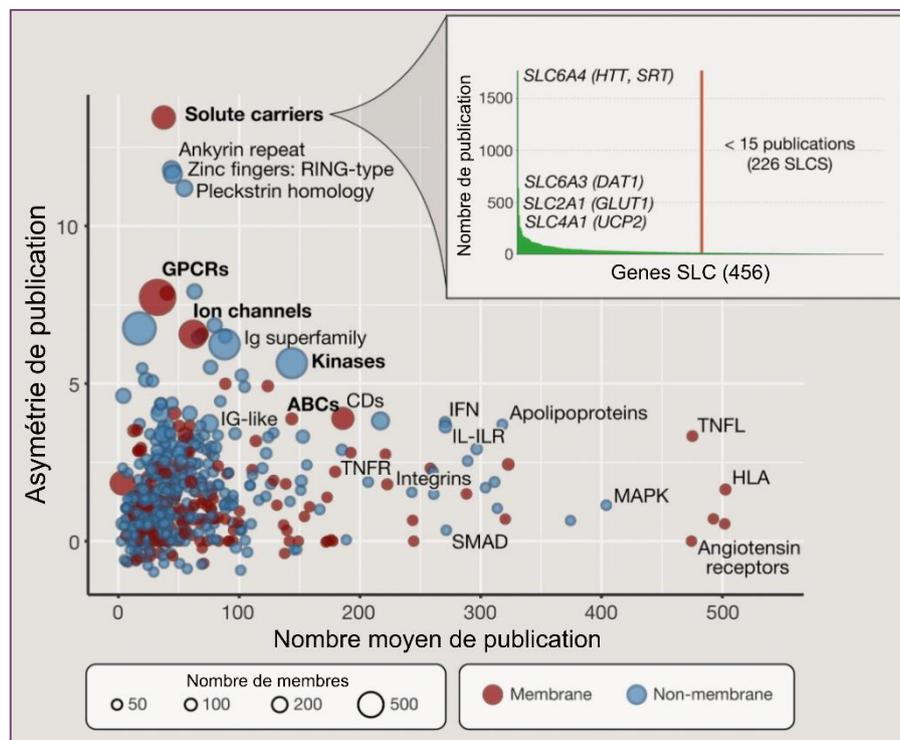


Figure 11 : Asymétrie de publication en fonction du nombre moyen de publication pour les principales familles de protéines connues chez les mammifères. La taille de chaque cercle indique le nombre de membres dans la famille, Les ronds rouges indiquent des protéines transmembranaires, les ronds bleus des protéines cytosoliques. Le détail du nombre de publication pour chaque gène SLC est donné dans le rectangle en haut à gauche, où la moitié des membres représentent moins de 15 publications ; d'après César-Razquin et al.,⁷⁵.

L'effort de recherche sur la famille de SLC reste nécessairement à approfondir⁷⁶, particulièrement en sachant que les substrats d'un tiers des SLC humains identifiés sont encore aujourd'hui inconnus^{70,71}.

B. Classification des Transporteurs d'Acides Aminés

Les TAA appartiennent donc à la famille des SLC, subdivisée en plusieurs sous-familles. Un gène est attribué à une sous-famille de SLC s'il présente une identité de séquence protéique d'au moins 20% avec un autre membre de la famille⁷³. Sur la soixantaine de sous-famille de SLC aujourd'hui identifiées, les TAA se regroupent dans 13 d'entre elles. Selon la nomenclature, le nom de tous les gènes codant pour un transporteur SLC commence par ces trois lettres, suivi du nombre associé à la sous-famille (par exemple SLC1 par la famille n°1, ce nombre associé à la sous-famille étant généralement lié à l'ordre de découverte⁷⁷), suivi d'une lettre pour subdiviser la sous-famille (dans le cas des TAA, aucune différenciation n'est réalisée

au sein des sous-familles et tous les gènes porteront la lettre A) et enfin terminé par le nombre spécifique à chaque membre (ainsi SLC1A1 et SLC1A2 appartiennent à la même sous-famille mais constituent deux gènes codant pour deux transporteurs distincts)⁷³.

Bien que cette classification en famille de SLC ait permis une harmonisation de la nomenclature des transporteurs membranaires, il est à noter qu'elle supprime l'ancienne classification des TAA qui se faisait par systèmes⁷⁸. Précédemment, les TAA étaient divisés en une vingtaine de systèmes différents, en fonction de leur spécificité de substrat, leur saturabilité, leur comportement cinétique, leur mode énergétique ou encore leur mécanisme de régulation⁷⁹. Par exemple, les signes – ou + d'un système indiquent la charge des AA transportés (– pour les anioniques et + pour les cationiques)^{78,80}, les lettres indiquant généralement l'AA/groupe d'AA majoritairement transportés par un système (ASC = alanine, sérine, cystéine, N = asparagine, etc.)⁸¹⁻⁸³ *. Cette ancienne classification, bien que peu harmonieuse et ne prenant pas en compte les autres types de transporteurs (de sucres ou d'ions par exemple) donnait de plus amples informations quant aux propriétés propres à un TAA. Aujourd'hui par exemple, sur la base de leur homologie de séquence, SLC1A3 (EAAT1) et SLC1A4 (ASCT1) se retrouvent dans la même sous-famille de SLC, alors que, pourtant, leurs propriétés de transport sont très différentes (Tableau 2). C'est pour cette raison que le Tableau 2, répertoriant les 75 TAA identifiés à ce jour chez les mammifères, comporte également les anciens systèmes de classification, lorsque ces derniers sont connus.

* A noter également que ces systèmes permettaient de décrire le transport des AA (AA concerné, dépendance aux ions, sensibilité aux inhibiteurs, etc.) avant que les protéines codant pour les TAA soient identifiées. Ce n'est que plus tardivement que les TAA ont été assignés aux systèmes auxquels ils appartenaient, premièrement décrit⁷⁸. Des informations complémentaires sur les mécanismes des différents systèmes peuvent être retrouvés dans ces revues dédiées^{77,84}.

Tableau 2 : Classification de tous les TAA connus, à ce jour, chez les mammifères. Catégorie : A=anionique, C=cationique, N=neutre, T=traffiking. Type de transport : S=symport, T=traffiking, U=uniport, A=antiport. Localisation cellulaire : MP=membrane plasmique, L=lysosome, Mt=mitochondrie, V=vésicule. Pour les systèmes, – indiquent une non caractérisation ; pour la dépendance aux ions, – indiquent une indépendance ; les ? signifient l'absence données.

Famille	Gène	Acronyme	Système	Catégorie	Type de transport	Localisation cellulaire	Substrat	Dépendance aux ions	Expression	Refs
SLC1	slc1a1	EAAT3	X ⁻ _{AG}	A	S	MP	Asp, Glu	3Na ⁺ 1H ⁺ 1K ⁺	Ubiquiste	85
	slc1a2	EAAT2	X ⁻ _{AG}	A	S	MP	Asp, Glu	3Na ⁺ 1H ⁺ 1K ⁺	Cerveau	86
	slc1a3	EAAT1	X ⁻ _{AG}	A	S	MP	Asp, Glu	3Na ⁺ 1H ⁺ 1K ⁺	Cerveau	86
	slc1a4	ASCT1	ASC	N	A	MP	Ala, Ser, Cys	Na ⁺	Ubiquiste	87
	slc1a5	ASCT2	ASC	N	A	MP, L, Mt	Ala, Ser, Cys, Thr, Gln	Na ⁺	Ubiquiste	87
	slc1a6	EAAT4	X ⁻ _{AG}	A	S	MP	Asp, Glu	3Na ⁺ 1H ⁺ 1K ⁺	Cerveau	86
	slc1a7	EAAT5	X ⁻ _{AG}	A	S	MP	Asp, Glu	3Na ⁺ 1H ⁺ 1K ⁺	Cerveau, rétine	88
SLC3	slc3a1	rBAT	-	T	T	MP	Sous-unités lourdes des TAA hétérodimériques		Rein, Foie, Intestin	89
	slc3a2	4f2hc	-	T	T	MP, L			Ubiquiste	89
SLC6	slc6a2	Gat1	β	N	S	MP	GABA	2Na ⁺ 1Cl ⁻	Cerveau	90
	slc6a5	GlyT2	Gly	N	S	MP	Gly	3Na ⁺ 1Cl ⁻	Cerveau	91
	slc6a6	TAUT	β	N	S	MP	Tau, GABA	2Na ⁺ 1Cl ⁻	Ubiquiste	92
	slc6a7	PROT	-	N	S	MP, V	Pro	2Na ⁺ 1Cl ⁻	Cerveau, intestin	93

slc6a9	GlyT1	Gly	N	S	MP	Gly	2Na ⁺ 1Cl ⁻	Cerveau	91	
slc6a11	Gat3	β	N	S	MP	GABA	2Na ⁺ 1Cl ⁻	Cerveau	90	
slc6a12	BGT1	β	N	S	MP	GABA	2Na ⁺ 1Cl ⁻	Cerveau, Foie, Rein	90	
slc6a13	Gat2	β	N	S	MP	GABA	2Na ⁺ 1Cl ⁻	Cerveau, Foie, Rein	90	
slc6a14	ATB ^{0,+}	B ^{0,+}	N/C	S	MP	tous les AAN et AAC	2Na ⁺ 1Cl ⁻	Ubiquiste	94	
slc6a15	B ⁰ AT2	B ⁰	N	S	MP	Pro, Leu, Val, Met, Ile	1Na ⁺	Cerveau	95	
slc6a17	B ⁰ AT3/ NTT4	B ⁰	N	S	MP, V	Pro, Leu, Gly, Ala	2Na ⁺ 1Cl ⁻	Cerveau	95	
slc6a18	XT2/ B ⁰ AT3	Gly	N	S	MP	Gly, Ala	2Na ⁺ 1Cl ⁻	Rein	95	
slc6a19	B ⁰ AT1	B ⁰	N	S	MP	tous les AAN	1Na ⁺	Intestin, Rein	95	
slc6a20	SIT1	IMINO	N	S	MP	Pro	2Na ⁺ 1Cl ⁻	Cerveau, Intestin, Rein	95	
SLC7	slc7a1	CAT1	γ ⁺	C	U	MP	Arg, Lys, Orn	-	Ubiquiste	96
	slc7a2	CAT2	γ ⁺	C	U	MP	Arg, Lys, Orn	-	Ubiquiste	96
	slc7a3	CAT3	γ ⁺	C	U	MP	Arg, Lys, Orn	-	Ubiquiste	96
	slc7a4	CAT4	γ ⁺	C	U	MP, L	?	-	Ubiquiste	96

slc7a5	LAT1/ 4f2hc	L	N	A	MP, L	His, Met, Leu, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp	-	Ubiquiste	97
slc7a6	y ⁺ LAT2/ 4f2hc	y ⁺ L	C	A	MP	Arg, Lys, Gln, His, Met, Leu	1Na ⁺	Intestin, Rein, Foie	98
slc7a7	y ⁺ LAT1/ 4f2hc	y ⁺ L	C	A	MP	Arg, Lys, Gln, His, Met, Leu, Ala, Cys	1Na ⁺	Intestin, Rein, Foie, macrophages	98
slc7a8	LAT2/ 4f2hc	L	N	A	MP	Tous les AAN sauf Pro	-	Rein, cerveau, Foie, rate, rein, intestin	89
slc7a9	B ^{0,+} AT/ rBAT	B ^{0,+}	C	A	MP	Arg, Lys, Orn, Cn	-	Intestin, Rein, Foie	89
slc7a10	Asc-1/ 4f2hc	asc	N	A	MP	Gly, Ala, Ser, Cys, Thr	-	Tissus Adipeux, cerveau	99
slc7a11	xCT/ 4f2hc	X ^c	A	A	MP	Asp, Glu, Cn	-	Foie, macrophage , cerveau, rein	100
slc7a12	Asc-2	asc	N	A	MP	Gly, Ala, Ser, Cys, Thr	-	Rein	89
slc7a13	AGT1/rB AT	-	N	A	MP	Asp, Glu	-	Rein	89
slc7a14	-	c	C	U	L	Arg, Lys, Orn, GABA	-	Cerveau	101, 102
slc16a6	MCT7	-	N	U	MP	Tau	-	Ubiquiste	103

SLC16	slc16a10	TAT1	T	N	U	MP	Trp, Tyr, Phe	-	Ubiquiste	104
	slc17a6	VGLUT2	-	A	U	V	Glu	-	Cerveau	105
SLC17	slc17a7	VGLUT1	-	A	U	V	Glu	-	Cerveau	105
	slc17a8	GVLUT3	-	A	U	V	Glu	-	Cerveau, Foie, Rein	105
	slc25a2	Ornt2	-	C	U	Mt	Arg, Lys, His, Orn, Cit	-	Ubiquiste	106, 107
	slc25a12	AGC1	-	A	A	Mt	Asp, Glu	H ⁺	Ubiquiste	108
	slc25a13	AGC2	-	A	A	Mt	Asp, Glu	H ⁺	Ubiquiste	108
	slc25a15	Ornt1	-	C	A	Mt	Arg, Lys, His, Orn, Cit	H ⁺	Ubiquiste	106
SLC25	slc25a18	GC2	-	A	S	Mt	Glu	H ⁺	Ubiquiste	109
	slc25a22	GC1	-	A	S	Mt	Glu	H ⁺	Ubiquiste	109
	slc25a26	SAMC	-	N	A	Mt	SAM	-	Ubiquiste	110
	slc25a29	Ornt3	-	C	U	Mt	Arg, Lys, His, Orn	-	Ubiquiste	111
	slc25a38	-	-	N	U	Mt	Gly	-	Ubiquiste	106
	slc25a44	-	-	N	U	Mt	Val, Ile, Leu	-	Ubiquiste	112
SLC32	slc32a1	VIAAT	-	N	A	V	Gly, GABA	H ⁺	Cerveau	113
SLC36	slc36a1	PAT1	imino	N	S	MP, L	Gly, Pro, Ser	H ⁺	Ubiquiste	114

slc36a2	PAT2	imino	N	S	MP	Gly, Pro, Ser	H ⁺	Ubiquiste	114
slc36a3	PAT3	imino	?	?	MP	?	?	Testicules	114
slc36a4	PAT4	imino	N	U	MP,L	Trp, Pro, Ala	-	Ubiquiste	114

SLC38

slc38a1	SNAT1	A	N	S	MP	Gly, Ala, Asn, Cys, Gln, His, Met	Na ⁺	Ubiquiste	115
slc38a2	SNAT2	A	N	S	MP	Gly, Pro, Ala, Ser, Cys, Gln, Asn, His, Met	Na ⁺	Ubiquiste	115
slc38a3	SNAT3	N	N	S	MP	Gln, Asn, His	Na ⁺ H ⁺	Foie, Cerveau, pancréas	115
slc38a4	SNAT4	A	N	S	MP	Gly, Ala, Ser, Cys, Gln, Asn, Met, Arg, Lys	Na ⁺	Foie, Rate	115
slc38a5	SNAT5	N	N	S	MP	Gln, Asn, His, Ala	Na ⁺ H ⁺	Ubiquiste	115
slc38a6	SNAT6	-	N	U	MP	Gln, Glu	-	Ubiquiste	115
slc38a7	SNAT7	-	N	S	MP, L	Gln, Asn, His, Ala, Ser, Asp	Na ⁺	Ubiquiste	115, 116
slc38a8	SNAT8	A	N	S	MP	Gln, Ala, Arg, His, Glu	Na ⁺	Cerveau	117
slc38a9	-	-	N/C	S	L	Phe, Leu, Ile, Trp, Met, Tyr, Val, Pro	Na ⁺	Ubiquiste	118

	slc38a10	SNAT10	-	N	U	MP, RE, G	Gln, Glu, Asp	-	Ubiquiste	119
	slc38a11	-	-	N	A	?	?	H ⁺	Ubiquiste	115
SLC43	slc43a1	LAT3	L	N	U	MP	Leu, Ile, Met, Phe, Val	-	Ubiquiste	120
	slc43a2	LAT4	L	N	U	MP	Leu, Ile, Met, Phe, Val	-	Ubiquiste	120
SLC56	slc56a1	SFXN1	-	N	U	Mt	Ser, Ala, Cys	-	Ubiquiste	121
	slc56a2	SFXN2	-	N	U	Mt	Ser	-	Ubiquiste	121
	slc56a3	SFXN3	-	N	U	Mt	Ser	-	Ubiquiste	121
SLC66	slc66a1	pqlc2	-	C	U	L	Arg, Orn, His, Lys	-	Ubiquiste	122
	slc66a4	CTNS	-	N	S	L	Cn	H ⁺	Ubiquiste	123

Comme illustré dans le Tableau 2, un organisme mammifère comporte donc au moins 75 TAA différents pour orchestrer l'absorption, l'échange inter-organes et inter-organelles des 20 AA protéinogènes. Cela met en lumière une certaine redondance de leur fonction : plusieurs TAA ont des substrats identiques. Cependant, cette notion de redondance peut être nuancée par plusieurs points. Premièrement, bien que certains TAA soient ubiquistes et retrouvés dans tout type cellulaire, d'autres possèdent des localisations bien plus spécifiques¹²⁴. Pour ne citer qu'un exemple, GlyT2, transporteur de Glycine, est majoritairement retrouvé dans le cerveau car impliqué dans la neurotransmission⁹¹, alors que B⁰AT1, transporteur d'AA neutres, et donc de glycine, est, quant à lui, majoritairement retrouvé dans l'intestin où il est chargé de l'absorption des AA issus de la digestion des protéines¹²⁵. De plus, certains TAA sont spécifiques à des organelles tandis que d'autres sont uniquement retrouvés à la membrane plasmique¹²⁶, reflétant donc des fonctions biologiques bien distinctes malgré la possibilité de substrats identiques. Enfin, il est aussi possible de noter

que certains TAA auront une expression et une fonction différentielles au cours du développement de l'organisme¹²⁷.

Une autre notion permet de nuancer l'aspect de redondance des TAA évoqués précédemment. Par exemple, les TAA possèdent généralement des propriétés de transport différentes selon l'AA considéré et, bien qu'ayant des substrats identiques, deux TAA ne transporteront pas le même AA à la même vitesse et avec la même saturabilité⁷⁶. Ces subtilités d'affinité de transport permettent alors de différencier les TAA selon leur fonctionnalité d'absorption. Par exemple, LAT1, ASCT2 et γ^+ LAT2 sont considérés comme des Harmoniseurs car ils permettent l'absorption rapide de la majorité des AA protéinogènes. Etant donné leur qualité d'échangeurs, qui nécessite donc la sortie d'un AA contre l'entrée d'un autre, ces Harmoniseurs sont dépendants de Chargeurs comme SNAT1 ou CAT1, dont le rôle sera d'accumuler des AA cytosoliques qui serviront à l'échange par les Harmoniseurs. Finalement, cette accumulation d'AA cytosoliques par les Chargeurs sera, quant à elle, limitée par des Contrôleurs, comme SNAT3 ou LAT3, TAA à faible affinité de transport et permettant généralement l'efflux d'AA, qui préviendront ainsi une accumulation excessive d'AA intracellulaires¹²⁸. Cette connexion entre les TAA pour l'absorption des AA démontre la concertation nécessaire entre ces transporteurs pour finement contrôler l'homéostasie cellulaire des AA.

Ces subtilités de substrat, de localisation cellulaire et intracellulaire des TAA démontrent la finesse des mécanismes nécessaires pour assurer le contrôle de l'homéostasie cellulaire de tous les AA et leur mobilité au niveau de la cellule. Le rôle central des AA pour un organisme vivant suggère également une participation de leur transporteur dans le contrôle et la régulation de nombreuses fonctions biologiques.

C. Rôles biologiques des TAA

a. Implication des TAA dans l'absorption intestinale des AA

La fonction biologique liée aux TAA qui semble la plus évidente est leur implication dans l'absorption des AA provenant de l'alimentation. Une fois ingérées par l'organisme, les protéines alimentaires sont digérées pour libérer les AA qu'elles contiennent et les rendre disponibles à l'absorption. Bien que des transporteurs de di- et tri-peptides existent à la

membrane des entérocytes¹²⁶, la quasi-totalité des protéines sont hydrolysées sous forme d'AA libres dans la lumière intestinale, notamment grâce à la présence de peptidases situées sur la bordure en brosse des entérocytes¹²⁹ *.

Pour assurer l'absorption de l'ensemble des AA alimentaires, les entérocytes possèdent un set de différents TAA, permettant leur captage de la lumière intestinale par la face apicale, jusqu'à leur efflux par la face basolatérale vers le sang et les autres tissus/organes de l'organisme. De manière schématique, ce flux vectoriel d'AA de la muqueuse intestinale vers le sang *via* les entérocytes est permise grâce à des TAA spécifiques retrouvés sur la face apicale qui utilisent le gradient électrochimique de sodium des entérocytes pour absorber les AA et les accumuler dans le cytosol. Grâce à cette accumulation cytosolique, les AA pourront alors utiliser la diffusion facilitée par d'autres TAA spécifiques, assurant leur efflux et leur passage dans le sang. Ce mécanisme schématique est particulièrement vrai pour l'absorption des AA neutres par B⁰AT1 ou SIT1 par exemple (Figure 12), mais des spécificités incombent tout de même à l'absorption des AA cationiques et anioniques. L'absorption des AA cationiques est majoritairement, si ce n'est exclusivement, dépendante d'échangeurs comme B^{0,+}AT à la face apicale et γ^+ LAT1 à la face basolatérale (Figure 12), nécessitant un couplage avec des AA neutres pour leur absorption et leur efflux¹²⁵. Pour les AA anioniques, leur absorption par la face apicale est aussi dépendante de la force motrice ionique, mais leur efflux basolatéral est quasiment inexistant car la grande majorité du glutamate absorbé est directement métabolisé sous forme d' α -kétoglutarate par les entérocytes et utilisé comme source d'énergie⁷⁷. Des TAA anioniques sont tout de même retrouvés à la face basolatérale des entérocytes pour assurer l'efflux minime restant, notamment grâce à EAAT2 ou EAAT3**.

* La majorité de l'absorption des AA alimentaires se fait dans l'intestin grêle, bien qu'une partie plus minime des AA soit aussi absorbée par le gros intestin. Cependant, cette absorption tardive le long du tractus digestif représente moins de 10% de l'absorption journalière d'AA et est principalement liée à l'absorption de sécrétions endogènes comme par exemple les AA générés par le microbiote intestinal¹²⁵.

** Le set de TAA décrit ici représente le set « classique » retrouvé dans l'intestin grêle des mammifères pour l'absorption des AA. A noter que ce set varie le long du tractus digestif, où certains TAA n'auront pas la même abondance (par exemple ASCT2 est très peu retrouvé dans l'intestin grêle mais fortement exprimé dans le gros intestin). De même, ce set de TAA peut varier d'une espèce à l'autre, notamment en comparaison à des espèces herbivores comme le lapin⁷⁷.

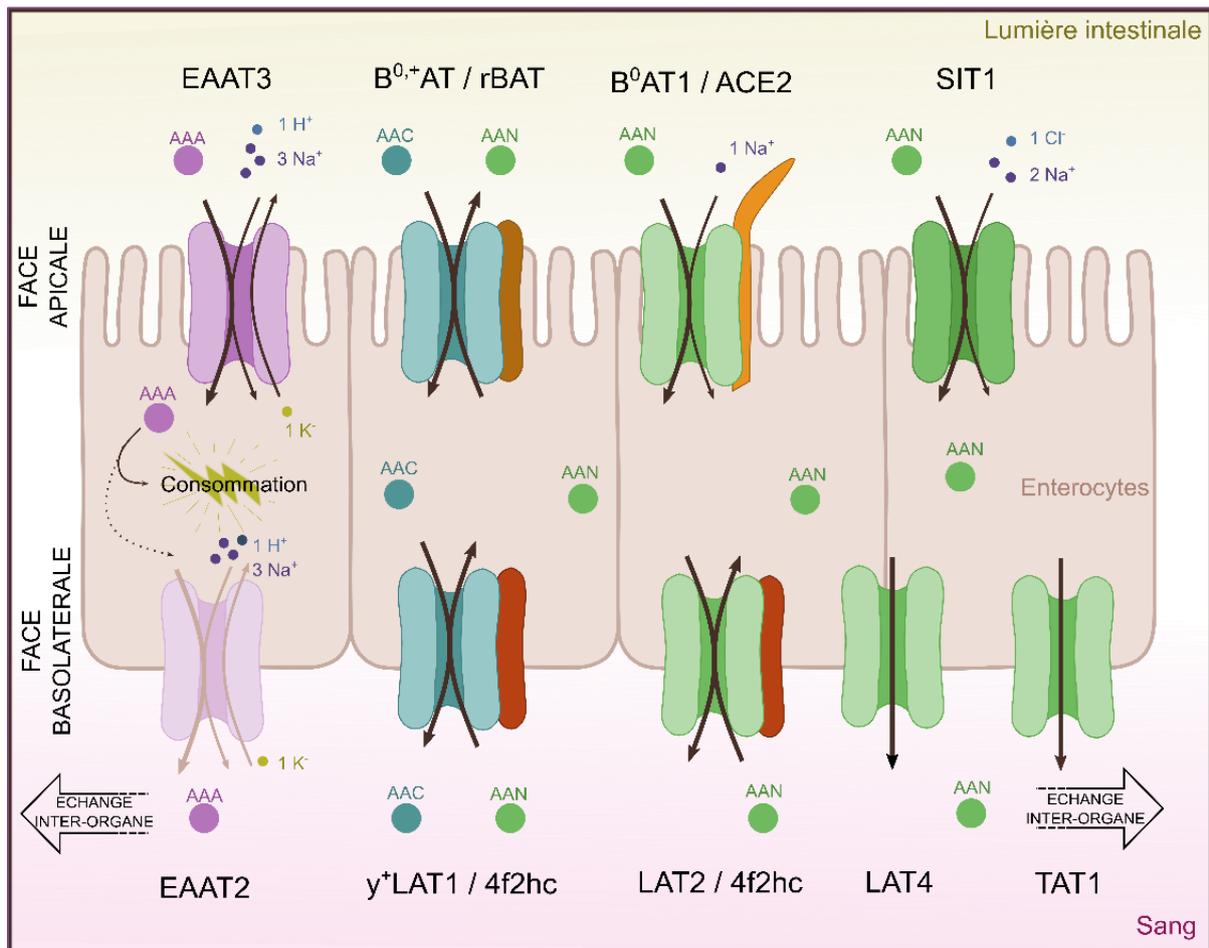


Figure 12 : Transporteurs d'Acides Aminés impliqués dans l'absorption intestinale des AA. Le set de transporteurs diffère de la face apicale de la face basolatérale mais permet un flux vectoriel d'AA de la muqueuse intestinale vers le sang, où les AA ainsi absorbés seront ensuite envoyés vers l'ensemble des organes.

Ce set de TAA spécifiques aux entérocytes représentés sur la Figure 12 permettra l'absorption de l'ensemble des AA protéinogènes provenant de l'alimentation. Ces AA seront alors redistribués par l'intermédiaire du sang à tous les tissus et organes pour leur utilisation spécifique. Une grande partie des AA rejoindront le foie, organe le plus métaboliquement actif à leur égard, tandis que d'autres, par exemple, rejoindront le cerveau où plusieurs AA sont impliqués dans la neurotransmission.

b. TAA et neurotransmission

Certains AA, notamment le glutamate (Glu) et son produit carboxylé, le GABA, constituent des neurotransmetteurs clé du système nerveux central car impliqués dans la neurotransmission des potentiels d'action. Bien que divergeant par leur rôle (la neurotransmission glutamatergique est excitatrice alors que la neurotransmission GABAergique est inhibitrice), ces deux voies possèdent des mécanismes communs dans

lesquels les TAA jouent un rôle clé^{90,124}. Le Glu et le GABA sont chargés dans des vésicules synaptiques grâce à des TAA spécifiques, VGLUT1-3 et VIAAT respectivement. Lorsqu'un potentiel d'action est ressenti, le Glu et le GABA sont libérés dans la fente synaptique et se fixent sur leur récepteur pour transmettre le potentiel, qu'il soit inhibiteur ou excitateur. Comme une accumulation de ces AA dans la fente synaptique est toxique, un recaptage rapide par les astrocytes est permise grâce à d'autres TAA : EAAT2 pour le Glu¹³⁰ et Gat1/2 pour le GABA⁹⁰. Ces AA ainsi capturés par les astrocytes seront alors convertis en glutamine, avant de rejoindre à nouveau les neurones présynaptiques à l'aide d'autres TAA tels que SNAT2 et SNAT3, dans le but de maintenir un pool de neurotransmetteur constant.

Bien que minoritaires, d'autres AA co-agonistes de la neurotransmission glutamatergique sont fortement dépendants de la présence de TAA, comme par exemple la Glycine, recaptée par GlyT1 et GlyT2⁹¹, ou encore Asc-1, chargé du captage de la D-Sérine¹³¹.

c. Implication des TAA dans le développement

Pour déterminer le rôle biologique d'un TAA, plusieurs études se sont intéressées aux conséquences biologiques de la perte de son expression. Ces études ont alors mis en lumière que, chez le modèle murin, la perte de fonction de plusieurs TAA engendrait un retard de croissance intra-utérin important et un taux de survie faible à la naissance. C'est par exemple le cas de SNAT2¹³², LAT4¹³³, Asc-1¹³¹, LAT1¹³⁴ ou encore CAT1¹³⁵. Il apparaît en effet que la présence de ces TAA au niveau embryonnaire est essentielle pour le développement optimal de l'organisme, tant pour l'alimentation de l'embryon et sa prolifération¹³⁶ que pour son développement en blastocyste.

d. Implication des TAA dans la réponse immunitaire

Les TAA sont également reconnus comme des acteurs importants dans la réponse immunitaire et inflammatoire. Que ce soit pour les cellules de l'immunité innée ou acquise, il apparaît que les TAA ont un rôle déterminant dans la différenciation et l'activation des macrophages et des cellules T^{137,138}. Ce rôle déterminant dans la réponse immunitaire questionne de plus en plus sur les mécanismes qui gouvernent cette action des TAA et AA. Plusieurs faisceaux d'arguments pointeront sur la participation de l'activation de mTORC1¹³⁹, qui possède, dans l'activation des cellules T, un rôle important qui, comme illustré précédemment, est très dépendant des AA pour son activation. Outre l'activation de mTOR

par les AA, il apparaît également que les TAA eux-mêmes jouent un rôle dans l'activation de mTOR ; que ce soit en lien avec la réponse immunitaire, comme le démontre une étude récente plaçant EAAT2 au centre de l'activation de la réponse immunitaire *via* mTOR¹⁴⁰, mais aussi, plus généralement, dans l'activation de mTORC1.

e. Les TAA intracellulaires

Cette première partie relatant les rôles des TAA dans diverses fonctions biologiques s'est principalement intéressée aux TAA retrouvés à la membrane plasmique des cellules, constituant, en terme de nombre, le groupe de TAA majoritairement étudié. Cependant, comme évoqué précédemment, certains TAA possèdent des localisations intracellulaires, principalement au niveau lysosomal et mitochondrial. Du fait de cette localisation subcellulaire, leur étude est rendue plus difficile et, de ce fait, moins de données sont généralement disponibles pour ces classes de TAA. Il apparaît cependant que ces derniers possèdent des rôles fondamentaux dans le maintien de l'homéostasie cellulaire : la plupart des TAA lysosomaux ont des rôles relatifs à l'activation de la voie mTORC1, alors que les TAA mitochondriaux jouent un rôle décisif dans le maintien du métabolisme énergétique.

Focus sur les TAA lysosomaux

Les lysosomes sont les organelles dans lesquelles les éléments cellulaires obsolètes ou endommagés sont dégradés de manière à rendre leurs constituants à nouveau bio-disponibles pour la cellule. Les protéines ainsi dégradées par les lysosomes permettent une régénération du pool intracellulaire d'AA. Ces derniers devront alors sortir du lysosome pour être utilisés dans le cytosol, nécessitant donc la présence de TAA à la membrane lysosomale. Les lysosomes étant aussi le lieu d'activation de la voie mTORC1, des faisceaux d'arguments tendent à démontrer que ces efflux d'AA par les TAA lysosomaux jouent un rôle central dans l'activation de mTORC1 dépendante des AA.

Sur le pool de TAA retrouvés à la membrane lysosomale, certains sont spécifiques à cette organelle, comme, par exemple, PQLC2¹²², CTNS¹⁴¹ ou SLC38A9¹¹⁸. D'autres TAA, majoritairement retrouvés à la membrane plasmique peuvent également, dans une moindre mesure, avoir une localisation lysosomale. C'est, par exemple, le cas de PAT1¹⁴², EAAT2¹⁴⁰, ASCT2 et LAT1¹⁴³, dont le rôle dans l'activation de mTORC1 a également été démontré. Bien qu'aucun lien n'ait été établi avec l'activation de mTORC1, d'autres TAA originaires de la

membrane plasmique ont aussi été identifiés à la membrane lysosomale, comme par exemple SNAT7¹¹⁶, Cat2, ou encore SNAT4¹⁴⁴. Ce pool de différents TAA à la membrane lysosomale permet ainsi l'efflux de l'ensemble des AA lysosomaux vers le cytosol, stimulant notamment l'activation de mTORC1 dépendante des AA (Figure 13).

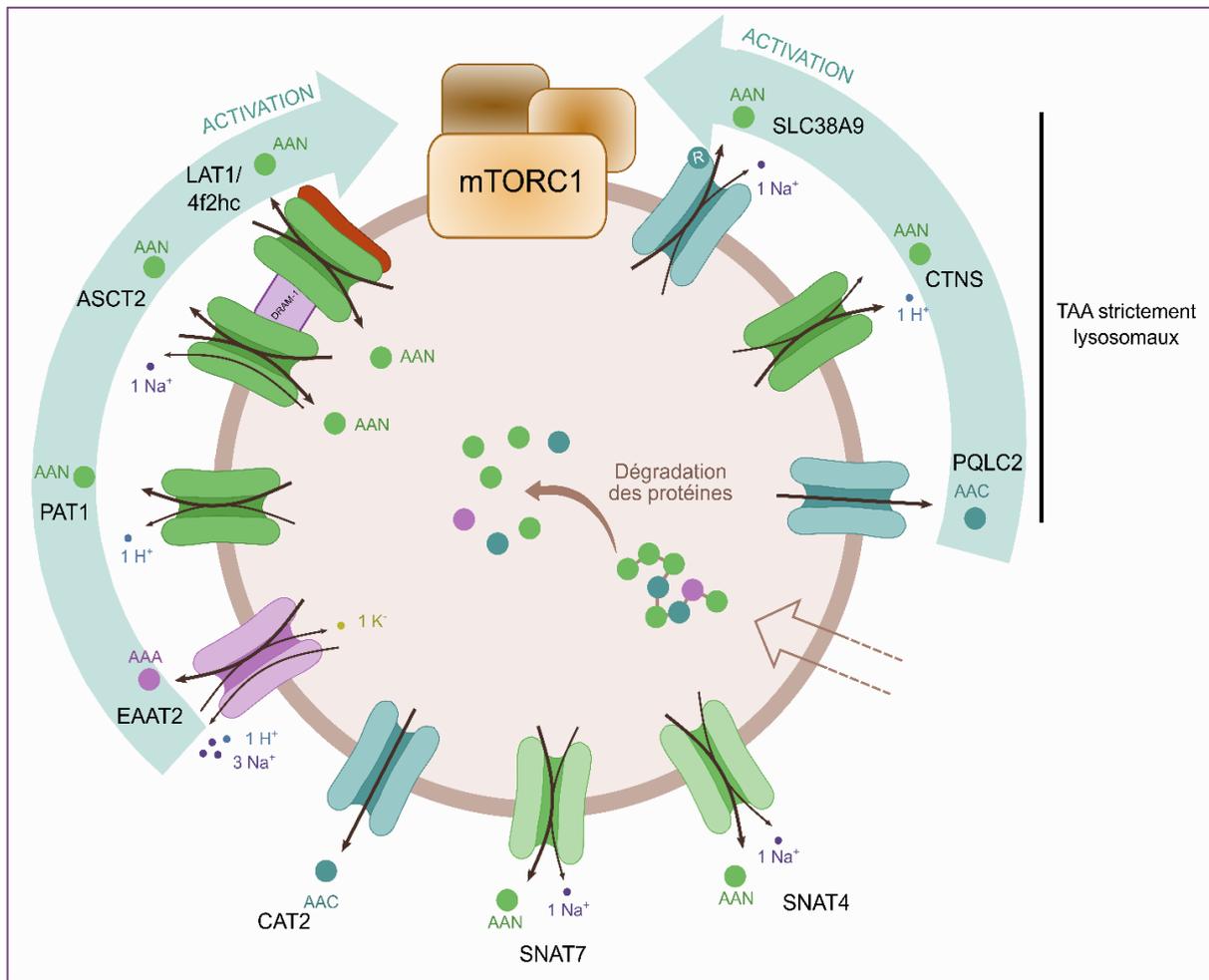


Figure 13 : Ensemble des TAA retrouvés à la membrane lysosomale permettant l'efflux d'AA. Les TAA influençant l'activation de mTOR sont mis en lumière, avec une séparation des TAA lysosomaux stricts et facultatifs.

La plupart de ces TAA lysosomaux impliqués dans l'activation de mTORC1 ont été démontrés comme interagissant physiquement avec les complexes V-ATPase, Rags ou Ragulator ; ce faisant, l'efflux d'AA des lysosomes par ces TAA permettra une activation de proximité de mTORC1, que ce soit par SLC38A9¹⁴⁵, PQLC2¹⁴⁶, CTNS^{123,141}, ou PAT1¹⁴⁷. Bien que possédant une réponse finale commune, à savoir la participation à l'activation de mTORC1, ce set de TAA lysosomaux ne possède pas les mêmes mécanismes d'activation. Par exemple, PQLC2 est démontré comme impliqué dans l'activation de mTORC1 dépendante des AA, ici cationiques, mais de manière Rag-GTPase indépendante, *via* le recrutement de C9orf72

(*Chromosom 9 open reading frame 72*), un autre régulateur de mTORC1 impliqué dans le contrôle de l'autophagie¹⁴⁸. SLC38A9 est, quant à lui, nécessaire à l'activation de mTORC1 dépendante de l'arginine : la liaison de l'arginine au TAA induit un changement conformationnel de ce dernier, permettant l'efflux d'AAE comme la leucine du lysosome et l'activation de mTORC1¹⁴⁹. Cette idée de changement conformationnel d'un TAA permettant une signalisation précise a alors permis l'émergence du terme « Transcepteur », désignant un TAA qui, en plus de son rôle de transporteur, fait également office de récepteur et est impliqué dans des voies signalétiques clés^{150,126}. C'est le cas de SLC38A9, qui peut être qualifié de transcepteur. PAT1, autre TAA lysosomal*, est également considéré comme tel car sa présence est nécessaire à l'activation de mTORC1 dépendante des AA, à priori indépendamment de ses capacités de transport^{150,142}. SLC38A9 et PAT1 ont aussi été démontrés comme coopérant pour l'activation de mTORC1 : la perte de l'un ou l'autre entraîne une diminution de l'activation du complexe mais également de l'expression de son partenaire TAA¹⁵². Finalement, ASCT2 et LAT1 ont aussi été démontrés comme nécessaires pour l'activation de mTORC1 dépendante des AA, notamment grâce à leur coopération pour l'efflux de leucine des lysosomes¹⁴³.

Ainsi, la présence de TAA à la membrane lysosomale apparaît décisive dans l'homéostasie des AA, en rendant à nouveau disponibles les AA issus de la dégradation lysosomale, mais aussi grâce à leur participation à l'activation de mTORC1 et donc, *in fine*, à l'anabolisme cellulaire.

Focus sur les TAA mitochondriaux

Une autre organelle pour laquelle la présence de TAA à sa membrane est fondamentale est la mitochondrie, où l'échange d'AA permettra de soutenir le métabolisme intermédiaire, à travers l'alimentation du métabolisme énergétique, mais aussi le bon déroulement de voies métaboliques clés**. La grande majorité des TAA mitochondriaux

* PAT1 a initialement été identifié à la membrane lysosomal, notamment grâce à son implication dans l'activation de mTORC1. Ce n'est que plus tardivement que son expression à la membrane plasmique a été démontrée, où il joue un rôle plus général dans l'absorption des AA, notamment au niveau intestinal¹⁵¹.

** Tous les TAA mitochondriaux décrits dans cette partie sont retrouvés à la membrane mitochondriale interne¹⁰⁶. Les AA passeront la membrane mitochondriale externe grâce à un canal membranaire nommé VDAC (*voltage dependent anion-selective channel*), peu sélectif et permettant le passage de la grande majorité des métabolites nécessaires à la mitochondrie, dont les AA¹⁵³.

appartient à la sous-famille SLC25, regroupant la quasi-totalité des transporteurs relatifs à cette organelle. Il s'agit, par ailleurs, de la sous-famille de SLC la plus grande qui regroupe plus de 50 membres différents¹⁵⁴. Les TAA mitochondriaux sont très spécifiques en termes de conformation et de structure, en comparaison des autres SLC. C'est pourquoi, contrairement à certains TAA de la membrane plasmique pouvant également être exprimés à la membrane lysosomale, tous les TAA mitochondriaux semblent exclusifs à cette organelle¹⁵⁵.

L'un des principaux rôles des TAA mitochondriaux est de garantir un lien entre les voies métaboliques se déroulant dans le cytosol et dans la mitochondrie, dû à la compartimentalisation de plusieurs enzymes clés¹⁵⁵. C'est, par exemple, le cas des transporteurs Ornt1-3, permettant l'échange de citrulline et d'ornithine depuis la matrice mitochondriale qui, comme illustré précédemment, constituent deux AA clés du cycle de l'urée pour la dégradation des AA et l'excrétion d'urée^{106,109} (Figure 14). De la même manière, AGC1/2 échangent de manière obligatoire du glutamate contre de l'aspartate et permettent alors le maintien de la navette malate/aspartate qui, en coopération avec le transporteur de malate SLC25A11, permettra le « transfert » d'équivalents réduits $\text{NADH}+\text{H}^+$ vers la matrice mitochondriale^{106,109} (Figure 14).

D'autres TAA mitochondriaux existent, mais avec des liens généralement relatifs au métabolisme énergétique. C'est, par exemple, le cas de GC1/2, qui permettent la sortie du glutamate produit par l'oxydation de la proline intramitochondriale^{106,109}, ou encore des Sidéroxiflexines (SFXN1-3), chargées de l'import de sérine impliquée dans le métabolisme monocarboné^{121,156} (Figure 14). Ces derniers pourraient, dans une moindre mesure, également transporter l'alanine, la cystéine et la glycine¹²¹. De la même manière, le transporteur de glycine SLC25A38 permet d'importer, dans la mitochondrie, cet AA notamment impliqué dans la synthèse d'hème¹⁰⁶. Un autre TAA mitochondrial, bien que non protéinogène est SAMC, transporteur important de la SAM contre son produit de dégradation, la S-adénylhomocystéine (SAH) ; échange d'AA intervenant dans les processus de méthylation de l'ADN et ARN^{106,155}. Enfin, un dernier TAA mitochondrial identifié récemment est SLC25A44, transporteur d'AA ramifiés (Valine, Isoleucine et Leucine) : l'import de ces AA et leur dégradation permettant une production d'énergie importante^{106,112}.

Bien que quelque peu redondante, cette énumération des TAA mitochondriaux met en lumière un fait : ces derniers sont très spécifiques pour un AA/groupe d'AA. Or, il manque

aujourd'hui des TAA pour le transport de la moitié des AA protéinogènes¹⁰⁶. Il apparaît en effet qu'un tiers des transporteurs mitochondriaux est considéré comme orphelin, sans aucun substrat identifié¹⁵⁴ ; illustrant l'effort de recherche encore nécessaire aujourd'hui pour caractériser et comprendre la dynamique des AA mitochondriaux.

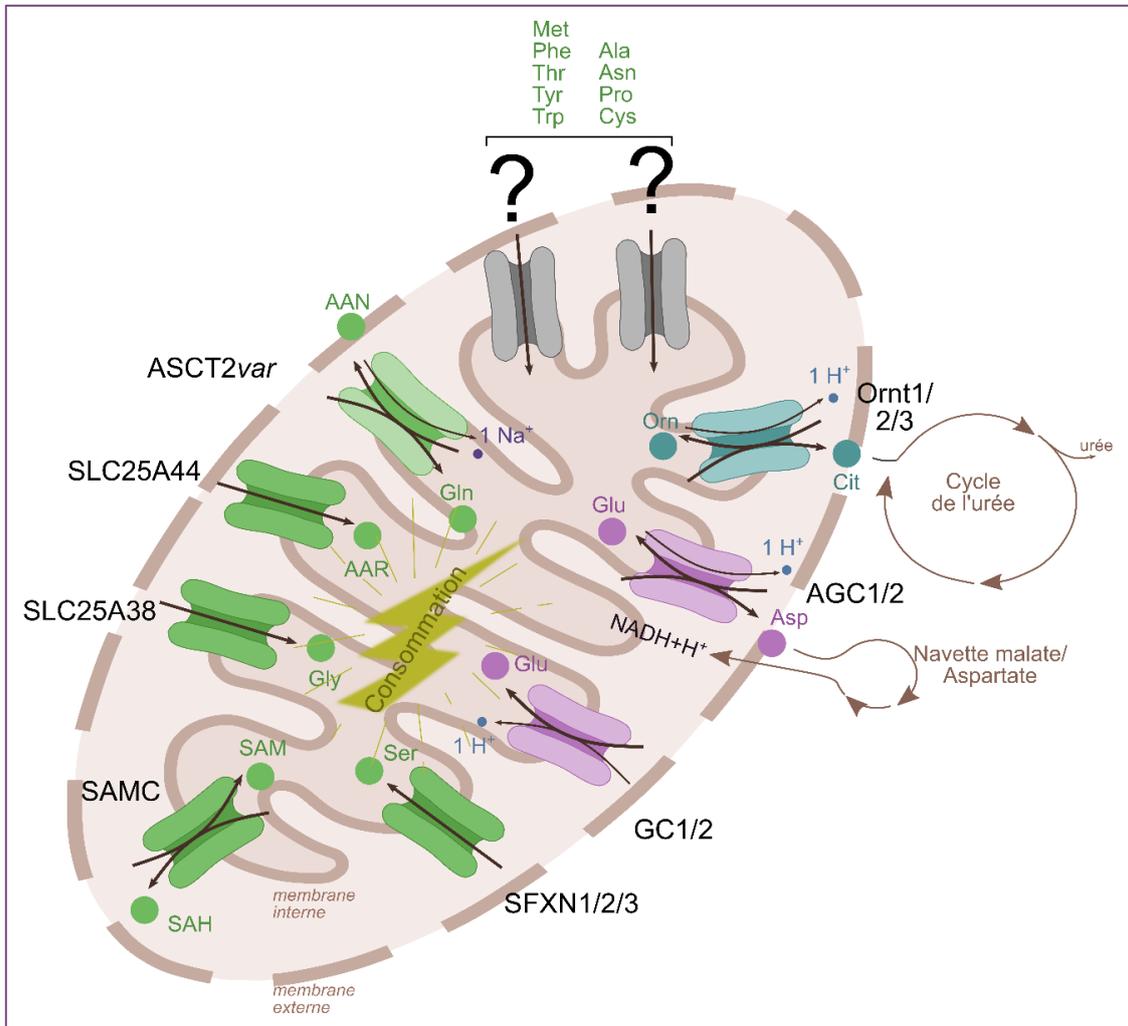


Figure 14 : Représentation des TAA mitochondriaux identifiés et de leur implication dans le métabolisme. Les TAA pour les AA non identifiés sont également spécifiés. AAR: AA ramifiés, AAN : AA neutres, SAM : S-adenosylmethionine, SAH: S-adenosylhomocystéine, Orn: ornithine, Cit: citrulline.

Récemment, une étude a identifié un nouveau TAA mitochondrial, qui serait, en réalité, un variant issu de l'épissage alternatif de ASCT2 (ASCT2var), qui aurait une localisation mitochondriale exclusive, notamment grâce à la présence d'une séquence d'adressage à la mitochondrie (*Mitochondrial targeting sequence*, MTS) dans sa séquence peptidique¹⁵⁷. Ce TAA aurait donc la même propriété de transport que ASCT2 de la membrane plasmique, avec une forte affinité pour la glutamine. Ce transporteur de glutamine mitochondrial était recherché depuis des décennies, étant donné qu'une des enzymes clés de la glutaminolyse (la

glutaminase, convertissant la glutamine en glutamate, qui, par l'intermédiaire de l' α -kétoglutarate, rejoindra le cycle de Krebs pour la production d'énergie) a une localisation mitochondriale. Cette étude a alors mis en évidence que ce transporteur de glutamine mitochondrial serait fondamental pour l'alimentation du cycle de Krebs et la production d'ATP.

Bien que relativement bien accepté par l'ensemble de la communauté scientifique^{158,159,126}, cette identification reste cependant controversée et largement remise en doute par Gyimesi et Hediger¹⁵⁶, qui ont notamment échoué à identifier quelconque MTS dans la séquence d'*ASCT2var*. Ces auteurs perçoivent aussi l'impossibilité pour ce variant alternatif d'avoir des capacités effectives de transport, étant donné que l'épissage subi par le variant le léserait de plusieurs domaines transmembranaires nécessaires à sa fonction de TAA. Cet exemple démontre la récence des sujets qui traitent des TAA mitochondriaux, illustrant, à l'occasion, les avancées requises pour identifier les TAA manquant.

Bien que les TAA lysosomaux et mitochondriaux soient les TAA intracellulaires les mieux décrits et caractérisés, il est communément admis que toutes les organelles en possèdent*. L'ensemble des TAA, qu'ils soient à la membrane plasmique ou intracellulaire, orchestrent alors le flux d'AA pour que ces derniers puissent accomplir l'ensemble de leurs fonctions. Cette partie a également illustré la place, souvent essentielle et fondamentale, qu'occupent les TAA dans de nombreuses fonctions biologiques et signalisation cellulaire. Ces deux dernières notions expliquent notamment pourquoi le défaut d'expression de bon nombre de TAA est associé à plusieurs pathologies chez les mammifères, particulièrement chez l'homme.

D. Pathologies liées aux TAA chez les mammifères

Bien que la notion de redondance entre les fonctions des différents TAA chez l'homme ait été régulièrement avancée, de nombreuses maladies sont liées à des défauts d'expression d'un seul TAA donné. Les principales raisons moléculaires responsables de pathologies décrites comme liées aux TAA sont la perte de fonctions de certains d'entre eux causées par des mutations génétiques, entraînant des défauts d'absorption ou d'excrétion d'AA, ainsi que

* Il est communément admis que de nombreux compartiments intracellulaires possèdent des TAA, notamment l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (RE), où les AA interviennent dans le processus de synthèse protéique. Cependant, très peu de description de TAA exprimés à ces organelles existent, les seuls ayant été décrit étant PAT4¹⁶⁰ et SNAT10¹⁶¹.

leur surexpression en lien avec les reprogrammations métaboliques des cellules cancéreuses. Enfin, plusieurs faisceaux d'arguments pointent vers une potentielle implication des TAA dans d'autres troubles métaboliques comme l'obésité et le diabète de type 2.

a. Pathologies liées à la perte de fonction des TAA

De manière générale, la perte de fonctions de la moitié des TAA décrits chez l'homme peut être liée à une pathologie¹⁶². La majorité des pathologies décrites sont associées aux pertes de fonctions des TAA relatifs à l'absorption intestinale ; TAA très spécifiques avec peu de recouvrement de fonctions entre eux. Parmi les principales pathologies relatives aux TAA intestinaux, la maladie de Hartnup, la cystinurie, l'intolérance aux protéines avec lysinurie sont causées par la perte de fonctions respectives de B^0AT1 ¹⁶³, $B^{0,+}AT$ ¹²⁵ et γ^+LAT1 ¹²⁵. Les symptômes liés à ces maladies sont relativement similaires, avec un manque d'absorption des AA propres au TAA manquant et une hyperaminoacidurie urinaire qui peut entraîner la formation de calculs rénaux. Pour la perte de γ^+LAT1 , un défaut de fonctionnement du cycle de l'urée est également engendré par la carence en AAC, causant une intolérance globale à un régime riche en protéines. Dans tous les cas, les symptômes de ces trois maladies peuvent être modérés par un régime alimentaire adapté et/ou des compléments alimentaires⁷⁷.

La perte de fonctions de la majorité des TAA mitochondriaux est également responsable de pathologies^{155,156}, notamment métaboliques. Par exemple, la perte de fonction de *Ornt1*, décisif dans le bon déroulement du cycle de l'urée, entraîne un défaut de fonctionnement de ce dernier et une accumulation d'ammonium dans l'organisme, conduisant à des confusions, une léthargie, et même le coma¹⁰⁹.

De la même manière, la perte de fonction de CTNS est associée à une autre pathologie : la cystinose. Ce TAA lysosomal est impliqué dans l'efflux de cystine (dipeptide de cystéine) hors du lysosome. Sa perte de fonction entraîne une accumulation de cystine dans cette organelle et perturbe ainsi son intégrité et ses fonctions relatives (autophagie, activation de mTOR, etc.). Il a notamment été démontré que la perturbation de l'activation de mTOR par l'accumulation lysosomale de cystine est responsable de la malformation des tubules rénaux et du défaut de fonctionnement des reins, principal symptôme de la cystinose¹²³. Un traitement efficace contre cette maladie est l'utilisation de cystéamine qui, en se complexant avec la cystine,

permettra la formation d'un composé pouvant être évacué par PQLC2, autre TAA lysosomal, chargé de l'efflux des AAC¹⁶⁴.

Ainsi, la perte de fonction d'un seul TAA peut provoquer des perturbations métaboliques suffisamment importantes pour nécessiter un traitement, de manière à maintenir, autant que faire se peut, l'homéostasie de l'organisme.*

b. Transporteurs d'acides aminés et cancers

Si la perte de fonction de la moitié des TAA est liée à des pathologies, il peut être schématiquement admis que la dérégulation de l'autre moitié des TAA aujourd'hui connus est effective dans les cas de cancers^{124,158}. Les cellules cancéreuses subissent des reprogrammations métaboliques induisant une forte demande en nutriments, notamment en AA, pour soutenir leur croissance et leur développement rapides^{158,165}. Cette dépendance aux AA est particulièrement marquée par le fait que la majorité des cellules cancéreuses est dite « addicte » à la glutamine, pourtant considérée comme un AANE, mais en tellement grande quantité dans les fluides circulants de l'organisme qu'elle permet de soutenir la glutaminolyse et la production d'énergie par les cellules cancéreuses^{158,18}.

Pour maintenir ce fort besoin métabolique en AA, de nombreux TAA voient leur expression augmentée dans les cellules cancéreuses, comparativement à des cellules saines. C'est notamment le cas de ASCT2 et LAT1, surexprimés dans la quasi-totalité des cellules cancéreuses^{166,167}, mais aussi très souvent accompagnés d'autres TAA comme GC1, CAT1, ATB^{0,+} xCT^{168,158} ou encore SNAT2¹⁶⁹.

L'implication des TAA, principalement décrite pour LAT1 et ASCT2, est fondamentale dans la prolifération des cellules cancéreuses. Il a notamment été démontré que la perte de fonction de l'un ou l'autre entraînait un arrêt de croissance des cellules cancéreuses¹⁶⁷. Ces TAA coopèrent en effet pour l'afflux d'AA, notamment de leucine, conduisant alors à l'activation de mTORC1¹⁶⁸, complexe également décrit pour être suractivé dans plusieurs cas de cancers¹⁶⁵.

* A noter également que des dysfonctionnements de certains TAA de la famille des EAAT, impliqués dans la neurotransmission, sont également décrits dans plusieurs maladies psychiatriques ou neurodégénératives comme la schizophrénie ou Alzheimer⁷².

Les TAA constituent alors des cibles intéressantes pour la détection de tumeurs¹³⁴ et leurs traitements par l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses *via* l'utilisation d'inhibiteurs de leur transport¹⁵⁸. Le métabolisme des cellules cancéreuses ne reposant pas uniquement sur les AA et les TAA, l'utilisation des TAA comme cibles anti-cancer apparaît plutôt comme un complément à d'autres cibles antitumorales¹⁵⁸.

c. Transporteurs d'acides aminés et diabète

Bien que la relation entre les TAA et les troubles métaboliques comme le diabète et l'obésité restent encore à éclaircir, plusieurs éléments tendent à démontrer une implication des TAA dans le développement de ces maladies. L'observation première est que le taux d'AA ramifiés circulants (leucine, isoleucine et valine) est fortement corrélé avec l'occurrence du diabète et la résistance à l'insuline chez les patients atteints de cette maladie^{170,171}. Les métabolismes du glucose et des AA étant fortement interconnectés¹⁴, il apparaît que certains TAA sont dérégulés en lien avec ce trouble métabolique, comme par exemple SNAT5 ou encore LAT1^{124,171}. Les liens directs entre TAA et occurrence de la maladie restent cependant à éclaircir, malgré des pistes sur le rôle que certains TAA peuvent jouer sur la libération d'insuline^{171,172} ou sur l'activation de mTORC1 liée au développement de la résistance à l'insuline¹⁴³.

Du fait de leur implication dans de nombreuses pathologies, la majorité des recherches liées aux TAA est relative au domaine médical⁷⁵. En terme de description de fonctions, la majorité des informations concernant les TAA est donc généralement affiliée à ce domaine et sur des modèles mammifères. De l'identification génique d'un TAA à l'étude de son expression et de ses propriétés de transport, jusqu'à son rôle biologique ou métabolique à l'échelle de la cellule, de multiples méthodes ont alors été développées pour étudier les mécanismes et fonctions des TAA.

E. Méthodes pour l'étude des TAA

Deux avancées majeures ont permis d'étudier les TAA et leur capacité de transport : le séquençage du génome et son annotation, permettant d'identifier plus de TAA potentiels par homologie de séquence¹⁰⁹, mais surtout leur clonage et leur expression dans des environnements autres pour les isoler, amenant à mieux comprendre leurs capacités de transports, leur dépendance aux ions, au pH, etc⁷⁵. Pour étudier leurs rôles fonctionnels,

l'expression hétérologue des TAA peut être réalisée sur plusieurs modèles : dans des ovocytes de xénope (*Xenopus laevis*) dans le cas des TAA de la membrane plasmique^{173,174} ou dans des liposomes reconstitués^{175,176} et organismes unicellulaires phylogénétiquement lointains (*Escherichia coli* ou *Saccharomyces cerevisiae*) pour les TAA intracellulaires¹⁰⁹.

Dans le cas des œufs de xénope, il est admis qu'ils ne possèdent pas de TAA à leur membrane. En injectant l'ARN du TAA souhaité, l'œuf sera en capacité de produire un TAA fonctionnel ; la mesure du courant entrant et de la composition intracellulaire en AA radiomarqués permet ainsi de déterminer ses capacités de transport¹⁷⁴. En jouant avec la composition ionique du milieu ou son pH, il sera aussi possible d'extrapoler les dépendances physico-chimiques des TAA. Cette méthode, utilisée pour caractériser les capacités de transport d'une large majorité des TAA, présentent toutefois certaines limites. Il est en effet difficile de conclure sur les fonctions exactes exercées par le TAA dans son environnement car ces expressions hétérologues l'isole des régulations intrinsèques qu'il subit à l'échelle de sa matrice naturelle⁷⁵. Ces conditions d'analyses, qui peuvent donc être qualifiées de peu physiologiques, expliquent peut-être pourquoi de nombreuses études sur la capacité de transport de certains TAA ne trouvent pas de consensus. C'est par exemple le cas de SNAT7 où une première étude sur des œufs de xénope a démontré un très large spectre de transport pour les AAN¹⁷⁷, tandis que, 6 ans plus tard, une autre étude démontre une sélectivité très marquée de ce TAA pour la glutamine et l'asparagine¹¹⁶. Un deuxième exemple est celui de SNAT4 pour qui un transport possible d'AAC a été mis en évidence¹⁷⁸, alors qu'à la même période et sur le même modèle, d'autres études tendent à démontrer que les capacités de transport de SNAT4 pour les AAC sont très faibles, voire nulles^{81,179,180}.

Une autre stratégie, pour étudier les fonctions biologiques des TAA, dans leur environnement, est d'utiliser des éditeurs génétiques ou des inhibiteurs spécifiques. Cependant, les inhibiteurs utilisés ne sont pas toujours aussi spécifiques qu'attendu et peuvent ainsi interférer avec d'autres TAA que la cible prévue^{75,158}. Dans le cadre de l'édition génétique, l'expression des TAA peut être temporairement réduite par l'utilisation de SiRNA (*Silencing RNA*) ou de shRNA (*short hairpin RNA*), ou complètement annulée par le biais d'outils comme Crispr-Cas9⁷⁵. Cependant, des effets compensatoires peuvent être mis en place par la cellule pour pallier au manque du TAA, et ainsi masquer l'effet phénotypique de sa perte¹⁵⁸. Il a, par exemple, été démontré qu'une élimination de ASCT2 par Crispr-Cas9

entraînait une surexpression de SNAT1 et SNAT2, par un mécanisme GCN2 dépendant¹⁸¹. En plus de ces effets compensatoires, des effets hors cible peuvent être observés lors de l'inactivation de certains gènes. Cela a notamment été reporté pour l'inactivation de LAT1 qui entraîne concomitamment une sous-expression de son partenaire 4f2hc¹⁸². Cette sous-unité de trafic étant également impliquée dans la stabilisation d'autres TAA (γ^+ LAT1-2, LAT2, xCT et Asc-1)⁸⁹, sa dérégulation impacte donc potentiellement un set de TAA plus conséquent, ce qui rend les conclusions quant à l'inactivation de LAT1 plus fragiles. Ces méthodes d'édition de gène seront en revanche très appropriées pour l'étude des TAA aux qualités de transcepteurs.

Enfin, une nouvelle manière d'appréhender l'étude fonctionnelle des TAA est de coupler les techniques précédentes à de la modélisation mathématique¹²⁸. Il est très difficile, si ce n'est impossible, de déterminer les fonctions d'un seul TAA dans des conditions physiologiques, comprenant donc la concertation avec l'ensemble des TAA. Cependant, en couplant les constantes d'affinité et les vitesses de transport déterminées par expression hétérologue à d'autres données telles que l'utilisation de différents substrats, ions et inhibiteurs, il est possible, à l'aide de modélisation mathématique, d'extrapoler les flux globaux d'AA par les TAA, et ainsi apporter de nouveaux éléments de réponse quant à leur implication, en contexte physiologique, dans les grandes fonctions étudiées.

Il n'y a donc effectivement pas, comme souvent, de méthode parfaite pour étudier les mécanismes et fonctions d'un TAA ; le couplage de toutes ces méthodes permettant tout de même d'offrir une vision d'ensemble. Outre les mécanismes intrinsèques d'un TAA, une autre manière d'appréhender les fonctions biologiques liées aux TAA est de s'intéresser à leurs modes de régulations. Les TAA sont, comme illustré jusqu'ici, au centre du maintien de l'homéostasie cellulaire des AA. Chaque contexte métabolique ne demandant pas les mêmes nécessités en AA, la régulation de l'abondance des TAA constitue une solution pour adapter le pool intracellulaire d'AA. La régulation des TAA, en cas de stress ou de changements métaboliques, est donc fondamentale pour permettre à la cellule de composer avec ce changement d'environnement et la potentielle perturbation de l'homéostasie engendrée.

III. Régulation des Transporteurs d'acides aminés

Pour s'adapter à un environnement changeant, que ce soit d'un point de vue métabolique ou de stress, les cellules possèdent plusieurs niveaux de régulation des éléments permettant leur adaptation. Parmi ces facteurs, la présence plus ou moins importante de TAA permettra d'adapter la quantité d'AA absorbés aux demandes cellulaires. Deux niveaux de régulations principaux existent pour adapter le pool cellulaire de TAA : des régulations transcriptionnelles de leurs gènes, qui permettent de moduler leur abondance, et des régulations post-traductionnelles, modulant leur activité ou leur localisation cellulaire.

A. Régulations transcriptionnelles des TAA

Pour être transcrit en ARNm, un gène doit être reconnu par l'ARN polymérase II¹⁸³. Cette reconnaissance n'est cependant permise qu'avec la participation d'autres facteurs, appelés Facteurs de Transcription (FT). Les FT reconnaissent puis se fixent sur une séquence spécifique de l'ADN, généralement dans la région promotrice, permettant *in fine* la fixation de l'ARN polymérase II et, ainsi, l'initiation de la transcription du gène cible¹⁸³. Les FT représentent le mécanisme principal de la régulation transcriptionnelle d'un gène ; ils peuvent posséder des effets activateurs ou inhibiteurs de la transcription¹⁸³. A noter également que les FT peuvent offrir des réponses différentes en s'associant à plusieurs partenaires divers. Un gène n'étant cependant pas sous la gouvernance d'un seul FT, la concertation de l'ensemble des éléments régulateurs du gène résultera d'une abondance d'ARNm spécifique. Les FT sont, quant à eux, régulés par des voies signalétiques associées qui, pour répondre aux conditions homéostatiques cellulaires et à leurs éventuels changements, contrôleront l'abondance du FT, orchestrant le programme génétique d'adaptation spécifique à chaque condition*.

Pour orchestrer cette réponse spécifique et activer (ou non) la transcription de gènes cibles, les FT reconnaissent des séquences spécifiques de l'ADN qui représentent leurs sites de liaisons et sont constitués d'une séquence nucléotidique de 5 à 11 paires de bases (pb)¹⁸⁴. Ces séquences nucléotidiques ne sont pas strictes et l'identité de certaines bases peut être

* La présence de FT est ainsi fondamentale pour la régulation transcriptionnelle d'une cellule. Leur importance est également illustrée par le fait qu'ils représenteraient 8% des protéines totales codées par le génome humain¹⁸³, avec plus de 1000 motifs différents de fixation de FT répertoriés sur la base de données développée à cet effet, JASPAR.

changée. Ces sites de liaison sont alors définis par des motifs dits « consensus », généralement représentés par des matrices de poids de positions, reflétant la probabilité relative à chaque pb de se retrouver sur chaque position du motif (Figure 15).

Dans ce contexte, plusieurs voies de régulations transcriptionnelles, liées à des FT et motifs particuliers, ont pu être identifiées pour moduler l'expression de plusieurs TAA, afin d'adapter leur abondance aux demandes cellulaires.

a. GCN2 et l'ERAA (Elément de Réponse aux Acides Aminés)

L'une des voies de régulation transcriptionnelle des TAA la mieux décrite est la régulation de leur expression par la voie GCN2 / ATF4. Cette voie signalétique, répondant à la carence en AA, a été introduite dans la partie I.C. Brièvement, cette voie de réponse permet, par l'activation du FT ATF4, de répondre à la perturbation de l'homéostasie liée à l'absence d'AA, passant donc par une surexpression des gènes relatifs au métabolisme des AA mais aussi à leur transport⁵⁷. Comme illustré dans la partie I.C., ATF4 reconnaît l'ERAA dans la région promotrice des gènes pour activer leur transcription. Plus de 234 gènes ont aujourd'hui été démontrés comme des cibles de transcription d'ATF4³⁹. Parmi ces gènes, 7 TAA sont retrouvés et souvent décrits pour être régulés par la carence en AA de manière GCN2/ATF4 dépendante : xCT, 4f2hc, CAT1, LAT1, SNAT2, ASCT2 et SLC38A9^{39,57,185-187}.

L'une des méthodes adoptées pour associer un FT à un gène défini est le séquençage CHiP (*Chromatin immunoprecipitation* ; ChIP-seq), qui permet d'identifier les interactions entre une protéine, c'est-à-dire un FT, et un gène donné. Grâce à cette méthode, ATF4 a été retrouvé en interaction avec d'autres gènes codant pour des TAA, comme SNAT7, EAAT5, GlyT1 ou ASCT1¹⁸⁸, ce qui constitue un premier élément de réponse quant à leur régulation GCN2 dépendante.

Enfin, bien qu'aucun lien direct n'ait été établi entre l'expression de ces gènes et la voie GCN2, d'autres TAA ont été démontrés comme étant surexprimés lors de carences en AA : SLC25A38, SNAT1, LAT3, CAT2, SFXN2, SFXN3, AGC2, SLC25A44 ou encore LAT4¹⁸⁹. Cela pourrait suggérer des mécanismes potentiellement GCN2/ATF4 dépendants, bien que cela n'ait pas été clairement démontré.

En prenant en compte les relations claires avec GCN2, ou potentielles par la carence en AA, il apparaît qu'un tiers des TAA humains sont transcriptionnellement régulés par la disponibilité en AA, démontrant l'implication cruciale des TAA dans le maintien de l'homéostasie des AA, et *vice versa*.

b. Stress oxydant et l'ARE (*Antioxidant Response Element*)

Le stress oxydant, causé par divers processus biotiques et abiotiques, est défini comme une perturbation de la balance oxydants-antioxydants, en faveur des oxydants, conduisant à des dérèglements de la signalisation du contrôle de l'oxydoréduction et à des dommages moléculaires¹⁹⁰. Pour répondre à ce stress, le FT NRF2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) permet d'orchestrer une réponse de lutte contre le stress oxydant, notamment en activant des gènes pour stimuler la synthèse de facteurs antioxydants¹⁹¹. La transcription des gènes cibles de NRF2 se fera également grâce à un motif consensus dans la région promotrice des gènes, l'ARE.

Un ARE est notamment retrouvé dans la région promotrice de xCT, transporteur de cystéine, AA limitant à la formation de glutathion (tripeptide de glycine – glutamate – cystéine). Le glutathion représente, quantitativement, la principale molécule antioxydante contribuant à lutter contre le stress oxydant¹⁰⁰. Ainsi, la surexpression de xCt en condition de stress oxydant permettra une augmentation de l'absorption de cystéine et, donc, une stimulation de la production de glutathion.

Des analyses ChIP-seq ont également démontré que NRF2 interagissait avec d'autres gènes de TAA, notamment MCT7 et TAUT, transporteurs de taurine, autre AA soufré pouvant participer à la formation de cystéine. NRF2 interagit également avec le gène *4f2hc*, sous-unité lourde de xCt, mais également de LAT1, avec qui NRF2 interagit aussi, bien que cette dernière interaction n'ait jamais été approfondie¹⁹².

c. Glucose et le ChORE (*Carbohydrate Response element*)

Comme illustré précédemment (partie I.B.), le métabolisme des AA et des glucides – particulièrement du glucose – sont, à de multiples étapes, reliés, notamment par le potentiel glucoformateur de plusieurs AA¹⁴. C'est sans doute pour cette raison que les TAA apparaissent comme des régulateurs importants de l'homéostasie du glucose¹⁷¹, et *vice versa*. La présence

intracellulaire de glucose active le FT ChreBP (*Carbohydrate-responsive element-Binding Protein*), qui activera, à son tour, la transcription des enzymes clés du métabolisme glucidique, notamment impliquées dans la glycolyse et la néoglucogenèse¹⁹³. Cette transcription spécifique se fait grâce à la reconnaissance d'un motif particulier, nommé ChORE.

En se liant à la séquence ChORE, ChreBP peut avoir un effet répresseur ou activateur. Bien qu'il active la transcription des enzymes du métabolisme glucidique, ChreBP a également été démontré pour exercer un effet répresseur sur l'expression de SNAT2, transporteur d'AA neutres comme la glutamine et l'alanine¹¹⁵, principaux AA glucoformateurs. Lors d'un apport important de glucose, la sous-expression de SNAT2 de manière ChreBP dépendante permettrait de réduire l'import de ces AA et, ainsi, de prévenir une alimentation trop importante du métabolisme glucidique¹⁹³.

Bien que le lien entre métabolisme glucidique et les AA ait été, à de nombreuses reprises, mis en évidence, l'effet répresseur du glucose sur SNAT2 est le seul exemple clair de régulation transcriptionnelle des TAA par le glucose. Cependant, une analyse ChIP-seq a démontré que ChreBP avait la capacité d'interagir avec 16 autres TAA¹⁹⁴. ChreBP pouvant exercer un effet répresseur tout autant qu'activateur, l'effet réel de ChreBP et de la présence de glucose sur l'expression de ces TAA reste encore à éclaircir.

d. Biogénèse lysosomale et le réseau CLEAR (Coordinated Lysosomal Expression And Regulation)

Comme évoqué précédemment, les lysosomes représentent les éléments essentiels du système de dégradation et de recyclage cellulaires³⁵. L'intégrité et la biogénèse lysosomale sont également régulées à l'échelle transcriptionnelle grâce au facteur de transcription TFEB, reconnaissant le motif CLEAR dans la région promotrice des gènes impliqués dans ces fonctions. En condition d'inactivation de mTORC1, signal d'un manque d'éléments nutritifs, TFEB sera activé et sa translocation nucléaire permettra la transcription de ses gènes cibles, favorisant ainsi les processus cataboliques et le recyclage cellulaire. Les TAA SNAT7¹¹⁶, CTNS et PAT1¹⁹⁵ ont été démontrés comme des cibles de TFEB ; leur transcription en condition d'inactivation de mTORC1 permet ainsi de favoriser l'efflux des AA lysosomaux issus de la dégradation protéique.

Deux autres TAA, MCT7 et GC1, bien que jamais répertoriés à la membrane lysosomale, ont été démontrés comme étant surexprimés suite à une surexpression de TFEB¹⁹⁶. Même si cette observation ne constitue pas un lien direct entre TFEB et la régulation de ces gènes, il se pourrait que ce FT module l'expression d'autres TAA, ou que ces TAA aient aussi une localisation lysosomale.

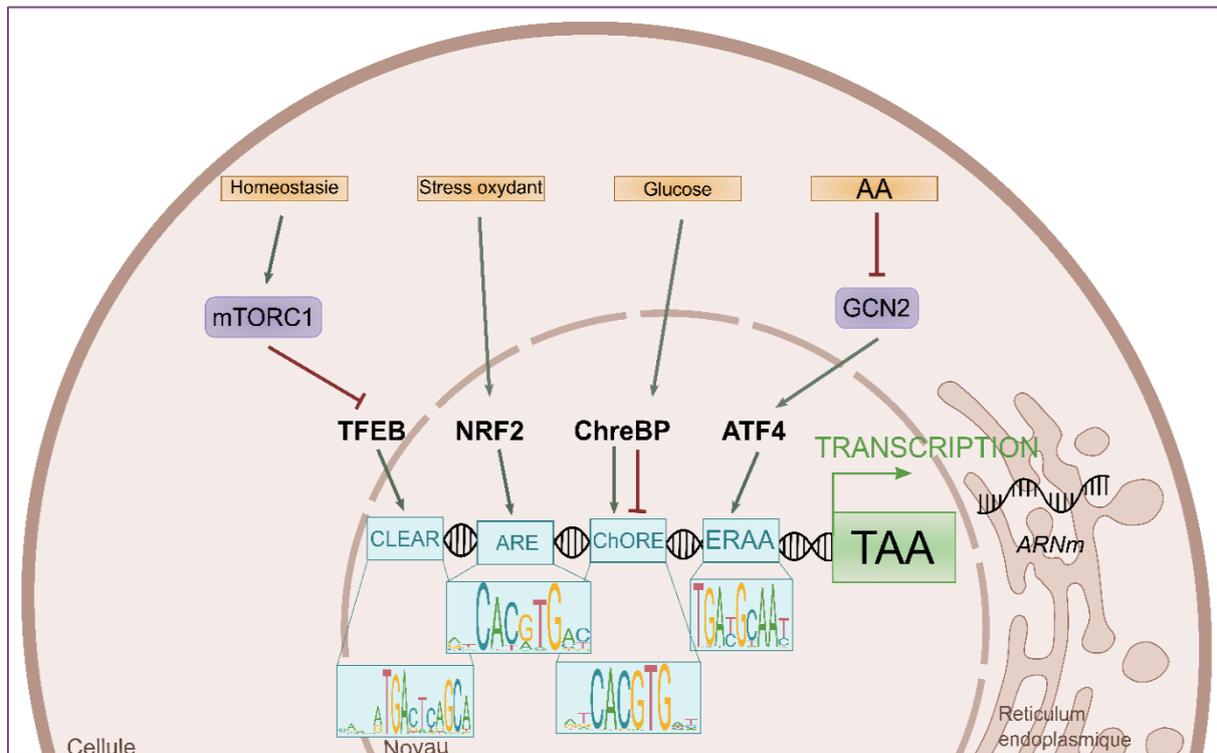


Figure 15 : Représentation des principales voies de régulations transcriptionnelles des TAA. Les éléments de réponse spécifiques à chaque facteur de transcription et leur motif consensus sont spécifiés, sous forme d'une matrice de poids de position. Les flèches vertes indiquent des effets positifs, les lignes rouges barrées indiquent des effets inhibiteurs.

Ce sera donc l'ensemble de ces FT qui orchestreront la régulation transcriptionnelle des TAA. Comme illustré dans cette partie, certains TAA sont la cible de plusieurs FT, la résultante de leur concertation permet l'expression différentielle du TAA selon les conditions cellulaires. Est également illustré dans cette partie le fait que ce sont généralement les régulations transcriptionnelles des mêmes TAA qui sont décrites, ne considérant donc pas la grande majorité des TAA répertoriés. Cette observation démontre, une fois de plus, l'effort de recherche toujours nécessaire à fournir pour caractériser les régulations de la majorité des TAA chez les mammifères. A noter que les FT peuvent également se réguler entre eux avec, par exemple, TFEB possédant pour cible ATF4¹⁹⁷ dont la transcription permettra de répondre aux conditions nutritives faibles.

La régulation transcriptionnelle des TAA constitue ainsi le premier point de contrôle, majoritaire, de leur abondance relative*. Un second levier qui peut jouer sur l'expression membranaire et l'activité des TAA est leur régulation post-traductionnelle.

B. Régulations post-traductionnelles des TAA

Une fois traduits en protéine, les TAA peuvent subir un certain nombre de modifications post-traductionnelles qui impacteront leur stabilité, leur localisation ou encore leur activité²⁰¹. Ces modifications, constituant le retrait ou l'ajout d'un groupement chimique à la protéine, peuvent être, parmi les plus décrites, des glycosylations (ajout d'une chaîne glucidique), des ubiquitinations (fixation d'ubiquitines à la protéine), ou encore des phosphorylations (ajout d'un groupement phosphate).

La modification post-traductionnelle majoritairement décrite pour les TAA est la glycosylation, permettant principalement leur localisation membranaire et leur stabilisation. Il est reconnu que la quasi-totalité des SLC, comprenant donc les TAA, sont glycosylés^{201,202}. Cependant, très peu de données explicitent les conséquences de ces glycosylations qui permettraient dans la grande majorité des cas de moduler la localisation d'un TAA en permettant son expression membranaire ; la perte de la glycosylation retenant généralement les protéines dans des compartiments intracellulaires. Ce mécanisme a ainsi pu être démontré pour GlyT1, GlyT2 ou Gat2^{203–205}. Le caractère glycosylé de 6 autres TAA a pu être démontré (SNAT4, LAT3, LAT4, ASCT2, ASCT1, Cat1)^{120,206–208}, sans qu'aucun rôle de la modification post-traductionnelle n'ait été avancée. Enfin, dans très peu de cas, les glycosylations peuvent aussi jouer sur l'activité de transport d'un TAA, sans changer sa localisation ou sa stabilité²⁰². Une étude récente a notamment démontré que le niveau de glycosylation de 4f2hc était modulé dans le réticulum endoplasmique (RE) par l'induction du stress du RE. L'augmentation du niveau de glycosylation de la sous-unité permettrait ainsi une stimulation de l'activité de

* Un point non discuté dans cette partie est l'implication des reprogrammations cellulaires en lien avec le processus de cancérisation, où d'autres FT réguleront l'expression des TAA, notamment pour assurer le côté « addictive » des cellules cancéreuses aux AA. Dans ce cadre, 2 FT principaux moduleront l'expression des TAA dans les cellules cancéreuses : HIF1/2 (*Hypoxia-Inducible Factor 1/2*) et MYC (*Myc proto-oncogene protein*). C'est, par exemple, le cas de xCT¹⁹⁸, ASCT2^{var}¹⁵⁷ ou encore LAT1-4 dont la surexpression dans divers types cancéreux permettra une stimulation du métabolisme énergétique et l'activation de mTOR^{199,200}.

transport de LAT1 et xCT, contribuant au maintien de l'homéostasie cellulaire face au stress occasionné²⁰⁹.

L'ubiquitination permet quant à elle une internalisation de la protéine en vue de sa dégradation et module ainsi le pool de TAA exprimé à la membrane plasmique²⁰¹. Ainsi, l'ubiquitination a, par exemple, été démontrée pour dégrader et assurer le renouvellement de l'expression membranaire de GlyT2²¹⁰, xCT²¹¹ ou encore LAT1²¹². D'autres études ont également démontré que l'ubiquitination de EAAT2²¹³, Cat1²¹⁴, LAT1²¹² et SNAT3²¹⁵, conduisant à leur dégradation par le peroxysoxe, était, pour toutes, sous la gouvernance d'une même ubiquitine ligase, nommée Nedd4-2. Cela est particulièrement intéressant car une étude a démontré que cette même ubiquitine ligase, en charge de l'ubiquitination de SNAT2 et LAT1, était régulée de manière mTORC1 dépendante²¹⁶, sous-entendant ainsi que le pool de TAA membranaires peut être modulé à l'échelle post-traductionnelle selon le contexte nutritionnel et l'état d'activation de mTORC1. Cette observation a également été validée chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae*), où les voies homologues à mTORC1 et GCN2 chez cette espèce ont été démontrées pour réguler l'homologue de Nedd4-2 en réponse à la disponibilité en AA, de manière à internaliser, en vue de leur dégradation, 4 TAA : Mup1, Can1, Tat2 et Lup1 (transporteurs respectivement de Met, Arg, Trp et Lys)²¹⁷. Lors d'une carence en AA, GCN2 était démontré pour stimuler l'ubiquitination des TAA, tandis que mTORC1 l'inhibait, démontrant, une fois de plus, le dialogue existant entre ces deux voies signalétiques.

Enfin, les processus de phosphorylations des TAA ont, pour certains, été démontrés comme modulant, de manière rapide, leur activité de transport. C'est notamment le cas de ATB^{0,+ 218,219} et EAAT1²²⁰, où des phosphorylations sur des sites spécifiques des TAA stimulent leur activité de transport. C'est également le cas de LAT4, pour qui l'anticipation de la prise alimentaire chez des souris restreintes en aliment induit une phosphorylation du TAA, démontrée pour augmenter ses capacités de transport²²¹. Il existe d'autres exemples de phosphorylations de TAA ne conduisant pas à une stimulation de leur activité, comme pour TAUT⁹² et B^{0,+}AT²²², où la phosphorylation entraîne une diminution de leur capacité de transport. Pour VIAAT, une phosphorylation effective du TAA est observée, mais aucun rôle n'a été clairement établi quant à sa fonction²²³. Enfin, la phosphorylation de GlyT2 aurait un rôle dans l'internalisation du TAA²²⁴, tandis que celle de xCT relocaliserait le TAA de la membrane plasmique vers la membrane lysosomale²²⁵. Bien que la phosphorylation de

certaines TAA permet, de manière dynamique, de jouer sur leur activité ou encore leur localisation, les liens entre régulation post-traductionnelle et voies signalétiques impliquées restent difficiles à appréhender. Pour les TAA décrits précédemment, les phosphorylations sont liées à des protéines kinases comme PKA-B-C (*protein kinase A-B-C*), dont la régulation en aval est assez large et nécessite de nombreuses kinases intermédiaires^{226,227}. Un autre exemple de régulation post-traductionnelle non résolue est celui de SNAT2, relocalisé vers la membrane plasmique depuis des vésicules qui appartiennent au réseau trans-golgien *via* une stimulation liée à l'insuline, augmentant ainsi l'activité d'import d'AA neutres^{228,229}. Cependant, les mécanismes moléculaires de cette relocalisation, potentiellement liés à des modifications post-traductionnelles, n'ont jamais été décrits, bien que l'effet lié à l'insuline puisse sous-entendre une implication de la voie PI3K/AKT/mTOR. Enfin, un dernier exemple de régulation post-traductionnelle décrit est celui de ASCT2 et LAT1, pour qui l'activité et la localisation ont été démontrées dépendantes de l'état d'activation de mTORC1²³⁰. Bien que le lien avec mTORC1 et la modification mise en jeu n'aient pas été décrits, les auteurs tendent à penser que l'implication d'une phosphorylation serait fort probable. A noter que des sites de phosphorylations hypothétiques sont trouvés sur la majorité des TAA²³¹. Même si ces modifications n'ont pas été effectivement démontrées, ni même étudiées, cela constitue un champ de recherche très prometteur qui permettrait d'offrir de nouveaux éléments de réponses quant aux multiples leviers existant pour la régulation fine et rapide de l'activité d'un TAA, ainsi qu'à la potentielle implication des voies signalétiques liées aux AA comme mTORC1.

Les diverses modifications post-traductionnelles des TAA permettent donc de moduler de manière dynamique l'expression ou l'activité de transport des AA (Figure 16)²³². Cependant, la plupart de ces modifications sont encore mal comprises²⁰¹ ; leur conséquence ou leur régulation restant souvent encore à éclaircir. Des faisceaux d'arguments tendent néanmoins à démontrer que les conditions nutritionnelles cellulaires, notamment par l'implication de mTORC1, jouent sur ces modifications post-traductionnelles. De manière rapide, ces dernières permettent alors d'adapter constamment le pool de TAA membranaire selon les nécessités biologiques.

L'ensemble des connaissances abordées durant cette introduction se base sur des recherches menées chez les mammifères, le plus souvent chez l'Homme et la souris ; illustrant malgré tous les nombreuses zones d'ombres entourant toujours les connaissances sur les TAA.

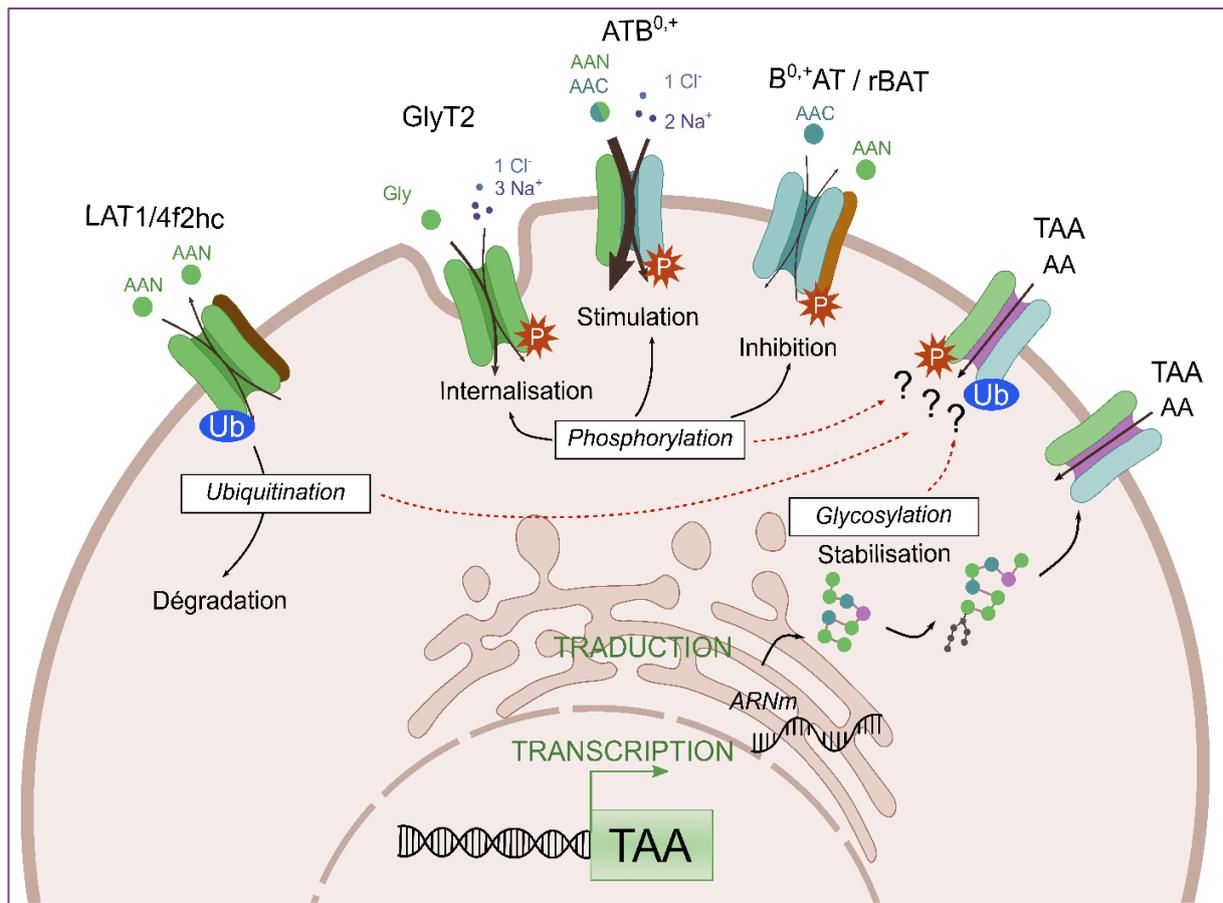


Figure 16 : Représentation des principales régulations post-traductionnelles des TAA membranaires, avec spécification des rôles possibles et majoritaires de ces modifications. Les points d'interrogations et les flèches rouges en pointillés représentent le fait que la majorité de ces modifications post-traductionnelles potentielles des TAA ne sont pas caractérisées.

Cependant, la question de la conservation de tous ces mécanismes chez d'autres modèles d'études se pose : tous les organismes vivants possèdent-ils les mêmes TAA et les mêmes modes de régulation par des voies de signalisations identiques ? Cette question peut concerner une multitude d'organismes vivants. Cette thèse, quant à elle, s'intéresse, pour des raisons explicitées dans la partie suivante, à l'étude des TAA et voies de signalisations associées chez les poissons téléostéens, plus particulièrement chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*).

IV. Homéostasie des acides aminés et transporteurs d'acides aminés chez les poissons téléostéens : focus sur la truite arc-en-ciel

La recherche sur les TAA chez le modèle mammifère a été majoritairement conduite dans le domaine médical du fait de l'implication des TAA dans de nombreuses pathologies humaines. Dans le cas de l'utilisation des poissons téléostéens, telle la TAC, comme modèles d'étude des TAA, la recherche sera cette fois-ci incitée par la place occupée par les TAA dans les fonctions biologiques liées aux AA, nutriments fondamentaux à son métabolisme, particulièrement parce qu'il s'agit d'une espèce d'intérêt agronomique pour laquelle de nombreux défis liés à l'alimentation sont aujourd'hui à relever.

A. Contextualisation : introduction à l'aquaculture et défis associés

a. Expansion de l'aquaculture dans le monde

L'aquaculture désigne toutes les activités de production, animale ou végétale, effectuées en milieu aquatique qui nécessitent la participation de l'Homme. Ce secteur permet de fournir, pour la population humaine, un apport protéique important, s'élevant à 15% de l'apport en protéines animales à l'échelle mondiale²³³. Avec une population mondiale en constante augmentation qui atteindra quasiment les 10 milliards d'individus dans moins de 30 ans²³⁴, une intensification des méthodes de productions alimentaires est aujourd'hui nécessaire. De plus, la consommation de produits animaux aquatiques est aujourd'hui en augmentation, avec une consommation apparente par habitant, à l'échelle mondiale, de 20.6kg/an en 2022, contre 9.1kg/an dans les années 1960²³³ (Figure 17). L'avantage premier de l'aquaculture est sa capacité à fournir un apport en protéine animale avec une empreinte carbone et un impact environnemental moindre, en comparaison des autres systèmes de production animale²³³.

La production aquacole est souvent mise en comparaison avec la capture de poisson par la pêche industrielle et artisanale qui fournit tout autant cet apport protéique intéressant pour l'alimentation humaine. Cependant, avec des quotas de pêche instaurés dans les années 1990

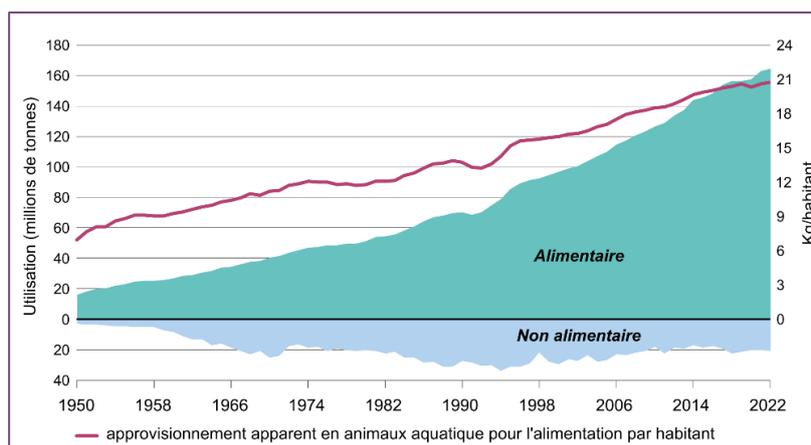


Figure 17 :Utilisation mondiale des produits issus de la pêche et de l'aquaculture, de 1950 à 2022. D'après le rapport de la FAO, 2024²³³

et une surpêche qui mène, parfois, à l'épuisement des stocks, le secteur ne semble pas aujourd'hui en mesure de pouvoir répondre à cette augmentation croissante de la demande en produits aquatiques. S'observe alors une balance entre la participation des deux secteurs, aquacole et de pêche, à la fourniture d'animaux aquatiques pour la consommation humaine. Depuis 2022, l'aquaculture fournit la majorité des animaux aquatiques pour la consommation humaine, avec une production de 94,4 millions de tonnes en 2022, représentant 51% du total mondial (Figure 18)²³³. A l'inverse, la production par capture de pêche tend à stagner depuis plusieurs années, voire même à diminuer²³³. Cette augmentation de la production aquacole est appelée à s'intensifier dans les années à venir, avec une augmentation de production estimée à 17% en 2032²³³. Aujourd'hui, la production aquacole mondiale est, en quantité, largement dominée par la Chine via l'aquaculture de la carpe chinoise (*Ctenopharyngodon idella*)²³³.

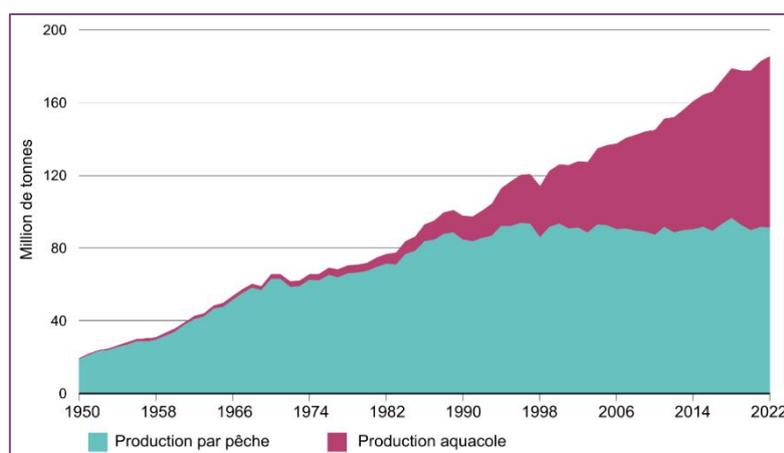


Figure 18 : Production mondiale d'animaux aquatiques par les secteurs de la pêche et de l'aquaculture, de 1950 à 2022. D'après le rapport de la FAO, 2024²³³

En Europe, notamment en France, les poissons élevés sont en grande majorité des Salmonidés, groupe auquel appartient la TAC, première espèce de poissons élevés en France²³⁵. De plus, la France est aujourd’hui le 4^{ème} importateur mondial d’animaux aquatiques²³³, ce qui suggère une demande de consommation bien plus forte que la production actuelle. En effet, bien que l’aquaculture constitue une filière prometteuse pour fournir une alimentation riche en protéines à une population mondiale croissante, la production aquacole de TAC française tend à stagner voire à diminuer depuis quelques années (Figure 19). Bien que peu d’arguments clairs soient avancés pour l’expliquer, il semblerait que les freins majeurs à son développement actuel soient associés à une faible acceptabilité sociétale, en partie liée à une compétition spatiale avec d’autres secteurs économiques et à son impact environnemental²³⁶. Face à la stagnation actuelle de la production aquacole française de TAC, des leviers sont aujourd’hui nécessaires à actionner pour maintenir et même augmenter cette production. En sachant que l’alimentation des animaux aquacoles représente plus de 70% de leur coût de production²³³, présentant en outre un impact environnemental important, adapter le régime alimentaire des TAC constitue une stratégie potentiellement pertinente pour contribuer à pérenniser et développer cette activité.

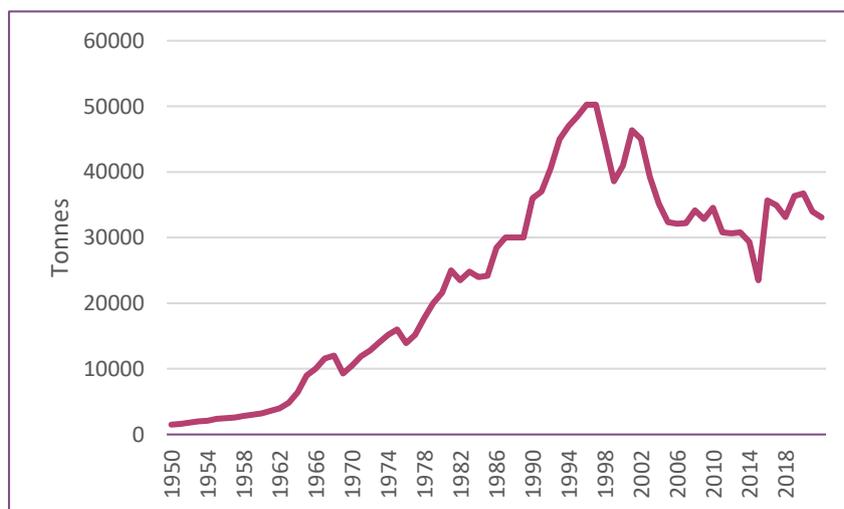


Figure 19 : Production française de truite arc-en-ciel de 1950 à 2022; données issues de FishStat, FAO²³³.

b. Alimentation de la truite arc-en-ciel

Dans le milieu naturel, la TAC est une espèce qualifiée de robuste car résistante aux changements des conditions environnementales et relativement peu sélective sur son régime alimentaire constitué d’insectes, larves et même parfois de petits poissons²³⁷. Il apparaît alors que la TAC est une espèce carnivore avec de forts besoins en protéines alimentaires²³⁸ constituant 45% de son alimentation²³⁷. Pour couvrir ces besoins, les aliments aquacoles

traditionnellement utilisés pour les TAC, et les salmonidés en général, contenaient majoritairement des huiles et farines de poissons, considérées comme les éléments les plus nutritifs et digestifs pour ces poissons^{233,239}. Ces farines sont majoritairement obtenues à partir du broyage et séchage de petits poissons pélagiques issus de la pêche minotière²³³, ce qui démontre une forte dépendance du secteur aquacole au secteur de la pêche.

Du fait d'une demande croissante et d'une fluctuation de la production mondiale, les prix des farines de poissons ont beaucoup augmenté ces dernières années²³³, de presque 200% en 30 ans (Figure 20). Cette augmentation de prix, associée à une production instable, a alors conduit à substituer ces farines de poisson par d'autres composés riches en protéines, l'un des principaux éléments de substitution utilisé aujourd'hui étant des protéines d'origine végétale. Ces nouvelles sources protéiques ont permis de réduire significativement l'inclusion des farines de poisson dans l'alimentation des salmonidés, passant de plus de 65% du régime total en 1990 à moins de 15% en 2016²⁴⁰ (Figure 21). Cependant, cette diminution d'inclusion n'a pas contribué à minimiser leur production, relativement constante depuis les années 2000 (Figure 22). Ainsi, même en diminuant leur inclusion, le développement croissant de l'aquaculture observé aujourd'hui conduit à une utilisation des farines de poisson toujours équivalente, d'où la nécessité de diminuer encore leur usage.



Figure 20 : Evolution du prix des farines de poissons (Dollar/tonne) depuis 30 ans. Données issues de la base de données IndexMundi²⁴¹.

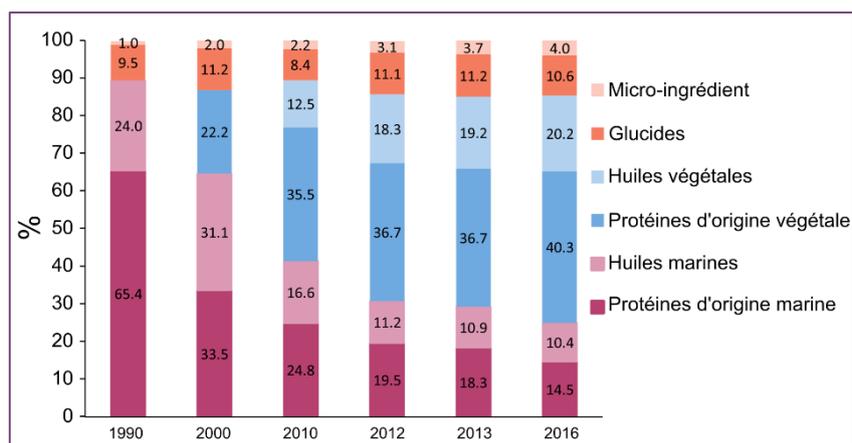


Figure 21 : Inclusion (%) de diverses sources d'ingrédients dans le régime alimentaire des saumons norvégiens aquacoles, de 1990 à 2016, d'après Aas et al. 2016²⁴⁰.

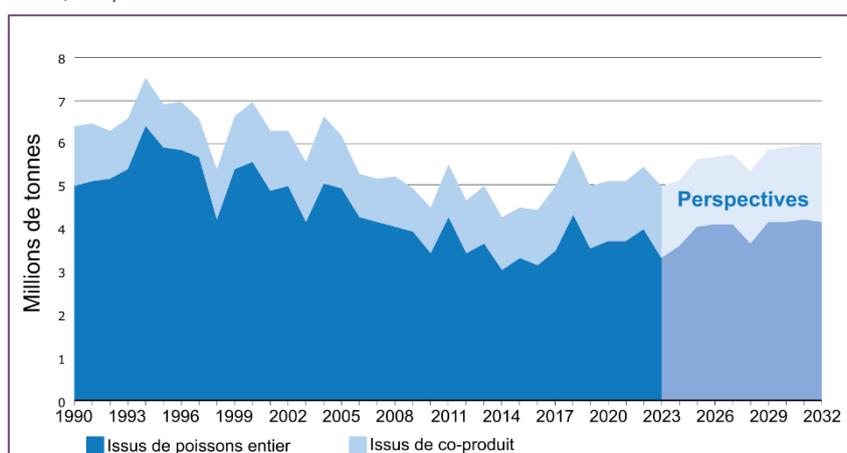


Figure 22 : Production mondiale de farines de poisson de 1990 à 2023 et projections estimées pour les 10 prochaines années, d'après la FAO 2024²³³.

c. Nouvelles sources protéiques : des avantages mais aussi des inconvénients

Si le taux d'inclusion des farines de poisson* dans les régimes des salmonidés a fortement diminué ces dernières années, un remplacement total de ces dernières par des farines végétales n'est toujours pas effectif. L'explication majeure ? C'est le fait que des régimes entièrement végétaux conduisent à des défauts significatifs de croissance^{242,243}. Pour expliquer ces défauts de croissance, souvent accompagnés d'une altération de la santé globale du poisson²⁴², de multiples éléments de réponses ont été avancés : la présence de facteurs antinutritionnels dans les protéines végétales qui interfèrent avec l'assimilation des nutriments^{244,245}, une haute teneur en glucides non digestibles pour des poissons

*Ici ne sont abordés que les problèmes liés aux protéines à travers la substitution des farines de poissons par des farines végétales. Un autre challenge devant être relevé par le secteur aquacole est sa forte dépendance aux huiles de poisson, de même provenance que les farines. Ces huiles sont très riches en acides gras polyinsaturés à longue chaîne et leur substitution complète par des huiles végétales ne permet pas aujourd'hui de couvrir les besoins nutritionnels des salmonidés²⁴².

carnivores^{242,246} mais aussi un déséquilibre du profil en AA de ces protéines végétales, comparativement aux farines de poisson^{247,248}.

En effet, bien que riches en protéines pour la plupart, les profils en certains AA des farines végétales tendent à être déséquilibrés pour les besoins nutritionnels de la TAC, comparativement aux farines de poisson²⁴⁷. Cela est notamment vrai pour certains AAE, comme la lysine et la méthionine, déficients pour les besoins de la TAC dans la majorité des protéines végétales communément utilisées comme substituts aux farines de poissons dans les aliments aquacoles (Tableau 3). A noter également que, pour certains AANE, l'inverse est observé, notamment pour la cystine (dipeptide de cystéine) et le glutamate qui peuvent atteindre, pour certaines sources, des teneurs 2 fois plus importantes qu'une farine de poisson (Tableau 3).

Tableau 3 : Profils en AA (% de protéine totale) de différentes farines végétales communément utilisées comme aliment aquacole, comparativement au profil en AA des farines de poissons. Les cases jaunes signifient une teneur plus faible, tandis que les cases mauves signifient une teneur plus élevée.

		Farines					
		Poisson ²⁴⁹	Tournesol ²⁵⁰	Coton ²⁵¹	Maïs ²⁵²	Soja ²⁵³	Colza ²⁵⁴
AANE	Ala	6.1	4.3	4.4	8.5	4.4	4.3
	Asp	8.7	8.8	9.2	5.8	11.3	7.1
	Cys-Cys	0.8	1.7	1.7	1.8	1.6	2.4
	Glu	12.6	18.9	19	20.1	17.8	17
	Gly	5.9	5.6	4.1	2.5	4.2	5
	Pro	3.8	4.2	3.6	8.7	5	6
	Ser	4	4.2	4.2	4.9	4.7	4.4
AAE	Arg	5.8	8.1	11	3	7.3	5.8
	His	2.2	2.4	2.9	2	2.7	2.7
	Ile	4.3	4.1	3.1	4	4.6	4
	Leu	7	6.2	5.6	15.9	7.6	6.8
	Lys	7.5	3.5	4	1.7	6.2	5.3
	Met	2.8	2.3	1.4	2.4	1.4	2
	Phe	3.8	4.4	5.2	6.1	5.1	3.9
	Thr	4.1	3.6	3.1	3.3	3.8	4.3
	Trp	1.1	1.3	1.2	0.5	1.4	1.2
	Tyr	2.9	2.3	2.7	4.8	3.5	2.8
	Val	4.9	4.9	4.7	4.5	4.8	5.1

Considérant la place essentielle des AA dans la biologie de l'organisme, particulièrement pour des espèces carnivores comme la TAC, les carences en AA engendrées par un régime entièrement constitué de farines végétales entraînent donc des retards de croissance des

animaux^{255,256}. L'une des stratégies qui peut être adoptée est de diversifier les sources protéiques végétales de manière à mieux couvrir les apports en chaque AA^{238,248}. Outre cette possibilité, une deuxième stratégie, pour rééquilibrer les apports en AA d'un régime à base de plantes, est d'apporter sous forme cristalline les AA manquants aux régimes végétaux^{255,257}, notamment la lysine et la méthionine ajoutées de manière routinière aux aliments aquacoles. Cependant, il apparaît que cette substitution n'est toujours pas totalement efficace, notamment à cause d'une asynchronie de biodisponibilité des AA cristallins comparativement aux AA inclus aux protéines²⁵⁸. En effet, en plus d'apparaître plus rapidement dans le plasma des poissons^{259,260}, les AA purifiés, lorsqu'ils sont supplémentés aux régimes végétaux, induisent une augmentation de l'excrétion d'ammonium par le poisson^{261,262}. Ce produit de dégradation des AA sous-entend alors que ces AA supplémentés individuellement ne sont pas efficacement absorbés et ne participent pas réellement au métabolisme des animaux : le rééquilibrage du profil en AA des farines végétales par des AA cristallins ne résout alors toujours pas le déséquilibre des farines végétales pour l'alimentation des salmonidés.

Ainsi, bien que constituant une stratégie prometteuse, le remplacement total des farines de poissons par des farines végétales ne permet toujours pas de couvrir réellement les besoins nutritionnels des poissons d'élevage*. Malgré un effort de recherche conséquent, le déséquilibre des profils en AA de ces nouvelles sources protéiques participe aux baisses de performance de croissance de la TAC, en dépit d'un rééquilibrage théorique avec des AA purifiés. Comme illustré dans les parties I.B. et I.C., les AA possèdent de nombreux rôles fonctionnels aux niveaux métabolique et signalétique. Si un régime déséquilibré en AA entraîne un retard de croissance des TAC, il paraît fort probable que leurs rôles métabolique et signalétique soient affectés. mTOR et GCN2 étant deux voies ressentant les AA et contrôlant l'homéostasie cellulaire, étudier leur implication dans la diminution de performance de croissance observée chez la TAC, en condition de déséquilibre d'AA, permettrait de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux phénotypes observés. Qui plus est, ces voies

* La substitution des farines de poisson par des farines végétales constitue la stratégie majoritaire étudiée aujourd'hui, notamment par la qualité disponible et bon marché de ces matériaux végétaux²⁴². D'autres alternatives de farines riches en protéines sont également investiguées, notamment *via* l'utilisation de coproduits animaux, de farines d'insectes ou d'organismes unicellulaires (levures, micro-algues...)²⁶³. Bien que novatrices, ces nouvelles technologies restent encore jeunes et de multiples ajustements sont toujours nécessaires pour les rendre aussi prometteuses que la substitution par les farines végétales.

étant régulées par les TAA et les régulant, il se pourrait qu'un déséquilibre en AA influe aussi sur leur régulation, contribuant ainsi au dérèglement de l'homéostasie des AA qui, *in fine*, perturberait la croissance des TAC.

B. Signalisation des AA chez les poissons téléostéens et la truite arc-en-ciel

Si les régimes végétaux sont déséquilibrés en AA et induisent un retard de croissance, alors, il est fort probable que les voies signalétiques liées aux AA, à savoir GCN2 et mTORC1, soient-elles aussi impactées, participant ainsi à des défauts de signalisation qui contribuent à une perturbation de l'homéostasie et donc au retard de croissance observé. Comme évoqué précédemment, les voies signalétiques mTORC1 et GCN2 sont très conservées dans le règne animal^{23,37} et sont donc retrouvées actives chez les poissons téléostéens, notamment la TAC^{264,265}. Il convient cependant de noter que quelques différences de fonctionnement et/ou d'activation chez les téléostéens peuvent être relevées, comparativement aux mécanismes décrits chez les mammifères.

a. mTOR chez les poissons téléostéens

Dans son contrôle de la balance entre catabolisme et anabolisme cellulaire, mTORC1 ressent l'ensemble du statut énergétique et nutritif de la cellule. Un régime équilibré permettra alors de soutenir l'activation de mTORC1 et ainsi promouvoir l'anabolisme cellulaire. La voie mTOR ayant été très conservée durant l'évolution, la majorité des cibles de phosphorylation de ces effecteurs est existante chez la TAC, en comparaison des mammifères²⁶⁴. Qui plus est, tout comme chez les mammifères, un traitement à la rapamycine permet d'inhiber mTORC1 et ses cibles de phosphorylation²⁶⁶, illustrant la conservation de ce mécanisme chez la TAC et rendant également possible l'utilisation des outils, largement développés chez les mammifères, pour l'étude de l'activation de la voie mTOR chez cette espèce

Comme sur le modèle mammifère, une activation progressive postprandiale de mTORC1 peut être observée chez la TAC^{264,266}, notamment dépendante de la quantité de protéine ingérée : plus cette quantité est importante, plus l'activation de mTORC1 le sera²⁶⁷. L'une des

différences majeures entre l'activation de mTORC1 chez les mammifères et chez la truite est le délai de réponse observé, plus de 2 fois plus long chez la TAC^{264,268} *.

Une seconde source de divergence de l'activation de mTORC1 chez la TAC, comparativement aux mammifères, est son apparente insensibilité au glucose. En effet, deux études indépendantes ont échoué à montrer de quelconques effets d'une élévation du glucose sur l'activation de mTORC1^{266,269}. La TAC ayant été reconnue à de multiples reprises comme mauvaise utilisatrice de ce nutriment, cela pourrait expliquer les divergences de réponse comparativement aux modèles omnivores.

Le statut d'activation de mTORC1 est, chez la TAC, dépendant de l'apport nutritif. S'est alors posé la question de savoir quels nutriments activaient mTORC1. Dans ce contexte, il a pu être démontré, *in vitro*, que mTORC1 était activé par l'insuline et les AA, avec un effet synergique observé^{264,270} ; observation comparable aux descriptions réalisées chez les mammifères. Cette activation de mTORC1 par les AA, de grand intérêt dans le cadre de cette thèse, a ainsi pu être démontrée à plusieurs reprises chez la TAC^{266,268,269}, avec tout de même une implication plus forte des AAE²⁶⁸, en accord avec les observations réalisées chez les mammifères.

Tous les AA n'activeraient cependant pas mTORC1 de manière identique chez la TAC (comme chez l'Homme). Une étude a ainsi mis en évidence un effet marqué de la leucine sur l'activation de mTORC1, faible pour la méthionine et inexistant pour la lysine²⁷⁰. D'autres études *in vitro* ont cependant pu mettre en évidence un rôle clair de la méthionine²⁷¹, de l'arginine et de la lysine²⁷² dans l'activation de mTORC1, également en lien avec une soutenance générale de la prolifération cellulaire. Cette divergence de résultats pourrait potentiellement s'expliquer par les temps de stimulation de la voie, calqués sur le modèle mammifère pour la première étude et plus long pour les suivantes, potentiellement plus en accord avec les cinétiques d'activation précédemment décrites²⁶⁸. C'est aussi ce dernier point qui expliquerait pourquoi certaines études n'observent aucun effet d'un régime déficient en

* Le temps d'activation de mTORC1 plus long chez la TAC pourrait s'expliquer principalement par la température corporelle du modèle : la TAC ne thermorégule pas sa température interne qui est donc identique à celle de son milieu extérieur, d'environ 18°C, contre 37°C chez les mammifères. En règle générale, tous les processus métaboliques et enzymatiques des poissons téléostéens sont plus longs que chez les mammifères.

AA sur l'activation de mTORC1 : en sus d'autres facteurs confondants non identifiés, certains temps d'échantillonnage pourraient se trouver en limite de cinétique²⁷³⁻²⁷⁵ *.

Le débat sur les AA activateurs de mTORC1 étant toujours d'actualité chez les mammifères, il apparaît également effectif chez la TAC. Bien que l'activation de mTORC1 chez cette espèce soit relativement bien établie pour les AA connus chez l'homme (arginine, méthionine et probablement leucine), d'autres AA tendent à se rajouter à la liste. C'est notamment le cas des AA ramifiés comme la valine dont l'injection intracérébrale a été démontrée pour augmenter le statut de phosphorylation de mTORC1^{277,278}. Cependant, cette étude n'a pu démontrer un effet de la valine sur le statut de phosphorylation des effecteurs en aval de mTORC1, comme S6 ou S6K1²⁷⁷. A l'inverse, une autre étude menée cette fois-ci sur la perche chinoise (*Siniperca chuatsi*) a montré un effet inhibiteur de la valine sur le statut de phosphorylation des cibles de mTORC1²⁷⁹, illustrant la récence du domaine et les approfondissements nécessaires pour caractériser la régulation de mTORC1 par les AA chez les poissons, particulièrement chez la TAC.

Enfin, une dernière idée intéressante, quant à l'implication de mTOR dans le contrôle de l'homéostasie des AA chez la TAC, est sa probable implication dans le contrôle de la prise alimentaire. Les trois études précédemment citées mettent en parallèle l'activation de mTORC1 par des injections intracérébrales de leucine et la diminution de la prise alimentaire²⁷⁷⁻²⁷⁹, mécanisme également démontré chez le modèle mammifère²⁸⁰. Qui plus est, une autre étude menée chez le turbot a démontré qu'un traitement chronique à la rapamycine, inhibiteur de mTORC1, induisait effectivement une diminution du statut de phosphorylation de la kinase et de ses cibles, mais était également accompagné d'un poids moyen des poissons bien plus bas, malgré une prise alimentaire plus importante²⁸¹. Si l'activation de mTORC1 par la présence d'AA régule la croissance cellulaire mais aussi la prise alimentaire, les perturbations de son activation par les régimes végétaux pourraient, au moins en partie, expliquer les défauts de croissance observées chez des TAC nourries avec un régime 100% végétal.

* Un autre point consolidant la conservation de mTORC1 chez la TAC, comparativement aux mammifères, est sa fonction dans l'induction de la lipogénèse, *via* une stimulation de la transcription des enzymes associées, relativement comparable aux descriptions faites sur le modèle mammifère^{266,276}.

b. GCN2 chez les poissons téléostéens

Bien que mTORC1 constitue la voie signalétique clé de détection des AA pour la promotion de l'anabolisme cellulaire, GCN2 représente quant à elle la voie fondamentale pour répondre à la carence en AA. Pour cela, un régime 100% végétal, déséquilibré en AA, devrait théoriquement influencer sur l'activation de cette voie.

Dans ce contexte, il a effectivement été observé qu'une carence en méthionine chez la TAC induisait une augmentation de la phosphorylation de eIF2 α , accompagnée d'une surexpression d'un gène cible connu de GCN2 : ASNS (asparagine synthétase)²⁷⁴. Des études *in vitro* ont également pu confirmer l'activation de GCN2 par les AA, à travers des carences totales ou spécifiques en méthionine, arginine et lysine^{268,271,272}. De la même manière, chez le perche, a été démontré qu'une carence en lysine induisait une augmentation de phosphorylation de eIF2 α et une surexpression de ATF4 *in vitro*, avec des résultats inverses pour une carence en histidine, valine et méthionine, et aucun effet notable de la leucine²⁸², illustrant ainsi la spécificité d'activation de GCN2 selon l'AA considéré. Qui plus est, l'activation pharmacologique de GCN2 par l'Halofuginone apparaît effective chez la TAC²⁶⁸, malgré des concentrations nécessaires supérieures aux reports réalisés chez les mammifères. Enfin, comme pour mTORC1, les temps d'activation de GCN2 restent plus longs chez la TAC. D'après les reports ainsi décrits, il apparaît que les mécanismes d'activation de GCN2 chez les téléostéens, donc chez la TAC, sont relativement bien conservés, en comparaison aux descriptions réalisées chez les mammifères.

Finalement, il se pourrait qu'en concertation avec mTORC1, l'activation de GCN2 par un régime 100% végétal ait également une influence sur la prise alimentaire des poissons. Chez les mammifères, une activation de GCN2 par la carence en AA diminue la prise alimentaire²⁸³. En parallèle, il a été démontré que des TAC nourries d'un régime déficient en AA mangeaient moins²⁶¹. De plus, des injections intracérébrales d'AAE (lysine, leucine) entraînent une augmentation de la prise alimentaire, en liens plus ou moins clairs avec l'activation de GCN2^{278,282}.

Bien que la relation entre régime végétal, activation de GCN2/mTORC1 et prise alimentaire reste encore à être précisément établie, il semble cependant clair que ces régimes diminuent les performances de croissance des animaux, avec une implication plus ou moins

avérée de la perturbation des voies signalétiques liées aux AA. Comme illustré précédemment dans la partie III.A, l'activation de ces voies signalétiques est régulée, et régule également, l'expression des TAA. Si ces voies sont dérégulées par un régime déséquilibré en AA, il est fort probable que c'est également le cas des TAA. Deux exemples clairs de cette association de dérégulations résident dans des études transcriptomiques réalisées sur des TAC nourries d'un régime végétal, supplémenté d'AAE cristallins^{284,285}. Dans ces deux études, un marqueur préférentiel de l'activation de GCN2 a été retrouvé surexprimé : CHOP, illustrant alors une potentielle activation de GCN2 chez ces poissons. Qui plus est, cette induction de CHOP par le régime alimentaire était aussi accompagnée d'une surexpression de plus d'une dizaine de TAA différents, pour certains répertoriés chez l'Homme comme étant des cibles de GCN2. De la même manière, une étude récente menée au laboratoire²⁷² met en parallèle l'activation de GCN2 par la carence en arginine et lysine et la dérégulation GCN2 dépendante de certains TAA cationiques (TAAC). Il apparaît alors clairement qu'en plus de perturber les voies signalétiques liées aux AA, des régimes alimentaires déséquilibrés perturbent aussi l'expression des TAA chez la TAC. Les TAA sont littéralement la porte d'entrée des AA ; étudier leur rôle et leur régulation en cas de déséquilibre en AA constitue ainsi un levier intéressant pour mieux comprendre les processus d'assimilation des AA, le contrôle de leur homéostasie et, ainsi, potentiellement proposer de nouveaux éléments de réponse quant à l'optimisation des nouveaux régimes alimentaires des animaux d'élevage, comme proposé dans la dernière étude de l'équipe²⁷².

C. Connaissances des TAA chez les poissons téléostéens et la truite arc-en-ciel

a. L'événement de duplication du génome et généralités

Du fait de l'implication probable des TAA dans les phénotypes observés en condition de régime déséquilibré en AA, mais également grâce à leur implication dans l'absorption des nutriments, quelques études se sont intéressées à l'identité, parfois à la régulation, des TAA chez les poissons téléostéens et la TAC. Grâce au séquençage de leur génome et par homologie de séquence avec les TAA mammifères, les séquences pour des TAA potentiels ont alors pu être identifiées dans le génome de certaines espèces de poissons, notamment ceux d'intérêt agronomique. A noter tout de même un point de divergence remarquable entre le génome des mammifères et celui des téléostéens : la duplication entière du génome des

téléostéens il y a 320-350 millions d'années²⁸⁶. Il faut alors s'attendre, en théorie, à retrouver dans le génome des téléostéens deux gènes codant pour un TAA humain donné (Figure 23), ces deux gènes étant alors nommés paralogues. En plus de cela, un second événement de duplication entière du génome a eu lieu chez les salmonidés, dont la TAC, chez qui ce ne seront pas deux mais quatre paralogues théoriques qui coderont pour un TAA humain donné^{286,287}.

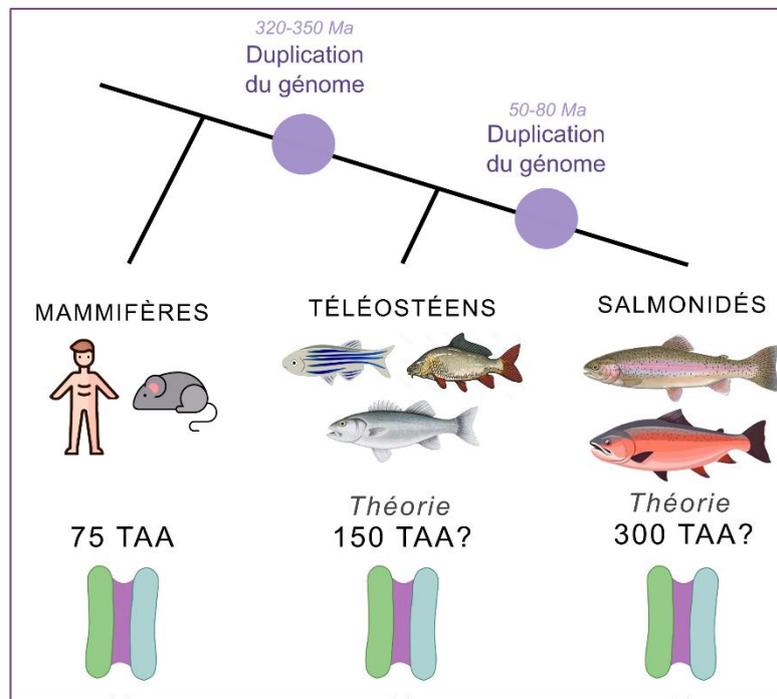


Figure 23 : Evènements de duplication au cours de l'évolution ayant conduit à un doublement théorique du nombre de gènes chez les téléostéens et un quadruplement pour les salmonidés, comparativement aux mammifères. Le nombre théorique de TAA retrouvés pour les deux groupes d'espèces est également spécifié.

Les deux espèces pour lesquelles le plus d'information sur les TAA sont retrouvées sont la TAC et le poisson zèbre (*Danio rerio*), pour qui 25 et 22 TAA (des 75 identifiés chez les mammifères) ont déjà été étudiés au moins une fois (Tableau 4), représentant respectivement 33% et 29% du répertoire connu des TAA mammifères (Figure 24). Pour les autres espèces de poissons (Tableau 4 et Figure 24), quelques études ont porté sur des TAA, mais ne constituent pas un nombre important, allant de 1 seul pour le bar européen (*Dicentrarchus labrax*), à 12 TAA pour le turbot (*Scophthalmus maximus*). A noter que les motivations de recherche pour ces espèces apparaissent relativement différentes. Pour le poisson zèbre et le médaka (*Oryzias latipes*), les études sur les TAA sont majoritairement motivées par leur qualité d'organisme modèle dans la recherche médicale, mais également d'intérêt pour des questions évolutives. Dans ces modèles d'études, les recherches concernant les TAA ont ainsi porté majoritairement sur des questions relatives au développement de l'organisme ou à de grandes fonctions biologiques, comme la neurotransmission. Pour la TAC et autres espèces d'intérêt

agronomique, au contraire, ce seront majoritairement des questions liées à la nutrition et aux défis actuels relatifs au secteur de l'aquaculture. A noter également que, bien que possédant moins de TAA identifiés au total, le poisson zèbre représente le téléostéen avec le plus de publication sur les TAA : un membre ou un sous-groupe de TAA faisant généralement l'objet d'une publication pour décrypter son rôle biologique. Au contraire, chez la TAC et autres espèces d'intérêt agronomique, moins de publications concernant les TAA sont présentes, mais ces études portent plus souvent sur un sous-ensemble plus conséquent de TAA, de manière à offrir une vision plus générale de l'effet de l'alimentation sur l'expression des TAA (Figure 25).

Tableau 4 : Répertoire des TAA identifiés chez les poissons téléostéens, en comparaison au répertoire mammifère. Les cases vert foncé indiquent qu'au moins deux publications se sont intéressées aux TAA ; les cases vertes lorsqu'il s'agit d'une seule publication. Les cases grisées indiquent une absence d'information ; tandis que les noms de TAA grisés indiquent qu'aucune information n'est retrouvée pour ce TAA, toutes espèces de téléostéens confondues. D'après^{272,274,278,288-315}

Famille	Gène	Acronyme	Truite arc-en-ciel	Poisson zèbre	Turbot	Carpe	Perche	Medaka	Tilapia	Saumon	Bar
SLC1	slc1a1	EAAT3									
	slc1a2	EAAT2									
	slc1a3	EAAT1									
	slc1a4	ASCT1									
	slc1a5	ASCT2									
	slc1a6	EAAT4									
	slc1a7	EAAT5									
SLC3	slc3a1	rBAT									
	slc3a2	4f2hc									
SLC6	slc6a2	Gat1									
	slc6a5	GlyT2									
	slc6a6	TAUT									
	slc6a7	PROT									
	slc6a9	GlyT1									
	slc6a11	Gat3									
	slc6a12	BGT1									
	slc6a13	Gat2									
	slc6a14	ATB ^α									
	slc6a15	B ^β AT2									
	slc6a17	B ^β AT3/NIT4									
slc6a18	XT2/B ^β AT3										
slc6a19	B ^β AT1										
slc6a20	SIT1										
SLC7	slc7a1	CAT1									
	slc7a2	CAT2									
	slc7a3	CAT3									
	slc7a4	CAT4									
	slc7a5	LAT1/4f2hc									
	slc7a6	y+LAT2/4f2hc									
	slc7a7	y+LAT1/4f2hc									
	slc7a8	LAT2/4f2hc									
	slc7a9	B ^α AT/rBAT									
	slc7a10	Asc-1/4f2hc									
	slc7a11	xCT/4f2hc									
	slc7a12	Asc-2									
	slc7a13	AGT1/rBAT									
	slc7a14	-									
SLC16	slc16a6	MCT7									
	slc16a10	TAT1									
SLC17	slc17a6	VGLUT2									
	slc17a7	VGLUT1									
	slc17a8	GVLUT3									
SLC25	slc25a2	Ornt2									
	slc25a12	AGC1									
	slc25a13	AGC2									
	slc25a15	Ornt1									
	slc25a18	GC2									
	slc25a22	GC1									
	slc25a26	SAMC									
	slc25a29	Ornt3									
slc25a38	-										
slc25a44	-										
SLC32	slc32a1	VIAAT									
SLC36	slc36a1	PAT1									
	slc36a2	PAT2									
	slc36a3	PAT3									
	slc36a4	PAT4									
SLC38	slc38a1	SNAT1									
	slc38a2	SNAT2									
	slc38a3	SNAT3									
	slc38a4	SNAT4									
	slc38a5	SNAT5									
	slc38a6	SNAT6									
	slc38a7	SNAT7									
	slc38a8	SNAT8									
	slc38a9	-									
	slc38a10	SNAT10									
slc38a11	-										
SLC43	slc43a1	LAT3									
	slc43a2	LAT4									
SLC56	slc56a1	SFXN1									
	slc56a2	SFXN2									
	slc56a3	SFXN3									
SLC66	slc66a1	pqlc2									
	slc66a4	CTNS									
TOTAL			25	22	12	11	8	7	5	4	1

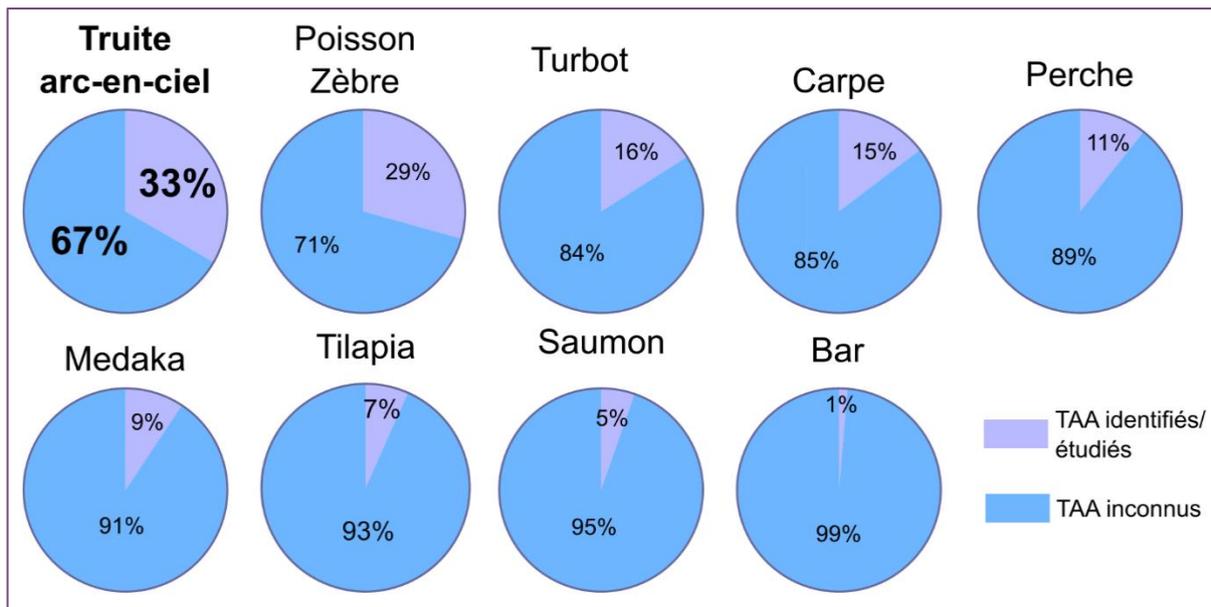


Figure 25 : Proportion des TAA étudiés/identifiés chez chaque espèce de téléostéens concernée, en comparaison au pool de TAA identifiés chez l'homme. D'après^{272,274,278,288-315}

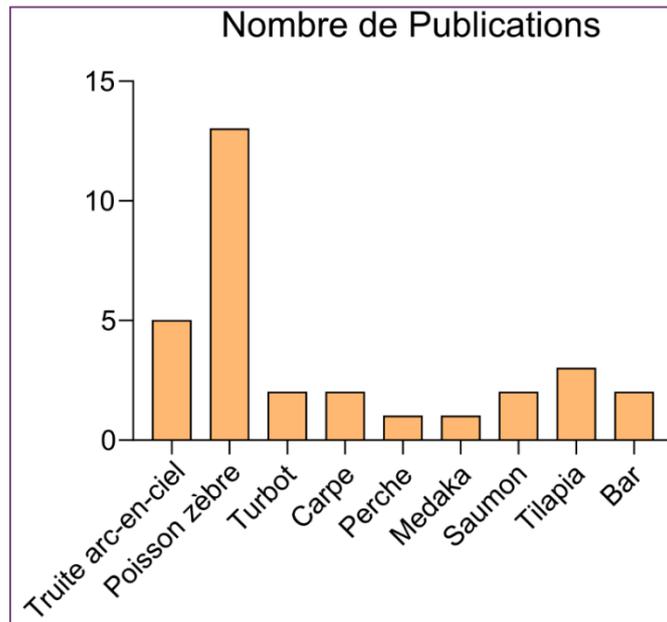


Figure 24 : Nombre de publications, pour chaque espèce de téléostéens, relatant d'un ou plusieurs TAA. D'après^{272,274,278,288-315}

b. Caractérisation des TAA dans la neurotransmission et le développement

Les études menées sur le poisson zèbre tendent à démontrer que les fonctions biologiques des TAA étudiés reprennent les mêmes principes que les descriptions réalisées chez les mammifères. Une partie de la recherche s'est portée sur le rôle des TAA dans la neurotransmission chez cette espèce, démontrant des mécanismes identiques dans les neurotransmissions glutamatergique et glycinergique²⁸⁸⁻²⁹¹, ainsi que des perturbations comportementales en cas de troubles liés aux TAA³¹⁶. De plus, des études phylogéniques ont

permis de mettre en évidence que différents paralogues de ces TAA impliqués dans la neurotransmission possèdent des localisations tissulaires différentes²⁹², ce qui illustre les potentielles diversifications de fonctions des gènes liés aux événements de duplication du génome.

D'autres études, s'intéressant principalement aux rôles des TAA dans le développement de l'organisme, ont également permis l'identification de TAA chez le poisson zèbre : implication de SNAT3 et SNAT4 dans le développement des activités du foie²⁹³, celles de CAT1²⁹⁴, TAUT²⁹⁵ et rBAT/B^{0,+}AT²⁹⁶ dans le développement embryonnaire, celle de γ LAT1 dans la fonctionnalisation des macrophages²⁹⁷ ou encore l'implication de LAT3 dans les fonctions rénales de filtration par les glomérules rénaux²⁹⁸. Dans un contexte de recherche sur le développement, une autre étude intéressante, menée cette fois sur le médaka a identifié une majorité de TAA de la famille SLC7 (de slc7a5 à slc7a11) et a démontré le rôle fondamental de γ LAT1 (slc7a7) et de LAT2 (slc7a8) dans le développement de l'asymétrie gauche-droite durant l'organogénèse²⁹⁹. Cette étude a mis en évidence que la perte de fonction de ces deux TAA entraînait une inversion de l'axe gauche-droite de certains organes, pointant également un processus mTORC1 dépendant ; observation qui, même chez les mammifères, n'a jamais été réalisée.

Le modèle poisson zèbre étant un modèle d'étude reconnu pour être adapté à la recherche médicale, le TAA mitochondrial SLC25A38 a, quant à lui, été simultanément caractérisé chez les rongeurs et le poisson pour démontrer son rôle essentiel dans le transport de glycine et la synthèse d'hème³⁰⁰. Enfin, le rôle des TAA dans des questions relatives à la nutrition et l'absorption des AA a aussi été traité chez ce modèle où une expression différentielle, le long du tractus digestif et selon le statut postprandial, a pu être démontrée pour ASCT2, B⁰AT1 et ATB^{0,+}³⁰¹ ; observation commune aux descriptions réalisées chez les mammifères.

c. Caractérisation des TAA pour leur implication dans l'absorption des AA chez les espèces d'intérêt agronomique

Dans le cas des poissons d'intérêt agronomique, la majorité des recherches relatives aux TAA a porté sur leur expression différentielle le long du tractus digestif, avec parfois des données sur les dérégulations causées par un régime végétal ou une carence. Chez la TAC, une

étude a ainsi identifié 12 TAA de l'intestin (ASCT2, rBAT, LAT1, LAT2, LAT3, LAT4, γ^+ LAT1, B⁰AT1, B⁰AT2, ATB^{0,+}, CAT3, 4F2hc) différemment exprimés selon le segment intestinal considéré³⁰². Les auteurs de cette étude ont par ailleurs tenté de mettre en parallèle ces résultats d'expression génique avec l'absorption intestinale de méthionine afin de proposer des transporteurs candidats à son absorption. Toutefois, aucun lien n'a pu être démontré, d'autant que cette étude ne prenait probablement pas en compte l'ensemble des TAA pouvant être exprimés dans l'intestin et participer à l'absorption de méthionine. D'autres études analogues ont également décrit l'expression des TAA le long du tractus digestif chez différentes espèces : B⁰AT1 chez le bar européen³⁰³ ; B⁰AT1, XT2³⁰⁴, rBAT, B^{0,+}AT³⁰⁵ et TAUT³⁰⁶ chez le tilapia (*Oreochromis mossambicus*) ; ou encore plus d'une dizaine de TAA dans le cas du turbot (B⁰AT1, LAT2, PAT1, ASCT2, SNAT2, TAT1, γ^+ LAT1, γ^+ LAT2, B^{0,+}AT, rBAT, CAT2)³⁰⁷. Dans l'ensemble, ces études se sont toutes intéressées, au moins en partie, à l'expression de B⁰AT1, probablement du fait de son implication fortement décrite chez les mammifères dans l'absorption intestinale d'un large spectre d'AA neutres. Cependant, peu de liens ont pu être mis en évidence entre l'expression des TAA et l'absorption des AA.

D'autres études concernant les TAA dans les modèles d'intérêts agronomiques ont également décrit l'expression de certains TAA dans différentes conditions physiologiques, notamment au cours de la digestion ou du jeûne. Dans ce contexte, il a par exemple été démontré que, chez la carpe chinoise, l'expression intestinale de γ^+ LAT1 était diminuée durant le jeûne³⁰⁸, tout comme B⁰AT1 et XT2 chez le tilapia³⁰⁴. De même, chez la perche chinoise, l'expression de 7 TAA a été étudiée pendant le jeûne, démontrant alors des réponses tissu-spécifiques ainsi qu'une surexpression de LAT2 et γ^+ LAT2 mais, au contraire, une sous-expression de PAT1 et 4f2hc³⁰⁹. D'autres études, plus appliquées, ont également étudié l'effet d'aliments alternatifs utilisés en aquaculture sur l'expression de certains TAA. Ainsi, a pu être démontré chez la TAC qu'un régime 100% végétal pouvait induire des dérégulations de l'expression de certains TAA au cours de la digestion, notamment EAAT3, B⁰AT1, ASCT2, PAT1 et encore B^{0,+}AT³¹⁰. De même, chez la carpe chinoise, l'expression d'une dizaine de TAA (γ^+ LAT1, γ^+ LAT2, EAAT1, EAAT2, ASCT2, ATB^{0,+}, B⁰AT1, CAT1, LAT1, LAT2 et SNAT2) a également été mesurée en réponse à un facteur antinutritionnel inclus dans l'aliment (la glycine), induisant une sous-expression pour certains TAA et mis en parallèle à une absorption intestinale d'AA moindre³¹¹. Enfin, une dernière étude chez le turbot a démontré que, sur

l'expression de 4 TAA : B⁰AT1, CAT1, PAT1 et γ⁺LAT2, les deux derniers étaient sous-exprimés par un ajout d'hydrolysate de farine de poissons, sous-entendant une potentielle surexpression dans le régime contrôle, 100% végétal³¹². L'ensemble de ces études semble alors démontrer une certaine régulation transcriptionnelle des TAA en réponse aux conditions nutritives chez les poissons, relativement en accord avec les descriptions réalisées sur d'autres modèles comme chez les mammifères.

L'expression des TAA peut donc être modulée par le régime alimentaire et conditions nutritionnelles. Cependant, peu de données existent pour expliquer ces régulations. Des études supplémentaires ont alors tenté d'avancer des éléments de réponses quant aux dérégulations des TAA par le régime alimentaire. Par exemple, chez la TAC, un régime déficient en méthionine a entraîné une surexpression des gènes de CAT1 et SNAT2, en parallèle d'une surexpression de ASNS, marqueur de l'activation de GCN2 et d'une augmentation de la phosphorylation de eIF2α²⁷⁴ ; tendant donc à démontrer une surexpression GCN2 dépendante de ces TAA. De la même manière, bien que les liens ne soient pas clairement établis, deux autres études ont tenté d'établir un lien entre la détection des AA, l'activation de GCN2 et de mTOR, et la régulation des TAA SNAT2, LAT1 et slc38a9^{278,313}.

Même si cette énumération des connaissances établies sur les TAA chez les poissons téléostéens démontre un intérêt de la communauté scientifique pour les TAA dans le contexte de la recherche agronomique, elle met aussi en lumière plusieurs faits. Premièrement, il semble que l'ensemble du répertoire de TAA des mammifères n'ait pu être couvert pour une seule espèce de poisson ; les recherches portent généralement sur les mêmes TAA, comme par exemple B⁰AT1, identifiés et étudiés sur presque toutes les espèces citées. A noter également la quasi absence de données sur les TAA intracellulaires, où seul SLC38A9 a été étudié chez le saumon³¹³. De plus, malgré un effet relativement clair du régime alimentaire sur l'expression de certains TAA, les régulations mises en jeu dans ces mécanismes restent peu étudiées, malgré l'existence de quelques résultats intéressants évoqués précédemment sur l'implication de GCN2. Il est alors clair que, comme chez les mammifères, les connaissances sur les TAA chez les poissons téléostéens font encore largement défaut. A titre d'exemple, en 2011, sur les 44 TAA identifiés chez les téléostéens, aucun n'avait été testé pour sa fonction³¹⁴.

Ce nombre n'a pas beaucoup évolué de nos jours : 1 TAA (B⁰AT1)* seulement a été cloné pour en étudier les capacités de transport³¹⁵.

Aujourd'hui, une étude de notre laboratoire offre une vision globale de l'identité des TAA et de leur régulation chez la TAC. Cette étude a permis d'établir le répertoire de tous les TAA cationiques (TAAC) potentiels retrouvés dans le génome de la truite en essayant de différencier les paralogues propres à chaque TAA²⁷². Cette étude, en plus d'analyser l'expression tissulaire des TAAC, a également mis en lumière que certains étaient régulés par des carences en AA, très probablement de manière GCN2 dépendante et que ces carences entraînaient, par la même occasion, des défauts du statut d'activation de mTORC1. Elle a également démontré que, bien que codant pour un même TAA, certains paralogues identifiés n'étaient pas du tout régulés de la même manière par la carence en AA. Cette observation est en accord avec une étude menée chez le poisson zèbre, démontrant des localisations cellulaires différentes de TAA codés par différents paralogues, illustrant ainsi la possibilité de divergences de fonction, d'expression et de régulation entre gènes paralogues^{286,287}.

Cette étude de notre laboratoire ne prend cependant en compte que les TAAC qui représentent, en terme de proportion, environ 20% des TAA identifiés chez l'Homme. Au vu de leur régulation par le statut nutritionnel et des potentielles perturbations liées aux régimes alimentaires des animaux d'élevage, il paraît aujourd'hui pertinent d'étendre cette étude à tous les TAA connus chez l'Homme. Cela permettra d'offrir une vision générale et globale de leur régulation chez la TAC et également de mieux comprendre leur implication dans l'homéostasie cellulaire des AA ; tout cela favorisant, potentiellement, l'apport de nouveaux éléments de réponse quant aux défis à actuellement relever dans le domaine aquacole pour la nutrition des animaux d'élevage.

* Cette étude des fonctionnalités de transport pour B⁰AT1 a, par ailleurs, démontré le rôle de la collectrine dans le fonctionnement du TAA dont, comme chez les mammifères, la présence stimule l'absorption d'AA par le transporteur. Cette étude démontre cependant une dépendance plus forte chez le saumon atlantique (*Salmo salar*) que chez le bar européen.

OBJECTIFS

Compte tenu des défis à relever aujourd'hui pour pérenniser le secteur aquacole, de la place des AA dans le métabolisme de la TAC et de l'importance des TAA dans l'homéostasie des AA, l'objectif général de cette thèse était d'approfondir nos connaissances sur l'ensemble des gènes codant les TAA chez la TAC : de leur identification *in silico* dans le génome jusqu'à l'étude de leur régulation par les nutriments et les conséquences relatives à ces régulations sur l'homéostasie des AA et la signalisation cellulaire associée.

Le premier objectif consistait à établir le répertoire de l'ensemble des gènes codant pour les TAA potentiels dans le génome de la TAC. Pour cela, l'approche retenue reposait sur la recherche, par homologie de séquence (BLAST), des gènes orthologues des TAA humains. Une fois identifiés, les profils d'expression de ces TAA chez la TAC ont été analysés, avec une attention particulière portée sur les organes d'intérêt dans un contexte de nutrition : l'intestin, organe de l'absorption des AA, et le foie, organe le plus métaboliquement actif à leur égard.

Afin d'approfondir notre compréhension des mécanismes en jeu dans le contrôle de l'expression des gènes identifiés, nous nous sommes ensuite reportés sur un modèle cellulaire. Ce modèle, précédemment validé pour l'étude des TAA et de leur régulation (conservant notamment les mécanismes moléculaires de signalisation par les AA)^{268,272}, possède le principal avantage de pouvoir décrypter finement les mécanismes d'intérêts en faisant abstraction des régulations systémiques survenant à l'échelle d'un organisme. La TAC représente le poisson téléostéen pour lequel le plus de lignées cellulaires sont disponibles, s'élevant à plus de 70, dérivées de multiples types cellulaire différents³¹⁷. Pour cette caractérisation, l'étude s'est portée sur une lignée cellulaire dérivée d'hépatocytes : la lignée RTH-149. Dans cette lignée cellulaire, les effets de multiples conditions nutritives sur l'expression génique et protéique des TAA ont été évalués, en intégrant également les impacts globaux de telles régulations sur la capacité d'absorption des AA et leurs rôles dans l'activation de la signalisation de mTOR.

Enfin, en intégrant l'ensemble des résultats obtenus *in cellulo*, nous avons pu proposer un modèle de régulation des TAA chez cette espèce. De plus, la participation de la voie GCN2 dans la régulation des TAA a été évaluée et les découvertes réalisées dans les cellules de TAC ont aussi

pu être globalement confirmées par l'analyse d'échantillons de foies de TAC nourries avec différents taux de protéines alimentaires.

En plus de potentiellement proposer une nouvelle stratégie d'étude des TAA, cette étude globale a permis, grâce à un couplage avec de la modélisation, de proposer un modèle théorique de régulation des flux d'AA entre le milieu intracellulaire et le milieu extérieur en conditions nutritives riches ou carencées.

L'ensemble des résultats obtenus durant ce travail de thèse fait l'objet d'une publication : « ***Dissecting the nutritional regulations of a whole amino acid transporter family from a complex genome species: A holistic approach turning weaknesses into strengths*** ». De plus, des résultats complémentaires et préliminaires seront présentés et discutés dans un second temps dans la Discussion de cette thèse.

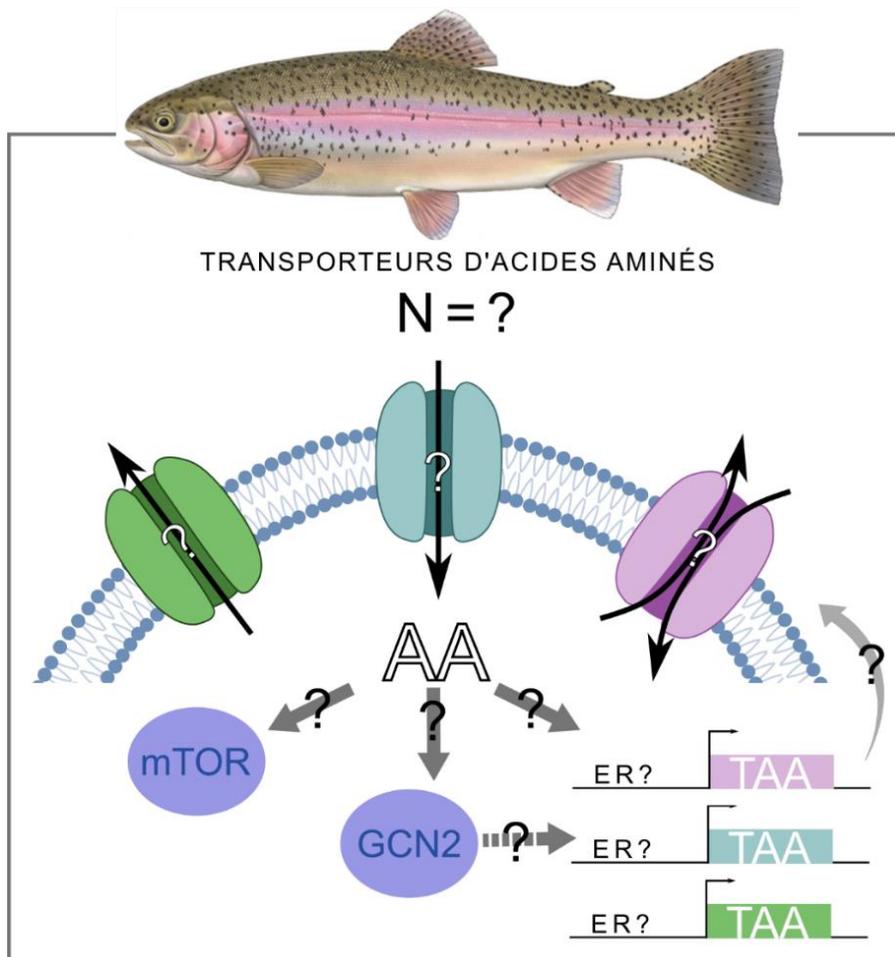


Figure 26 : Représentation schématique des principales questions posées durant ce travail de thèse ; les points d'interrogations illustrant les actuelles zones d'ombres. ER : éléments de réponse

PUBLICATION :

Dissecting the nutritional regulations of a whole amino acid transporter family from a complex genome species: A holistic approach turning weaknesses into strengths

De manière à caractériser la régulation des TAA chez la TAC et de mieux comprendre leur rôle dans l'homéostasie des AA chez cette espèce d'intérêt aquacole, l'objectif de cette étude était d'identifier le répertoire de TAA chez la TAC et d'étudier leur régulation par les conditions nutritionnelles, mais également l'influence de ces régulations sur le pool intracellulaire d'AA et leur fonction de molécules de signalisation, notamment pour la voie mTORC1.

Nous avons alors identifié, *in silico*, un total de 219 TAA dans le génome de la TAC, sur lesquels entre 119 et 174 sont exprimés dans un pool de différents tissus. Dans notre modèle d'étude, la lignée cellulaire RTH-149, les 75 TAA exprimés, couvrant 86% des TAA exprimés dans le foie, apparaissent fortement dérégulés par une carence en AA et en sérum de veau fœtal (FBS). L'ajout de ces deux composants permettant un retour à un niveau basal de l'expression de quasiment tous les TAA, il apparaît qu'une grande majorité de l'expression des TAA est dépendante de l'un et/ou l'autre de ces composés. Etant donné que cette régulation des TAA, découpée selon leur catégorie de transport (anionique, neutre et cationique), offrait une corrélation apparente entre le niveau d'ARNm, l'abondance protéique et les fluctuations intracellulaires en AA de même famille, également globalement corrélées avec les niveaux d'activation de mTORC1, nous avons poussé nos investigations en différenciant la participation des AA totaux, du FBS, des AAE, des AANE et de certains AAE spécifiques dans les dérégulations des TAA. Cet approfondissement progressif des régulations des TAA par des composés de plus en plus spécifiques a permis de noter les limites de ces corrélations apparentes précédemment observées, notamment sur l'absorption des AA et le statut d'activation de mTORC1 succédant à des carences spécifiques en AA. Cela nous a alors permis de mettre en évidence de nouveaux AA en capacité d'activer mTORC1 : l'isoleucine et la phénylalanine, jamais décrits chez la TAC et très faiblement sur d'autres modèles d'étude.

L'intégration de l'ensemble des résultats sur la régulation transcriptionnelle des TAA dans les diverses conditions nutritionnelles testées a permis l'établissement d'une classification hiérarchique des TAA selon leur régulation transcriptionnelle, contribuant à l'émergence de 3 groupes aux régulations distinctes. L'un de ces groupes est apparu spécifiquement régulé par la disponibilité en AA et de manière dépendante de GCN2. Les régions promotrices de ce groupe de TAA sont également apparues comme significativement enrichies en un motif similaire à l'ERAA identifié chez les mammifères. La réalité de ces groupes de régulation, déterminés chez les RTH-

149, a finalement pu être validé *in vivo*, dans le foie de TAC nourries avec différents taux de protéines alimentaires.

Enfin, l'intégration de la régulation des TAA avec les fluctuations intracellulaires d'AA dans toutes nos conditions expérimentales a permis de mettre en lumière de nouveaux groupes de TAA selon leur lien avec la concentration en AA ; groupes relativement proches de ceux précédemment définis selon leurs régulations transcriptionnelles. Par une approche de modélisation, la participation de ces trois nouveaux groupes de TAA à l'absorption des AA a été définie, ce qui a démontré des propriétés de transport globales distinctes pour le maintien de l'homéostasie cellulaire des AA.

Cette étude offre alors de nouveaux éléments de compréhension quant à la place occupée par les TAA pour le maintien de l'homéostasie cellulaire des AA, mais démontre également le gain de diversité de régulation acquise par la double duplication du génome de la TAC et l'émergence de paralogues. En plus de pointer vers de potentielles divergences d'AA fonctionnellement essentiels chez notre modèle, comparé aux nombreuses descriptions réalisées chez les mammifères, notre étude constitue aussi une nouvelle méthode d'analyse des régulations des TAA, globale et facile à mettre en œuvre, qui pourrait s'avérer utile pour leur étude sur d'autres espèces non conventionnelles, pour d'autres nutriments, ou encore d'autres domaines de recherche.

Dissecting the nutritional regulations of a whole amino acid transporter family from a complex genome species: A holistic approach turning weaknesses into strengths

Soizig Le Garrec^{1,*}, Karine Pinel¹, Cécile Heraud¹, Akintha Ganot¹, Vincent Veron¹, Guillaume Morin¹, Ophélie Iorfida¹, Emilie Cardona¹, Lucie Marandel¹, Anne Devin², Jacques Labonne³, Julien Averous⁴, Alain Bruhat⁴, Iban Seilliez¹ & Florian Beaumatin^{1,*}.

Correspondence: florian.beaumatin@inrae.fr, soizig.le-garrec@inrae.fr

Affiliations:

- 1- Université de Pau et des Pays de l'Adour, E2S UPPA, INRAE, NUMEA, Saint-Pée-sur-Nivelle, France
- 2- Lab Metab Energet Cellulaire IBGC CNRS, 1 Rue Camille St Saens, F-33077 Bordeaux, France
- 3- Univ Pau & Pays Adour, ECOBIOP, INRAE, E2S UPPA, St Pee Sur Nivelle, France
- 4- Univ Clermont Auvergne, INRAE, UMR1019, UNH, F-63000 Clermont Ferrand, France

Abstract

Amino acid transporters (AATs) are described as pivotal in maintaining circulating and cellular concentrations of AA via regulation of their expression in response to the cellular environment. Rainbow trout (RT), a complex genome species, is poorly described for AATs roles in controlling its predominant AA-based metabolism, despite representing a major challenge in the aquaculture nutrition field. Therefore, we identified the whole repertoire of AAT found in RT genome (>200), its expression in tissues and its nutritional regulations *in vitro*. Results garnered revealed the existence of different clusters of AATs, notably due to promoters bearing ATF4-related AA response elements. Moreover, the modeling of each AAT-specific cluster activities disclosed mTOR-related signaling functions of Ile and Phe, yet unknown in RT. Thus, novel methods and approaches herein described should help to better grasp AA homeostasis in most organisms and topics, from fish nutrition to evolution.

Introduction

In every field of biology, the concept of homeostasis is certainly one of the most important and recurrent. It could be defined as a set of vital mechanisms that enable an organism to maintain stable and optimal internal conditions for survival and normal functioning, despite recurrent changes in the external environment. Thus, the SoLute Carrier (SLC) family, which in human has over 400 members spread in more than 50 subfamilies (www.bioparadigms.org), has proved to be a key factor in maintaining homeostasis since it acts as a gatekeeper ensuring the cellular balance in ions and nutrients notably. Nonetheless, the comprehension of the role played by such family of proteins in physiological processes are still very sparse and uneven. Indeed, until recently, the SLC family was still described¹ as one of the least studied family of genes in biology and in which 30% of the studied performed were focused only on 5% of its members, demonstrating the global lack of knowledge remaining in the field. Fairly, the reasons that explain this apparent lack of focus on this family have multiple origins, such as the fact that SLC genes encode for membrane proteins, which are difficult to express, detect and purify. In addition, each SLC subfamily is made of a great number of members, each of which being in charge of the uptake/transport of one or few substrates making even more challenging the study of individual members through functional invalidation or overexpression because of compensatory mechanisms ensured by SLCs redundancy.



The Amino Acid Transporter (AAT) subfamily is a great example to highlight such issue. With more than 70 genes coding for AAT in human, this subfamily orchestrates the maintenance of circulating and intracellular AA pools within concentration ranges suitable for life. This was mainly exemplified by researches conducted in the medical field where some dysregulations of AAT were associated with the onset of pathologies² (e.g., inherited rare diseases^{3,4}, cancers⁵, type 2 diabetes⁶). Moreover, these AAT exhibit several differences notably for i) the type of AA transported (cationic - CAA, anionic - AAA and neutral - NAA), ii) the mechanism of transport (symport, uniport, antiport), iii) their ion dependencies (none or Na⁺; Na⁺/Cl⁻; H⁺; Na⁺/H⁺/Na⁺/H⁺/K⁺), iv) their cellular locations (mitochondria, lysosome, plasma membrane, golgi apparatus...) and v) their ubiquitous or tissue specific expressions^{7,8}. On top of that comes the fact that AAT family is highly dynamic in response to environmental changes especially those related to nutrients^{7,9-11}. Indeed, it was shown that a loss in nutritional AA availability led to the activation of the General Control Nonderepressible 2 (GCN2) kinase. Then, GCN2 phosphorylates the α subunit of eukaryotic initiation factor 2 (eIF2 α) on serine 51 which represses general protein translation and upregulates the translation of the activating transcription factor 4 (ATF4). Once induced, ATF4 activates transcription of several AAT genes⁸. Thus, considering that each AAT is determined by a different combination of these specificities, trying to define the AAT-dependent rules that maintain AA homeostasis in an organism by studying each AAT independently could easily be like squaring the circle, especially when knowing that it is suggested that SLCs operate as a coordinated network¹² to support efficient protein translation, metabolism and physiological functions.

As previously mentioned, most of the discoveries on AATs were established in the medical field using mammalian models where most tools, protocols and methods are available. Nonetheless, we recently demonstrated that exploring AAT in diverse research areas and using unconventional models can also be highly valuable¹³. Indeed, knowledge garnered on cationic AAT (CAAT) in Rainbow Trout (RT, a carnivorous species whose metabolism is highly dependent on AA intake) has proven to be critical in optimizing diet formulation for fish of agronomic interest, ultimately promoting a more efficient metabolic use of the newly formulated diet and reducing its costly production, as deeply required by the Food and Agriculture Organization of the United Nations¹⁴. Building on this study, we now propose to extend the research to encompass all members of the AAT family in RT. To this end, the first challenge was the complexity of the RT genome, which undergone two additional whole genome duplication (WGD) events compared to mammals. As a result, we hypothesize that more than 200 different AATs may be present in the RT genome. This means that, to overcome this challenge, it will be necessary to develop new protocols and methods that allowed the functional study of this great number of AAT in an integrated physiological cellular context and in absence of tools, especially those related to gene silencing which will be irrelevant and inefficient regarding the great redundancy of AAT in RT.

Thus, within this study, we first identified the whole AAT family present in RT genome and characterized its expression in different tissues as well as in a RT cell line. We then set-up original protocols and methods to characterize the nutrient-dependent regulations of the AAT family with a focus on AA-dependent regulations and their cellular outcomes on intracellular AA fluxes and mTOR (mechanistic Target Of Rapamycin) signaling. The overall analysis of the dataset obtained following multiple nutritional challenges to the cells enabled us to identify, for the first time in RT, the role of Ile and Phe in the activation of the mTOR pathway. Similarly, the analysis of the whole dataset proved the existence of concerted nutritional regulations of AATs expressions, in particular by those AA-dependent through the identification of ATF4-dependent regulatory sequences in their promoters, functionally validated *in vitro* and *in vivo*. Finally, the



nutritional regulations of the AAT family were combined to the dataset of AA fluxes to propose an integrated model of the role played by AAT in the maintenance of cellular AA homeostasis.

Results

Strong conservation of sequence and expression profiles of RT AATs despite major genome duplication events in this species

Genome analysis of RT revealed 219 SLC coding genes from the AAT family (Fig. 1a). If on an average each human AAT gene (72) could be represented by 3 orthologs in RT, in fact this value greatly varied from one gene to another. Indeed, 8 human genes were not found in RT genome (EAAT4, ORNT2, GC2, PAT2, PAT3, SNAT1, SNAT5 and SFXN3) while two others (EAAT6 and 7), previously shown to have been lost in mammals but kept in ray-finned fish¹⁵, were present, as 4 and 2 paralogs respectively, in RT genome. Regarding the other AAT genes, some displayed only one copy (e.g. rBAT, ATB^{0,+} or SLC38A9) or a multitude of paralogs (up to 18 when considering GAT2 paralogs). Since it was shown that part of the duplicated genes from the latest WGD are pseudogenes¹⁶, we analyzed their expression through RTqPCR by specifically designing primers for each AAT gene identified. From case to case, DNA sequences from paralogs were either sufficiently distinct to design paralog-specific primers or too similar to discriminate paralogs at the individual level. Therefore, the set of primers used could detect the expression of 1, 2 or 3 paralogs from the same gene as shown in Fig.1a and supplementary Table 1. Accordingly, in the pool of RT tissues analyzed (including stomach, gut, liver, muscle, ovary, spleen, kidney, brain and adipose tissue), we concluded that between 119 and 174 different AAT were expressed in adult RT organs. While looking at the theoretical protein identities of the AAT compared to human, we first noticed that AAT expressed are better conserved (around 70% identity) compared to those for which no expression could be detected (<60% identity, Fig. 1b). In the same way, we also noticed that anionic AAT (AAAT) are slightly, but significantly, more conserved compared to neutral AAT (NAAT) and CAAT (Fig. 1c). Similar conclusions have been drawn while looking at sequences of intracellular AAT compared to those located at the plasma membrane (Fig. S1a). Finally, proton-dependent AAT were those with the highest identities observed when looking at the ion dependencies (Fig. S1b) as well as were antiporters when considering transport mechanisms (Fig. S1c). Interestingly, while identities displayed by AAT were globally elevated, the subunits in charge of the trafficking of AAT in their membranes showed the lowest identity values that dropped to less than 45% on an average. Furthermore, while pursuing the comparison of the AAT family expressed in RT to its human counterpart, we observed that, despite uneven duplications events at individual levels, the proportions of the AAT were remarkably maintained whether considering the substrate transported (Fig. 1d), cellular locations (Fig. S1d), ion dependencies (Fig. S1e) and transport mechanisms (Fig. S1f). Altogether, these results highlighted a great conservation of RT AAT, when compared to human, regarding either their identities and their global expression profiles related to their specificities.

A global sight of the starvation-induced dysregulations on AAT expressions, activities and their related outcomes on mTOR signaling.

We recently noticed that part of the CAAT sub-family was subjected to specific regulations orchestrated upon fluctuating nutritional conditions¹³. Nonetheless, a couple of questions remained to be elucidated. Firstly, we wondered whether such regulations are also applied to the two other sub-families (AAAT and NAAT). In other words, we sought to determine if specific cellular signatures related to AAT regulations could be defined within the whole AAT family subjected to different growing conditions. Secondly, if AAT expressions are modulated, from now on, no evidence was brought that it could be correlated to an increase in AA cellular fluxes together with their outcomes on cellular processes. Thus, taking advantage



of the cell line model previously validated in our laboratory to assess the cellular aspects of nutrition in rainbow trout^{13,17,18}, a set of experiments was therefore developed to address the nutritional-regulations of AAT and their outcomes on intracellular AA pools and mTOR-related signaling events known to promote anabolism through AA-dependent mechanisms. Briefly, and as shown in Fig. 2a, cells grown for 48h in control media are first subjected to different nutritional challenges for 24h (Step1). At this stage, cells are either sampled to assess AAT dysregulations at mRNA and protein levels or subjected to 2h starvation (Step2) to empty their AA intracellular contents. Finally, following a third step (Step3) where cells were placed back in control media, intracellular AA contents were determined through UPLC analysis as well as mTOR activation pathway *via* western blot analysis. Thus, RTH-149 cells, which shared the expression of 80% of their AAT with their original tissue (Fig. S2a), were first starved from AA and serum for 24 hours prior to assess AAT expression at transcriptional and protein levels. Therefore, we observed that 76% of the AAT expressed in RTH-149 cells are subjected to starvation-induced dysregulations, the majority of which represented by significant up-regulations (46%) (Fig. 2b). In the meantime, we confirmed that these dysregulations were specifically due to the lack of AA and serum since they were largely repealed in fed-like condition consisting of a starvation media supplemented with AA and serum (Fig. S2b). Additionally, when considering the AAT identities as well as their specificities, we noticed that only NAAT and CAAT sub-families showed significant starvation-induced up-regulation profiles (Fig. 2c and Fig. S2c). Proteomic analysis of cells subjected to similar treatments only showed a trend for NAAT up-regulations and clearly confirmed that the CAAT subfamily was highly overexpressed (Fig. 2d and Fig. S2d). Since the results gathered so far pointed to starvation-induced dysregulations mainly affecting CAAT and NAAT sub-families, we then investigated whether those dysregulations could impact the intracellular AA pools and fluxes, especially those of NAAT and CAAT since it is known that AAA pool is more controlled by metabolism than transport activities¹⁹. Accordingly, cells were subjected to similar nutritional dysregulations (Step 1) prior being shortly starved (Step 2) before to be treated back with the same complete media for 10 or 240 min (Step 3) to assess the variations of intracellular AA pools dependent on transport activities and mTOR activation levels respectively. It is important to notice that, according to previous results¹⁸, the step 2 starvation duration was determined to allow a significant decrease of the intracellular essential AA (EAA) pool as well as mTOR signaling but being not long enough to drive a starvation-induced dysregulation of AAT expression which can only be detected following a minimum of 8 hours of treatment. Consequently, we showed that NAA and CAA intracellular pools were significantly increased in an AA/Serum dependent manner (Fig. 2e and 2f) while AAA were unaffected by the nutritional past of the cells compared to those that were not exposed to a starvation (Fig. 2g). Surprisingly, we noticed that all NAA and CAA did not contribute evenly to these increases. Indeed, only 8 NAA out of 15, namely Met, Val, Ile, Phe, Ser, Gly, Cys and Gln, were responsible for the elevation of the NAA pool observed following a starvation (Fig. S2e). Furthermore, the increase in CAA pool was only supported by an increase of the intracellular Lys content while Arg and His intracellular concentrations were comparable with those of cells that did not experience a starvation (Fig S2f). When considering that the absolute intracellular concentrations of one AA greatly varied to another, the analysis of the global contribution of these fluctuations within the EAA and non-EAA (NEAA) pools revealed that cells that experienced a starvation displayed a greater ability to enrich their intracellular concentrations of EAA (Fig. 2h) while the NEAA pool was globally kept unchanged (Fig. 2i). Accordingly, this increase in intracellular EAA led to an improve activation of the mTOR pathway, exemplified by the AA/Serum dependent phosphorylation levels of the S6 protein measured (Fig. 2j). Altogether, these first results tend to demonstrate that a starvation of AA and Serum controlled the expression of a vast majority of AAT, mainly NAAT and CAAT, which in turn modulated the uptake of



specific AA responsible for the activation of the mTOR pathway. Therefore, we decided to pursue our investigations on the independent roles of serum and AA in the regulation and functionalities of the AAT family.

AA availability predominantly drive the starvation-induced AAT regulations and functionalities over serum-related responses.

Following our previous observations, RTH-149 cells were starved from serum or AA to assess the regulations of AATs. We found that the response of cells starved from serum only (presence of AA in the starvation media) clearly dampened the starvation-induced dysregulations of AAT previously observed and shown as a red line in Fig. 3a. On the other hand, AA starvation (serum supplementation in starvation media) showed a completely different profile for which a multitude of AAT was more up-regulated when compared to the starvation condition (Fig. S3a). Considering the global regulations of each sub-family of AAT confirmed that the addition of AA in starvation media repressed the starvation-induced up-regulations of NAAT and CAAT (Fig. 3b), while serum addition had no effect on global NAAT expression but tended to reduce the starvation-induced up-regulation of CAAT sub-family (Fig. S3b). Again, AAT protein levels displayed global trends similar to those of their transcripts (Fig. 3c and S3c) where the only difference noticed was that CAAT protein levels were unaffected by serum availability (Fig. S3d-e). Moreover, intracellular AA contents measured following such nutritional challenges corroborated most of these observations since serum availability had no outcome on the increase of the starvation-induced NAA intracellular pool and a moderate negative effect on CAA's one (Fig. S3f and S3g respectively). However, AA availability plainly abrogated the increase of CAA intracellular pool and partially reduced NAA intracellular pool (Fig. 3d-e). Finally, and consistently with the absence of global regulations of the AAAT sub-family, no significant intracellular fluctuations of the AAA pool were observed whatever the nutritional conditions considered (Fig. 3f and S3h). Interestingly, when focusing on the intracellular contents of the 9 AA previously shown for being stimulated following a starvation, we noticed that some AA levels (Fig. S3i) were controlled by both serum and AA availabilities (e.g. Lys and Met) while Val and Gly were predominantly regulated by serum and Ile, Phe, Ser, Cys and Gln by AA availability. Altogether, the regulations of the intracellular EAA pool (Fig. 3g and S3j) appeared to be controlled by AA and Serum availabilities while only serum availability led to a significant increase of the NEAA pool (Fig. 3h and S3k). Moreover, mTOR activation levels measured following those nutritional dysregulations partially matched with the intracellular changes in EAA observed. Indeed, phospho-S6 protein levels came across being dependent on AA availability (Fig. 3i) but not on Serum availability (Fig. S3l). Such results confirmed that the AA predominantly controlled by serum, namely Val and Gly, were not involved in the AA-dependent mTOR activation observed. Thus, all these results pointed to a predominant role of AA in the starvation-induced dysregulation of AAT in RT cells which globally drove the expression of NAAT and CAAT as well as the intracellular content of some specific NAA and CAA. Accordingly, we then focused our efforts in deciphering the AA-dependent regulations of the AAT family in RT.

The specific contributions of EAA and NEAA in the regulations of AAT sub-families and their consequences on intracellular AA contents.

Since the starvation-induced AAT dysregulations appeared being predominantly driven by AA availability, similar experiments were conducted while starvation media was supplemented with either EAA or NEAA (Fig. 4a and 4b). Results showed two different profiles made of AAT regulated by both EAA and NEAA (e.g. PQLC2 a) but above all some AAT specifically regulated by EAA, positively or negatively (e.g. xCT c-d or B⁰AT2 d) as well as NEAA-specific regulations (e.g. Cat1 a-b or SNAT3 a-b). Nonetheless, at global sight, the



starvation-induced upregulations of NAAT and CAAT subfamilies were clearly repressed by EAA availability, while NEAA had no effect (Fig.4 c). On the other hand, at protein levels, such effects could only be confirmed for CAAT subfamily while NAAT levels were shown to be controlled by NEAA availability (Fig.4d and Fig. S4a-b). Of note, a significant increase in the global expression of the AAT sub-family (mainly supported by xCT c-d and EAAT1 a-c upregulations) was observed at mRNA levels but such profile was not confirmed by proteomic analysis for which EAAT1 paralogs could not be detected while xCT c expression was unaffected upon each treatment. As previously, we could notice that the intracellular pools of NAA (Fig. 4e) were brought back to those of cells that did not experience a starvation, whatever the treatment considered, while CAA pool was mainly affected by EAA availability (Fig. 4f) as well as a moderate positive effect on the AAA pool (Fig. 4g). Thus, the starvation-induced increase in Met, Ile and Phe intracellular concentrations were insensitive to EAA and NEAA supplementation, while being previously described as dependent on AA (Fig. S4c), suggesting a coordinated response involving both types of AA. On the other hand, we could see that EAA availability induced a strong decrease in the intracellular content of Gly and Lys (Fig. S4c) while it increased Val intracellular concentration. Regarding NEAA availability, it appeared that the outcomes of intracellular AA fluctuations were less pronounced since it only displayed a mild repression of the starvation-induced increase in Val, Ser, Cys and Lys intracellular concentrations while strongly increasing Gln intracellular content. According to these results, the cellular pools of EAA (Fig. 4h) and NEAA (Fig. 4i) measured in these conditions showed significant differences with a considerable drop in EAA content due to EAA availability to the expense of an increase in NEAA. However, such differences, in quantity and quality, of the intracellular pools in EAA did not fit with the mTOR activation profiles in cells (Fig. 4j) since none of the phosphor-S6 protein signals measured following EAA and NEAA supplementation in the starvation media impaired the starvation-induced enhancement of mTOR activity. These results therefore suggested that the AA-sensing machinery responsible for mTOR activation in RT cells is certainly slightly different, in terms for instance of AA detected, from the one described in mammals since none of the combined profile of known activators of mTOR recapitulated the mTOR activation levels measured. On the whole, since EAA availability had more marked effects on AAT regulations and intracellular AA fluxes compared to NEAA availability, although being not neglected, we pursued our investigations on the specific role played by 4 EAA on the regulations of AAT in RTH-149 cell line.

Single EAA starvations differentially regulate AAT expressions, activities and signaling pathways.

In our quest of dissecting the nutritional regulations of the AAT family in RT, we investigated the independent roles played by single EAA starvation by focusing on Arg, Lys, Met and Leu. Those 4 EAA were mainly picked because of their main functions in GCN2 and mTOR signaling pathways described in mammals and in fish. Moreover, Arg, Lys and Met are frequently underrepresented in plant proteins used nowadays to feed farmed fish, without really understanding the dysregulations induced by such restrictions. Thus, cells were incubated for 24h into a regular media containing all AA or deprived from one of the EAA mentioned above prior to assess the expression levels of the AAT by RTqPCR. Thus, we could observe that cells subjected to Lys or Arg starvations harbored two similar profiles for AAT expressions (Fig. 5a and 5b) where almost 50% of the AAT were up-regulated and around 30% down-regulated. Interestingly, such values were very close to the one observed upon a complete starvation (Fig. 2b) while for Met or Leu starvation (Fig. 5c and 5d respectively) very few AAT were up-regulated (20% each). On the other hand, Met starvation caused the downregulation of a very large set of AAT (48%) when Leu starvation only had a minimal effect on the down-regulation of AAT (4%). At the sight of AAT sub-families, when Arg and Lys starvations displayed a significant increase in the NAAT sub-family (Fig. 5e) and, very surprisingly, only a similar trend for CAAT sub-family, the two other starvations had absolutely no impact



on the global expression of NAAT, CAAT and AAAT subfamilies. According to these observations, the AA intracellular content measured following these starvations were not, or at least very minimally, affected when considering NAA, CAA, AAA, EAA and NEAA pools (Fig. 5f to 5j respectively). It was only when considering the intracellular contents of each individual AA that slight, but significant, differences could be detected for Ile, Phe, Cys, Gln and Lys (Fig. S5a), all of which being however unaffected by Leu starvation. Altogether, despite these modest but specific changes for some intracellular AA, we could observe that only cells that undergone Arg and Lys starvation conditions could stimulate the activation of mTOR pathway (Fig. 5k) when stimulated back with a regular growing media. Consequently, we wondered whether, with the datasets of the intracellular AA contents and mTOR signaling levels gathered following all the nutritional challenges performed so far, some correlations could be established between the fluctuations of individual AA and mTOR activation in cells. Despite that Leu, Met, Arg and Lys were already shown to contribute in mTOR activation in RT cells^{13,17,20,21}, only the intracellular concentrations of Ile and Phe were positively correlated with mTOR activation levels (Fig. 5l and 5b) at significant values. Therefore, we decided to evaluate whether such correlations were of biological relevance in unravelling a specific role of Ile and Phe in mTOR activation (Fig. 5m). For this purpose, cells were starved for 2h prior being treated for 4h with a starvation media supplemented or not with all EAA or the indicated AA. It turned out that indeed Ile and Phe displayed similar abilities to activate mTOR compared to its previously described AA activators. Future experiments should help to determine whether these mTOR-stimulating AA acted directly onto mTOR-dependent AA-sensing machinery or, for instance, through indirect effects on specific gene and metabolic targets. Overall, knowledge obtained through such single starvations indicated that i) specific cellular responses are activated depending on the identity of the missing EAA, implying that many existing AA-specific mechanisms have yet to be elucidated but also that ii) a non-negligible number of AAT dysregulations were commonly shared between the different starvations, suggesting the existence of a general mechanism activated following AA starvation in RT cells (Fig. S5c). Accordingly, and since this global approach revealed being powerful to identify new AA that contribute to mTOR activation in trout, we pursued the analyses of the datasets with the goal to define general rules governing the nutritional-related mechanisms of AAT expressions in RT cells.

A general classification of AAT according to their nutritional-related regulations

Following the great numbers of AAT regulations observed in cells subjected to no less than 10 different nutritional challenges we first performed a hierarchical clustering of the AAT on the basis of their relative fold change expressions in each condition compared to control media (Fig. 6a). Accordingly, three different clusters, named A, B and C, could clearly be identified. The cluster A was defined as a group of AAT that were up-regulated upon starvation in an AA-dependent way while serum had a further stimulating effect on the starvation-induced up-regulations (Fig. 6b). The cluster B was mostly represented by AAT that were unaffected by nutritional conditions, while cluster C was made of AAT that were up-regulated by starvation in a serum dependent manner. Since cluster A appeared of being strongly repressed by AA availability, we assessed whether this regulation could be related to the GCN2-ATF4 pathway. First, we measured the expression levels of some specific ATF4 target genes (Fig. S6a), for which only ATF4 c-d did not display a conventional GCN2 response in most of the nutritional challenges considered. Moreover, very surprisingly but consistently with results previously obtained (Fig. 5d), Leu starvation only led to a very weak up-regulation of ASNS while other markers were left unaffected. This tended to demonstrate that RT cells do not sense Leu within the GCN2-ATF4 pathway. Overall, with the ATF4-dependent gene activation levels measured in all the nutritional conditions tested, we observed that the general expression of AAT belonging to cluster A showed significant correlations with chop, asns, ATF4 a and ATF4 b genes (Fig. 6c),



suggesting a major role of the GCN2-ATF4 pathway in the regulation of this cluster. To confirm this hypothesis, cluster A was analyzed for nucleotide motif sequences commonly shared within AAT promoters from this cluster. When compared to databases, the first motif identified in cluster A almost perfectly matched with the ATF4 specific Amino Acid Response Element (AARE) motif described in mammals²² as an ATF4 binding site (Fig. 6d). Furthermore, such motif was found to be considerably enriched in promoters of AAT from cluster A compared to those of clusters B and C (Fig. 6e). To experimentally validate this observation, the AAT expression profiles were first assessed from cells exposed to halofuginone (Fig. S6b), a pharmacological activator of the GCN2 pathway (Fig. S6c). Again, it appeared that only the general expression of AAT from cluster A was i) specifically increased by halofuginone treatment and ii) significantly different from those of clusters B and C (Fig. 6f). To confirm the role of GCN2 in regulating AAT from cluster A, we used A92 compound, which was shown to be a specific GCN2 inhibitor in mammals. First, we observed that the starvation-induced up-regulations of most AAT previously observed was clearly repressed upon A92 treatment (Fig. S6d) as well as those of GCN2 target genes (Fig. S6e). Then, the analysis of the AAT expressions according to the clustering clearly evidenced that A92 abrogated totally the up-regulation of cluster A while also partially repressing the expressions of cluster B and C (Fig. 6g). Altogether and since these results constituted a body of evidences demonstrating the central role of the GCN2 pathway in regulating AAT from cluster A, we finally analyzed liver samples previously collected for another study²³. Briefly, those samples were obtained from trout fed two isoenergetic and isolipidic diets that only differed from their contents in crude protein inclusion rate (60% for the high protein diet *versus* 40% for the “low” protein diet) as well as for starch to balance the gross energy for both diets. As a result, the analysis of the AAT profiles (Fig. S6f) revealed that only AAT from cluster A were statistically more expressed in the diet providing less dietary AA compared to the high protein diet (HP) (Fig. 6h) in full accordance with the expression levels of GCN2 target genes (Fig. S6g). Beside the fact that it was the first evidence of the conservation and functionality of AARE sequences in RT, all these results confirmed the central role played by the GCN2 pathway in controlling AA homeostasis through AAT regulations in RT.

Modelling the nutritional-dependent AAT activities in RT cells.

Finally, while pursuing the efforts in decrypting the complex RT AAT family, we aimed to model the nutritional regulations of this family and their outcomes on AA fluxes and cellular signaling events. To do so, we first calculated the Spearman's correlation values between each individual AA and each AAT independently, prior to proceed to a hierarchical clustering of these 1.425 values to evaluate if a specific pattern of intracellular AA fluctuations could be associated with the regulation of some specific pools of AAT. As a result, three main groups could be identified and named α , β and γ (Fig. 7a). The first thing that could be perceived was that the group α was mostly constituted of AAT from the cluster B combined to few AAT from cluster C while the group β was integrally made of AAT from cluster C and group γ was mainly represented by AAT from cluster A and few others from cluster C. In other words, while the 'nutritional' clustering previously carried out was based entirely on fluctuations in AAT expression observed in cells exposed to various nutrient media, it was remarkable to see that integrating the intracellular AA datasets led to virtually the same conclusions, while certainly refining them. Consequently, convinced by the robustness of this clustering, we sought to model the nutrition-dependent AA transport activities of these 3 new groups. To this end, a Bayesian approach was used to estimate the posterior values (PVs) of the effects of the three groups (α , β and γ) on intracellular variation of each AA (Fig. 7b). Thus, positive or negative PVs reflected the global import or export activities of each group and AA considered, respectively. Accordingly, this analysis tended to explain cellular AA fluxes by attributing to the group α the efflux of



Gln, His, Ile, Met and Phe while it also seemed to be the major contributor for Arg uptake. Since this group is mainly constituted of AAT that do not respond to nutrients (Cluster B), it can therefore be seen as a homogenizer group in charge to equilibrate the AA intracellular pools. On the other side, the group β , only constituted of AAT repressed by serum, would be globally in charge of the efflux of Asp and Gln and the uptake of Gly, Lys and Val. Finally, the group γ , mainly constituted of AAT up-regulated by AA starvation, would be responsible for the uptake of Cys, Gln, His, Ile, Phe and Ser. For all the other AA not mentioned, since no clear differences in PVs could be estimated between groups, it was therefore suspected that these AA were shared substrates. Finally, to summarize all the findings from this study, we proposed the model of the nutritional regulations of the AAT family and their outcomes on intracellular AA contents (Fig. 7c). Thus, we demonstrated that in RTH-149 cells more than 75 AAT were expressed and could be subdivided into three clusters A, B and C according to their nutritional regulations by AA and serum. With a focus made on AA specific regulations, we could demonstrate that the cluster A was a predominant target of the GCN2 pathway notably due to an enrichment of AARE motifs in the promoters of the AAT belonging to this cluster. Moreover, the AAT have also been classified according to the modelling of their transport activities into 3 different groups (α , β and γ) each of which that could be seen as a polyvalent transporter with specificities for the uptake or efflux of key AA, among which Phe and Ile, two newly identified mTOR activators in RT.

Discussion

In conclusion, this study highlighted the great diversity and number of AAT found in RT genome as well as those expressed in its tissues and derivative cells. Results obtained demonstrated that the global profile of AAT dysregulations observed upon a serum and AA starvation is mainly driven by AA availability, which globally stimulated the expression of NAAT and CAAT subfamilies but not AAAT. Interestingly, we also noticed that the outcomes of these dysregulations on AA intracellular pools converged to impact only half of the proteinogenic AA (namely Met, Val, Ile, Phe, Ser, Gly, Cys, Gln, and Lys) where 4 are described as NEAA. This suggest specific roles played by those AA in starving cells and indicating that cells' responses to nutrient deficiency do not spare efforts in stimulating the absorption of NEAA either, reinforcing furthermore the concept of functional AA²⁴. Moreover, while looking at single AA starvation responses, our results clearly established that a combination of a general response to AA starvation and an AA-specific response are activated by cells, certainly to better cope with the starvation considered. More than that, the single starvations focusing on 4 known AA that activate mTOR showed that they are not similarly detected by the GCN2 pathway where Lys and Arg starvation induced a strong induction of GCN2 target genes while Met and Leu starvations had only a moderate, or even no impact at all, in stimulating this pathway. Such results corroborated previous observations¹³ made for which GCN2 and mTOR pathways appeared to be less interconnected in RT than in mammals which is intriguing since RT metabolism relies mainly in dietary amino acids. Moreover, the hierarchical clustering of the nutrient-dependent cellular responses of the AAT family, besides the identification of AAT regulated by the GCN2 pathway, allowed to confirmed previous statements made in mammals or in fish. First, we could see that the cluster A, mostly repressed by AA availability, is enriched in AAT localized at the plasma membrane (89%) compared to the global proportion of plasma membrane AAT expressed in RT (73%) which is consistent with an induction of the AAT from this cluster A to improve AA absorption in a context of AA restriction. Interestingly, the only two intracellular AAT found in this cluster A are mitochondrial carriers (Ornt1c and AGC1 c-d) involved in mitochondrial ornithine and aspartate/glutamate fluxes respectively, previously shown for their functions in arginine synthesis and urea cycle²⁵ notably stimulated by starvation conditions. Similarly,



according to WGD events that occurred in RT evolution, AAT genes were also duplicated and retained in RT genome. Interestingly, for 11 (B^oAT2, LAT2, γ -LAT2, CAT3, 4F2hc, LAT1, AGC1, SNAT3, GC1, PQLC2 and GAT2) of the 48 human AAT orthologs expressed in RTH-149 cells (for a total of 75 AAT expressed), we could notice that subfunctionalization²⁶ processes might have already occurred since paralogs from a duplicated gene were found spread into 2 different clusters (A:B, A:C or B:C). This illustrates that the AA homeostasis supported by the RT AAT family is even more complex to delineate since paralogs from a duplicated gene display very close sequence identities, so likely similar transport activities and specificities, but differences in expression levels and regulations. Therefore, in absence of extensive studies detailing all the regulations to which AAT are subjected, the functional role of some AAT will certainly be minored, if not totally ignored. Altogether, we proposed here a global approach to considerably gain insight into the molecular mechanisms regulating AAT expressions and functions in RT through the prism of nutritional regulations. Beyond the fundamental knowledge gathered for this specie of agronomic interest, this study offers to get into the complex world of AAT through an innovative and global angle to better apprehend the mechanisms involved to preserve AA homeostasis. Therefore, multiplying the use of this global approach to other stimuli, whether being related to nutrients (e.g. the responses to carbohydrate, lipids or micronutrients) or not (responses to cytokines, hormones and growth factors), will contribute to ease the global comprehension of the cellular functions supported by AAT. Moreover, since none of the protocols and methods proposed in this study required tools specifically developed for a dedicated specie, this study provides a universal approach deeply required to democratize studies on the SLC family and help biology to keep moving forward in wider topics and organisms.

Methods

Cell culture & treatments

All *in vitro* experiment were conduct on RTH-149 cell line, derived from rainbow trout hepatoma (ATCC[®] CRL-1710, LGC standards, Molsheim, France). These cells are routinely cultured in Minimal Essential Medium (MEM, #61100-053) supplemented with 100 μ M Non Essential Amino Acid (NEAA, #11140-50), 1mM Sodium-pyruvate (#11360-070), 50 units/ml penicillin / 50 μ g/ml Streptomycin (PenStrep, #15140-122), 10% Fetal Bovine Serum (FBS, #10270-106), all provided by Gibco (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA) and 25 mM HEPES (#BP299-1, Fisher Bioreagents, Fisher scientific SAS, Illkirch Graffenstaden, France). Cells were grown at 18°C, without CO₂ and at pH 7.4. Medium were change 2 to 3 times per week and cells were passaged at around 80% of confluence. Before each experiment, living cells were counted with a Cellometer K2 and AO-PI staining (#CS2-0106), both from Nexcelom Bioscience LLC (Lawrence, MA, USA). For RNA extraction, 500 000 cells were plated in 6 cm dishes, while 400 000 cells were plated in same dishes for Protein extraction. For UPLC-MS analysis, 400 000 cells were plate in 6-well plates, with 3 replicates per condition. 48h after seeding, cells were wash twice with Phosphate Buffered Saline (PBS, #2944-100, Fisher bioreagents) and treated with specific medium: Complete Medium (CM condition, constituted as mentioned above), Hank's balanced salt solution (HBSS, #14065-056, Gibco) with 25mM HEPES was use as a starvation medium (Starved condition) and supplemented/or not with NEAA, Essential Amino Acid (EAA, #11130-036, Gibco), L-Glutamine (#25030-024, Gibco) and FBS. HBSS solution supplemented with all of these compounds were hereafter referred as Fed Like medium. For single AA starvation, a MEM medium lacking almost all AA (except Histidine, Isoleucine, Phenylalanine, Threonine, Tryptophan, Tyrosine, Valine, C4086.0500, Genaxxon Bioscience, Ulm, Germany) were used and supplemented with PenStrep, NEAA L-Glutamine, and each other AA one by one to MEM concentration, except one (minus L-Arginine (#A5006-100G), L-Lysine (#L5501-25G), L-Methionine (#M9625-25G) and L-



Leucine(#L8000-50G), all provided from Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). Finally, Halofuginone hydrobromide (#32481, Sigma-Aldrich), a pharmacological activator of GCN2 pathway was used at 100 nM in CM and A-92 (#Axon 2720, Axon Medchem PV, Groningen, The Netherlands), an inhibitor of GCN2 pathway was added at 4 μ M in Starved media. All these treatments were carried out for 24 hours before RNA extraction.

In order to assess effect of AAT dysregulation on intracellular AA content and mTOR activation, after these 24h treatments, cells were starved with the Starved condition during 2h, for emptying intracellular AA pool and inactivate mTOR. Cells were then reloaded with CM during 10 min before metabolites extraction and UPLC-MS analysis, or during 4h with CM lacking FBS before protein extraction for Western Blot analysis.

Finally, to assess mTOR activation level by some EAA, 48h after plating, cells were starved with HBSS and preload with NEAA for 2h, in order to inactivate mTOR. Cells were then reloaded with the starvation condition containing all EAA or only one (L-isoleucine, #I5227-5G, L-phenylalanine, #P5482-25G, both provided from Sigma-Aldrich, and L-arginine, L-lysine, L-leucine, L-methionine ; each at MEM concentration) or nothing during 2h, prior to protein extraction for Western Blot analysis.

RNA extraction and quantitative RT-PCR analysis

Before RNA extraction, cells were washed with PBS solution. RNA extraction and purification were performed with RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) by using Manufacturer's protocol. RNA concentration and integrity was assessed with a Nanodrop® ND1000 spectrophotometer.

cDNA synthesis by reverse transcriptase were carried out as previously described, as well as protocol and program for RT-qPCR analysis^{13,17,18}. Briefly, cDNAs were synthesized using 1 μ g of RNA for each experiment, excepted for A-92 treatments where 700 ng RNA were used. All primers designed with Primer3 software and used were listed in Supplementary Table 2. Primer efficiencies were assessed using a pool of RT tissues (stomach, gut, liver, muscle, ovary, spleen, kidney, brain and adipose tissue) prior to validating amplicon size and the amplified sequence by DNA sequencing (Azenta Life Science, Leipzig, Germany). Expression of targeted genes were normalized on EF1 α expression.

Protein extraction and Western blotting

Protein extraction and Western blotting analysis were carried out as previously described^{13,17,18}. Briefly, cells were lysed with RIPA buffer (#89900, Thermo Fisher scientific) supplemented with Halt protease and phosphatase inhibitor (#78442, Thermo Fisher scientific). After determination of sample protein concentration by Bicinchoninic Acid (BCA) Kit (#UP408404, Interchim, Montluçon, France) an equivalent level of protein per sample were mixed with Laemmli buffer before performed electrophoresis (12% SDS-PAGE). After protein separation and transfer, different primary antibodies were used: anti-ribosomal protein S6 (#2217L), anti-phospho-S6 (Ser235/Ser236, #4858L), and anti- β -tubulin (#2146S), all provided from Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA). Chemiluminescent revelations were performed with iBright 1500 imager (Thermo Fisher Scientific) and quantification were assessed thanks to ImageJ Software (v1.53k, Java 1.8.0_172) and by using β -tubulin for normalization.

Proteomic analysis

For proteomic analysis, proteins were extracted exactly as described above. Proteomic analysis were carried out by the ProteoToul Services – Proteomics Facility of Toulouse, France, as described previously²⁷. Briefly, after preparation and digestion, samples were analysed thanks to nano-liquid chromatography (LC) associated to tandem mass spectrometry: an UltiMate 3000 system (NCS-3500RS Nano/Cap System;



ThermoFisher Scientific) and an Orbitrap Exploris 480 mass spectrometer supplied with a FAIMS Pro device (ThermoFisher Scientific). Peptide sequences were assigned against rainbow trout records in the Uniprot protein database and protein abundance of peptide identified as AAT were extracted and analyzed.

Amino acid extraction and UPLC analysis

For analyzing AAT dysregulation effect on AA absorption, intracellular AA content were assessed by UPLC analysis, exactly as previously described¹⁷. Briefly, after 3 washes with ice-cold PBS, polar metabolites were extracted with an MeOH/H₂O mix (80%/20%). Samples derivatization were performed with an AccQTag kit (#186003836, Waters) by following manufacturer's instruction. AA content analysis were done thanks to an Acquity H-Class PLUS (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) Alliance System (2695 separation module) associated to a Acquity UPLC Fluo Detector (Waters). All proteinogenic AA content (except Tryphophan) were identified thanks retention time compared to standards. AA content was then normalized on total protein amount, assessed with BCA Kit.

Liver samples

For assessing AAT expression profile *in vivo*, RNA extracted from liver samples were taken from a previous study²³. Briefly, after 4 days of total starvation, juvenile rainbow trout were fed during 4 days with two different experimental diet characterized by different ratios between carbohydrates and proteins. The first diet contained a high protein level (~60% of crude protein, and low carbohydrate level, called "High protein" diet, HP) while the second diet contained a lower protein level (~40% of crude protein, higher carbohydrate level allowed by inclusion of gelatinized starch, called "Low protein" diet, LP). Livers were sampled 6h after the last meal.

Bioinformatics analysis

AAT identification

AAT were identified in rainbow trout genome thanks to genome annotation on NCBI database (OmykA_1.1 genome, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gdv>) and by blasting sequences against human AAT using NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). This was also complemented by blasting human AAT sequence against rainbow trout genome to ensure that unannotated genes were not overlooked.

AAT Hierarchical clustering

Clustering of AAT according to their nutritional regulation were performed using R Studio software (v4.3.0) by clustering Log₂ Fold Change (FC) mRNA expression in each experimental condition test (Starved +/- nutrients and single AA deficiencies) with the Ward method.

Motif enrichment analysis

Based on AAT belonging to cluster A, a motif enrichment analysis was conducted with MEME Suite^{28,29} (Multiple Em for Motif Elicitation, v5.5.5). DNA sequences of more or less 1000bp from the transcription-starting site of Cluster A AAT were loaded and Classic Mode were used for motif discovery. Sequences sites distribution were assessed with One Occurrence Per Sequence (oops) setting, for identifying a maximum of 10 enriched motifs from 6 to 15 bp. To assign an enriched motif to a transcription factor binding site, the TOMTOM tool (Motif Comparison Tool³⁰) were used, comparing the newly discovered motif with databases of known motif (e.g Jaspar, Uniprobe, jolma...). To identify all matching sites of the newly discovered motif, a Simple Enrichment Analysis (SEA³¹) were conducted for each cluster by taking DNA sequences of more or less 1000bp from the transcription-starting site.



Correlations

Correlations between AAT and AA content in all experimental conditions were conducted with R Studio (v4.3.0). Non-parametric correlation coefficients (Spearman correlation) were then clustered with the method previously described.

Description of the statistical model

In order to understand the dynamics of overall AA uptake by AAT, we built a model to infer the effects of AAT expression on intracellular AA content. AAT expression and AA content were Log₂ fold change (FC) of mRNA expression of each AAT and log₂ FC of AA content, both normalized on control condition (CM). To simplify our model and allow better parameters estimation, AAT were grouped according to groups previously determined, α , β and γ . We thus calculated the mean expression of AAT per treatment and per cluster ($T_{j,k}$) to create $k = 3$ explicative factors for each of the j experimental conditions. For this model, we assumed that intracellular content of each of the i AA follow a Gaussian distribution with a mean $\mu_{i,j}$ and variance σ^2_i as follows:

$$AA_{i,j} \sim N(\mu_{i,j}, \sigma_j^2)$$

With

$$\mu_{i,j} = x_i + \sum_{k=1}^3 pv_{i,k} \times T_{j,k}$$

Where:

x_i : the base value of AA uptake when all AAT expression did not vary

$Pv_{i,k}$: the parameter effect of AAT expression on the i^{th} AA and k^{th} group.

$T_{j,k}$: the explicative factor value for the j^{th} experimental condition and the k^{th} group.

This model assumes that 1/ AA content variance depends on experimental conditions, as demonstrated in experiments described above, 2/ variance in uptake differs between each AA and 3/ AA content might not be equal to zero even without AAT expression variation, assuming a basal AA flux.

The model was created with R Studio software (v4.3.0) using rjags and MCMCvis packages. Parameter estimation was performed using Bayesian inference framework. Relatively non-informative priors were chosen for $\mu_{i,j}$, σ_j^2 , x_i and Pv parameters, in order to ensure rapid convergence (See <https://doi.org/10.57745/WZL39N> for model code, priors and data). The Pv , i.e. effect of AAT groups on uptake of a given AA, x_i and σ_j^2 were estimated with 3 independent MCMC (Markov chain Monte Carlo) samplings with 10000 iterations each.

Model fit was assessed by calculating the percentage of explained variation in AA concentration. Posteriors parameters, named Pv , were analysed for each AA and AAT groups, with $Pv = 0$ meaning that AAT group don't have any effect on AA absorption, $Pv > 0$ that AAT groups have a positive effect and $Pv < 0$ a negative one. In practice, we considered a parameter to be statistically different from zero when 97.5% of its density probability was above or below zero.

Statistical analysis

All data were assessed for distribution normality by Shapiro-Wilk test, and mean comparisons were assessed by two-tailed parametric T test or non-parametric U test for two-by-two comparisons, or by two-



tailed parametric one-way Anova with Tuckey's post-hoc test or non-parametric Kruskal-Wallis test and Dunn comparison test for multiple comparisons. All error bars correspond to Standard Error of the Mean (sem). Proportion analysis were assessed with Chi2 test, while correlations between AA and mTOR activation and between GCN2 target genes and global cluster mRNA expression were assessed with Pearson correlations. The significance threshold was always positioned at $p < 0.05$.

Data and code availability

The raw data and the code developed for this study are available on the french "Recherche Data Gov multidisciplinary repository" following this link: <https://doi.org/10.57745/WZL39N>

References

1. César-Razquin, A. *et al.* A Call for Systematic Research on Solute Carriers. *Cell* **162**, 478–487 (2015).
2. Kandasamy, P., Gyimesi, G., Kanai, Y. & Hediger, M. A. Amino acid transporters revisited: New views in health and disease. *Trends Biochem. Sci.* **43**, 752–789 (2018).
3. Shoji, Y. *et al.* Five novel SLC7A7 variants and y+L gene-expression pattern in cultured lymphoblasts from Japanese patients with lysinuric protein intolerance. *Hum. Mutat.* **20**, 375–381 (2002).
4. Bailey, C. G. *et al.* Loss-of-function mutations in the glutamate transporter SLC1A1 cause human dicarboxylic aminoaciduria. *J. Clin. Invest.* **121**, 446–453 (2011).
5. Cormerais, Y. *et al.* The glutamine transporter ASCT2 (SLC1A5) promotes tumor growth independently of the amino acid transporter LAT1 (SLC7A5). *J. Biol. Chem.* **293**, 2877–2887 (2018).
6. Beaumatin, F. *et al.* mTORC1 Activation Requires DRAM-1 by Facilitating Lysosomal Amino Acid Efflux. *Mol. Cell* **76**, 163-176.e8 (2019).
7. Bröer, S. & Gauthier-Coles, G. Amino Acid Homeostasis in Mammalian Cells with a Focus on Amino Acid Transport. *J. Nutr.* **152**, 16–28 (2021).
8. Bröer, S. & Bröer, A. Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms. *Biochem. J.* **474**, 1935–1963 (2017).
9. Velázquez-Villegas, L. *et al.* ChREBP downregulates SNAT2 amino acid transporter expression through interactions with SMRT in response to a high-carbohydrate diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **320**, E102–E112 (2021).
10. Javed, K. & Fairweather, S. J. Amino acid transporters in the regulation of insulin secretion and signalling. *Biochem. Soc. Trans.* **47**, 571–590 (2019).
11. Bröer, S. Amino acid transporters as modulators of glucose homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **33**, 120–135 (2022).
12. Nigam, S. K. What do drug transporters really do? *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 29–44 (2015).



13. Morin, G. *et al.* Precision formulation, a new concept to improve dietary amino acid absorption based on the study of cationic amino acid transporters. *iScience* **27**, (2024).
14. FAO. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2024*. (FAO ;, 2024).
15. Gesemann, M., Lesslauer, A., Maurer, C. M., Schönthaler, H. B. & Neuhaus, S. C. Phylogenetic analysis of the vertebrate Excitatory/Neutral Amino Acid Transporter (SLC1/EAAT) family reveals lineage specific subfamilies. *BMC Evol. Biol.* **10**, 117 (2010).
16. Berthelot, C. *et al.* The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates. *Nat. Commun.* **5**, 3657 (2014).
17. Pinel, K. *et al.* Are the Main Methionine Sources Equivalent? A Focus on DL-Methionine and DL-Methionine Hydroxy Analog Reveals Differences on Rainbow Trout Hepatic Cell Lines Functions. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 2935 (2022).
18. Morin, G., Pinel, K., Dias, K., Seiliez, I. & Beaumatin, F. RTH-149 Cell Line, a Useful Tool to Decipher Molecular Mechanisms Related to Fish Nutrition. *Cells* **9**, 1754 (2020).
19. Gauthier-Coles, G. *et al.* Quantitative modelling of amino acid transport and homeostasis in mammalian cells. *Nat. Commun.* **12**, 5282 (2021).
20. Lansard, M. *et al.* L-leucine, L-methionine, and L-lysine are involved in the regulation of intermediary metabolism-related gene expression in rainbow trout hepatocytes. *J. Nutr.* **141**, 75–80 (2011).
21. Seiliez, I. *et al.* An in vivo and in vitro assessment of TOR signaling cascade in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **295**, R329-335 (2008).
22. Bruhat, A. *et al.* Amino acids control mammalian gene transcription: Activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the CHOP promoter. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7192–7204 (2000).
23. Marandel, L., Seiliez, I., Véron, V., Skiba-Cassy, S. & Panserat, S. New insights into the nutritional regulation of gluconeogenesis in carnivorous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a gene duplication trail. *Physiol. Genomics* **47**, 253–263 (2015).
24. Wu, G. Functional amino acids in nutrition and health. *Amino Acids* **45**, 407–411 (2013).
25. Monné, M., Voza, A., Lasorsa, F. M., Porcelli, V. & Palmieri, F. Mitochondrial Carriers for Aspartate, Glutamate and Other Amino Acids: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 4456 (2019).
26. Glasauer, S. M. K. & Neuhaus, S. C. F. Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Mol. Genet. Genomics* **289**, 1045–1060 (2014).
27. Vélez, E. J. *et al.* Chaperone-mediated autophagy protects against hyperglycemic stress. *Autophagy* **20**, 752–768 (2024).
28. Bailey, T. L. *et al.* MEME Suite: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.* **37**, W202–W208 (2009).



29. Bailey, T. L., Johnson, J., Grant, C. E. & Noble, W. S. The MEME Suite. *Nucleic Acids Res.* **43**, W39–W49 (2015).
30. Gupta, S., Stamatoyannopoulos, J. A., Bailey, T. L. & Noble, W. S. Quantifying similarity between motifs. *Genome Biol.* **8**, R24 (2007).
31. Bailey, T. L. & Grant, C. E. SEA: Simple Enrichment Analysis of motifs. 2021.08.23.457422 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2021.08.23.457422> (2021).
32. Seiliez, I., Belghit, I., Gao, Y., Skiba-Cassy, S., Dias, K., Cluzeaud, M., ... & Panserat, S. (2016). Looking at the metabolic consequences of the colchicine-based in vivo autophagic flux assay. *Autophagy*, *12*(2),343-356.
33. Lansard, M., Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Seiliez, I., & Skiba-Cassy, S. (2010). Integration of insulin and amino acid signals that regulate hepatic metabolism-related gene expression in rainbow trout: role of TOR. *Amino acids*, *39*(3), 801-810.

Acknowledgements

We deeply acknowledge the financial supports received from ANR JCJC (grant number ANR19-CE20-0003-01), “Université de Pau et des Pays de l’Adour” (UPPA-2018-01), the “Département INRAE de Physiologie Animale et Système d’élevage” (PhD cofounding) as well as the Aquaexcel3.0 project from Horizon Europe (871108).

Author contributions

Conceptualization: F.B. and I.S.; methodology: S.L.G., K.P, C.H., A.D., J.A. A.B., J.L and F.B.; software: R Studio software (v4.3.0), ImageJ Software (v1.53k, Java 1.8.0_172) ; formal analysis: S.L.G., K.P, C.H., A.G., E.C., L.M., J.L, O.I., V.V. and G.M.; writing: S.L-G. and F.B.; editing: all authors; supervision: F.B. and I.S. ; project administration: F.B. and I.S.; and funding acquisition: F.B.

Competing interests

The authors declare no conflict of interest.

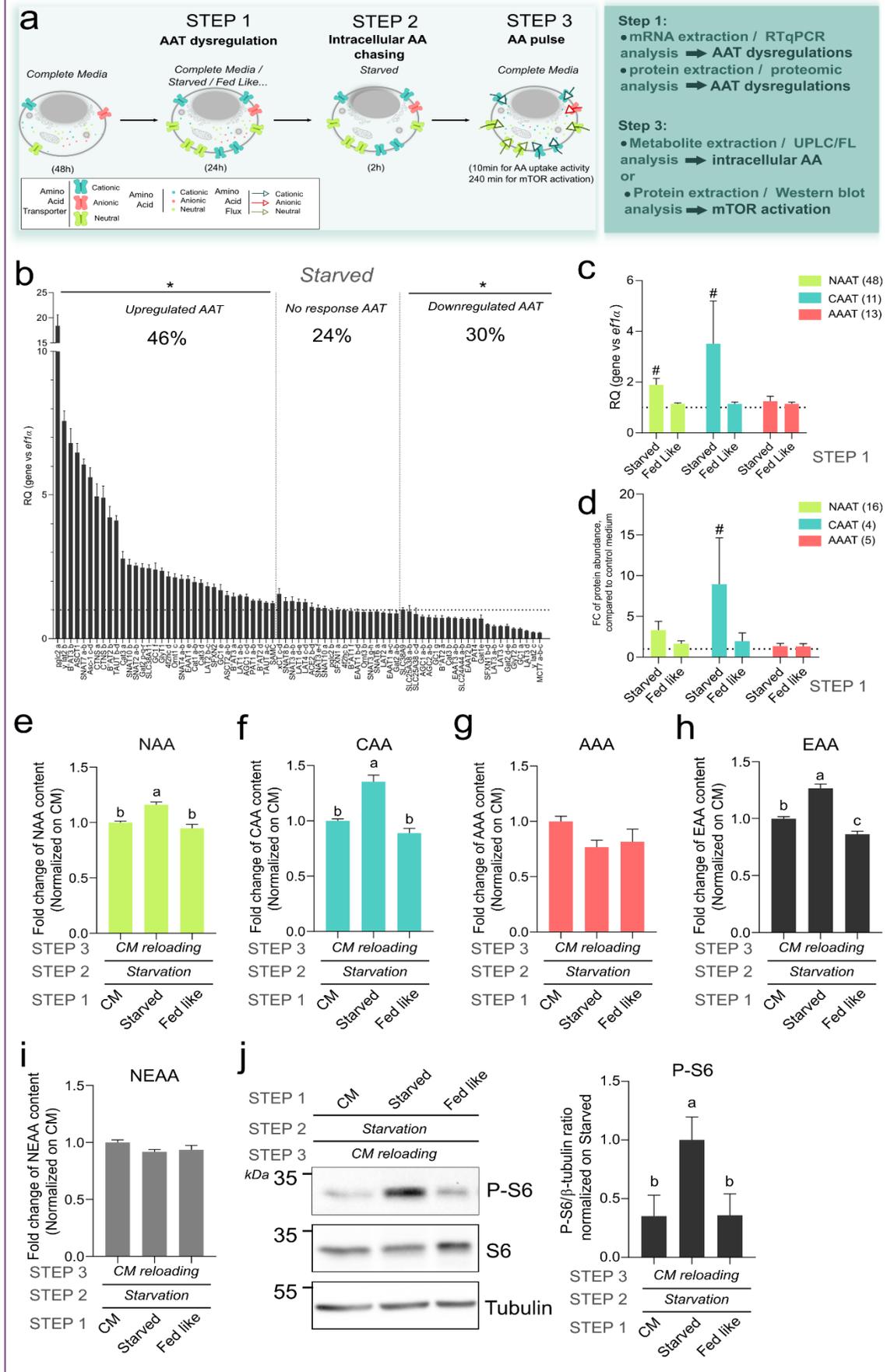


Figure 2: AAT dysregulation upon starvation influenced AA absorption and mTOR signalling

a. description of the experimental procedure for evaluating AAT dysregulation and effects on AA absorption and mTOR signalling. b. Relative Quantification (RQ) of AAT expressed in RTH-149 cell line in starved condition, compared to control media (CM) and normalized on EF1 α expression. AAT were classed from the most upregulated to the most downregulated; percentages indicate AAT proportion in each part of the graph (N=6). c. Mean RQ for each AAT category in starved and fed-like conditions, compared to CM and normalized on EF1 α expression. Numbers refer to AAT in each category (N=3). d. Mean Fold Change (FC) of protein abundance for each AAT category in starved and fed-like conditions, compared to CM. Numbers refer to AAT in each category (N=4). e.f.g.h.i FC of NAA (e), CAA (f), AAA (g), EAA (h) and NEAA (i) intracellular contents measured at the third step (N=7 for all panels except for panel g (AAA) N=3). j. Representative Western Blot and quantification of S6 phosphorylation state after CM, starved and fed-like treatments, compared to starved condition and normalized on β -tubulin quantification (N=7). # and * indicate statistical differences (T-Test, p value <0.05) compared to CM, letters: One-way Anova statistical differences. Different letters indicate a significant difference (p value



FIGURE 3

Le Garrec et al. 2024

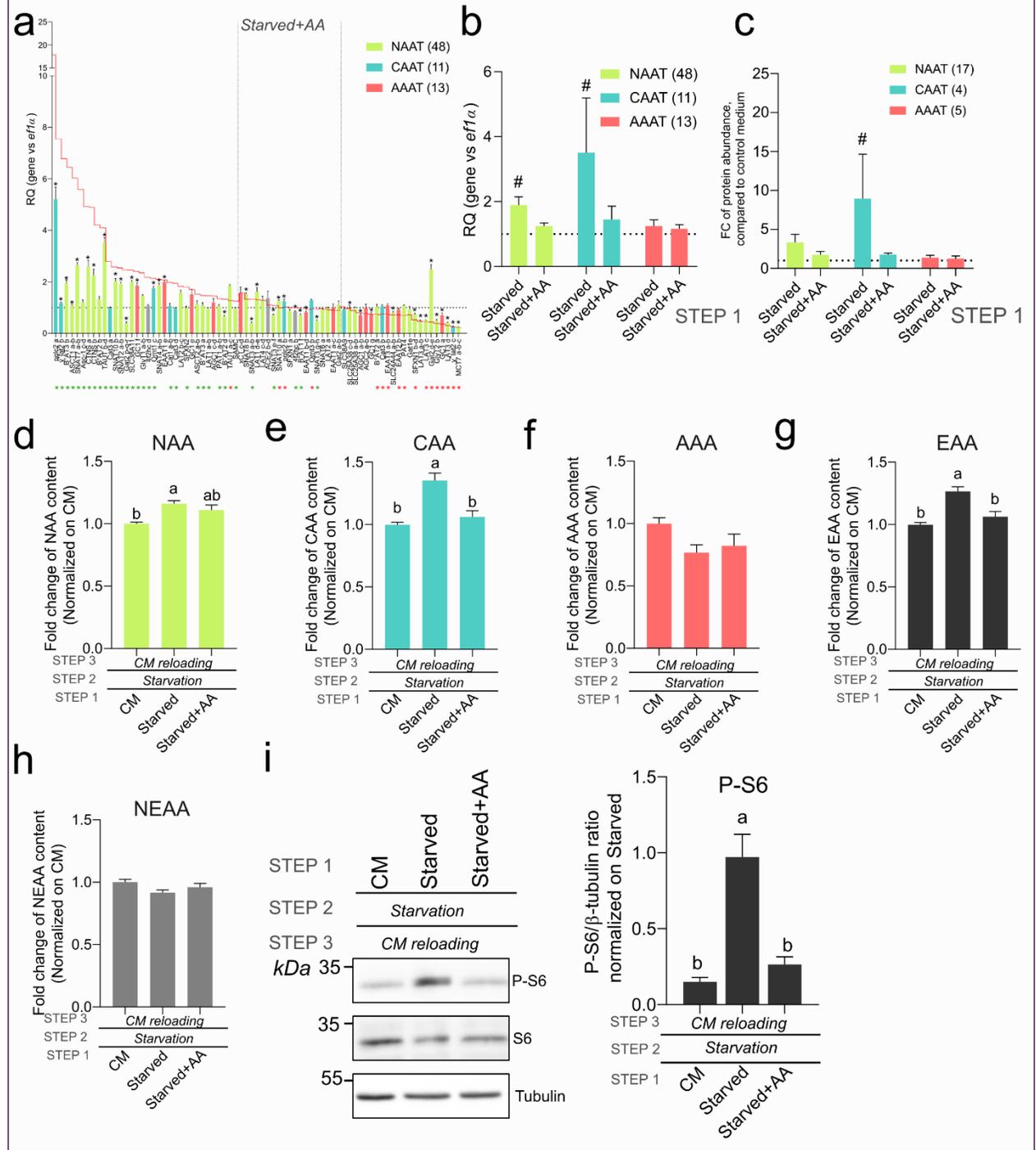


Figure 3: AA mainly drives AAT dysregulation influencing AA content and mTORC1 signalling

a. Relative Quantification (RQ) of AAT expressed in RTH-149 cell line in starved+AA condition, compared to CM and normalized on EF1 α expression. AAT were classed from the most upregulated to the most downregulated in starved condition; red line refers to AAT profiles measured upon starved condition and colours to AAT category. Black *: t-test significant differences from CM; red and green * indicated below gene names represent t-test significant differences from starved condition, depending on regulation direction (red for upregulation and green downregulation) (N=6). b.c. Mean RQ (b) and Mean Fold Change (FC) of protein abundance (c) for each AAT category in starved condition supplemented or not with AA, compared to CM and normalized on EF1 α expression. #: t-test significant differences from CM. Numbers refer to AAT in each category (N=3 and N=4 respectively). d.e.f.g.h FC of NAA (d), CAA (e), AAA (f), EAA (g), NEAA (h) intracellular contents measured after step 3 and normalized to CM. Letters: One-way Anova statistical differences (N=7 for all panels except for panel f (AAA) N=3). i. Representative Western Blot and quantification of S6 phosphorylation state measured at step 3 and normalized on β -tubulin and starved condition. Letters: One-way Anova statistical differences (N=7). Different letters indicate a significant difference (p value <0.05).



FIGURE 4

Le Garrec *et al.* 2024

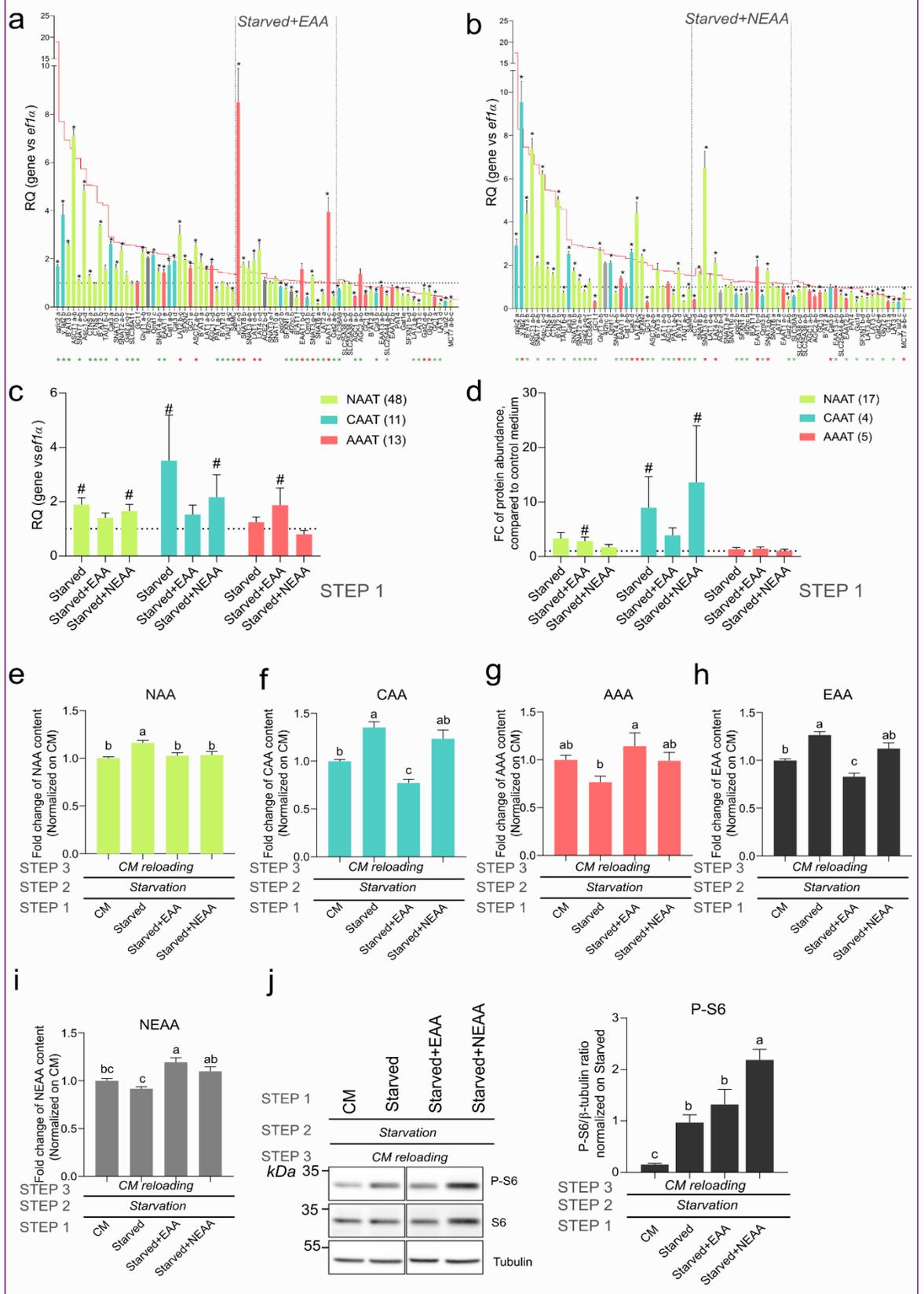


Figure 4: EAA mainly drove AAT dysregulation influencing AA content and mTORC1 signalling

a.b. Relative Quantification (RQ) of AAT expressed in RTH-149 cell line in starved+EAA (a) and starved+NEAA (b) conditions, normalized on EF1 α expression, classed from the most upregulated to the most downregulated AAT in starved Condition. red line refers to AAT profiles measured upon starved condition and colours to AAT category. Black *: t-test significant differences from CM; red and green * indicated below gene names represent t-test significant differences from starved condition, depending on regulation direction (red for upregulation and green downregulation) (N=3). c.d. Mean RQ (c) and Mean Fold Change (FC) of protein abundance (d) for each AAT category measure in starved condition supplemented or not with EAA or NEAA, compared to CM and normalized on EF1 α expression. #: t-test significant differences from CM. Numbers refer to AAT in each category (Experiments were repeated N=3 and N=4 for panel c and d respectively). e.f.g.h.i FC of NAA (e), CAA (f), AAA (g), EAA (h), NEAA (i) intracellular contents measured at step 3 and normalized to CM. Letters: One-way Anova statistical differences (N=7 for all panels except for panel g (AAA) N=3). j. Representative Western Blot and quantification of S6 phosphorylation state after CM and starved with or without EAA or NEAA supplementations, compared to starved condition and normalized on β -tubulin quantification. Letters: One-way Anova statistical differences (N=7). Different letters indicate a significant difference (p value <0.05).



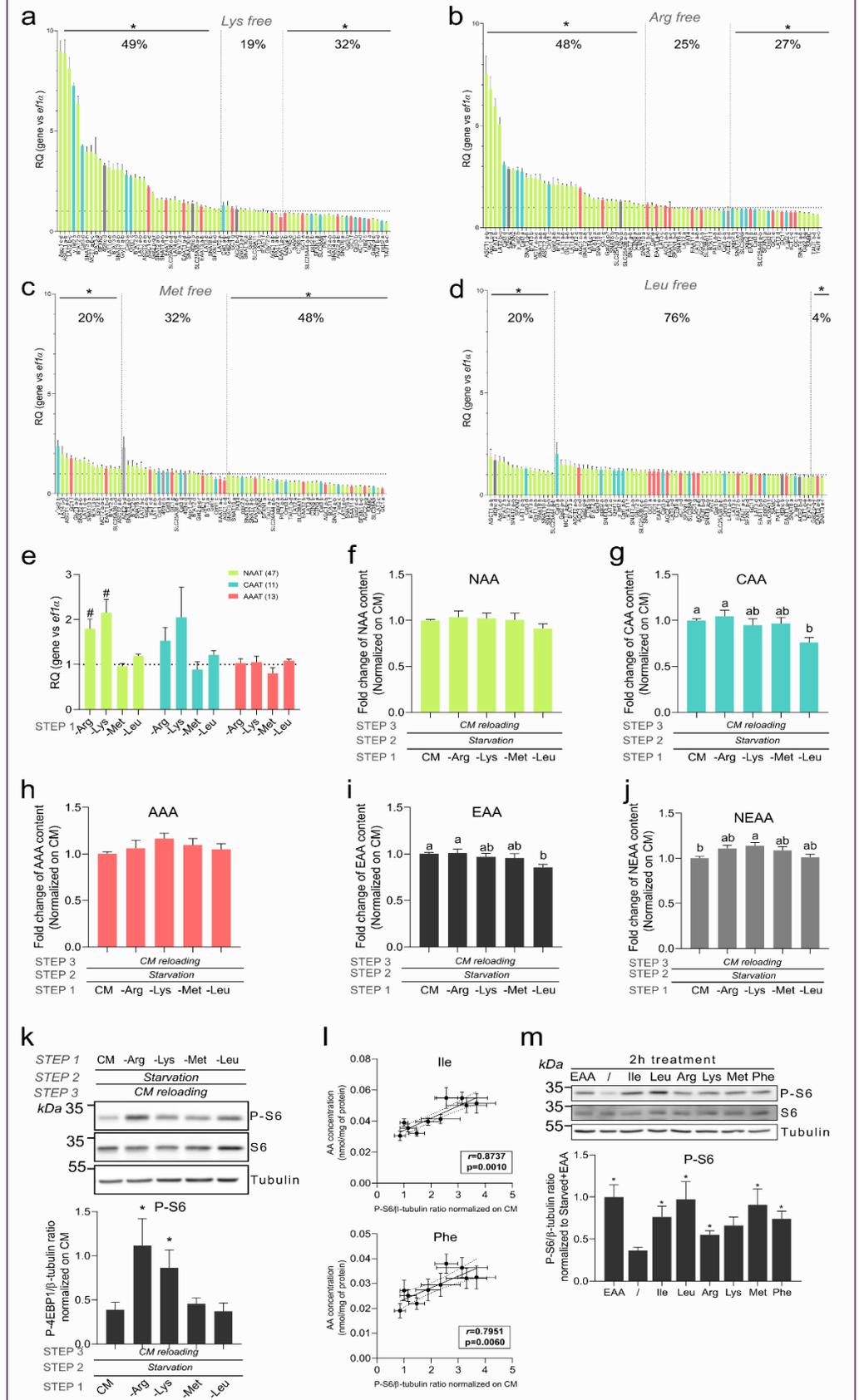


Figure 5: Single AA deficiencies affect AAT expression but with fewer consequences on AA absorption and mTOR signalling; while highlighting specific AA for mTOR activation

a.b.c.d. Relative Quantification (RQ) of AAT expressed in RTH-149 cell line in Lys (a), Arg (b), Met (c) and Leu (d) deficiencies, compared to CM and normalized on EF1 α expression. For each treatment, AAT were classed from the most upregulated to the most downregulated AAT and colours refer to AAT category. Percentage indicate AAT proportion in each part of the graph. *: t-test significant differences from CM (N=4 for Lys and Arg, N=3 for Met and N=5 for Leu deficiencies). e. Mean RQ for each AAT category in Arg, Lys, Met and Leu deficiencies, compared to CM and normalized on EF1 α expression. #: t-test significant differences from CM. Numbers refer to AAT in each category (Experiments were repeated N=4 for Lys and Arg, N=3 for Met and N=5 for Leu deficiencies). f.g.h.i.j FC of NAA (f), CAA (g), AAA (h), EAA (i), NEAA (j) intracellular contents measured at step 3 and normalized to CM. letters: One-way Anova statistical differences (N=7 for all panels except for panel h (AAA) N=3). k. Representative Western Blot and quantification of S6 phosphorylation state measured at step 3 and normalized to CM and β -tubulin. *: t-test significant differences from CM (N=7). l. Pearson correlation between isoleucine (top) and phenylalanine (bottom) intracellular contents and S6 phosphorylation state measured from the dataset of the previous 10 experimental conditions analysed. Confident intervals were shown, r=pearson coefficient; p=p-value. m. Representative Western Blot and quantification of S6 phosphorylation state after treatment with known and potential newly identify mTOR activator, compared to starved+EAA treatment and normalized on β -tubulin quantification. *: t-test significant differences from starved (/) (N=3).



Figure 6: Insightful knowledge brought by clustering of AAT according to their nutritional regulations

a. Heatmap of AAT Log₂ Fold change in all experimental condition tested in RTH-149 cell line. Branches indicate hierarchical clustering, allowing the identification of three clusters: A (red), B (green) and C (grey). b. Mean relative quantification (RQ) of AAT from cluster A (left), B (middle) and C (right) in the indicated condition compared to CM and normalized on EF1 α expression. #: t-test significant differences from CM, *: t-test significant differences between starved conditions (N=3). c. Pearson correlation between mean RQ of each AAT cluster and mean of GCN2 target genes (chop, asns and ATF4 paralogs) in the 10 experimental conditions tested. Confident intervals were shown; pearson coefficients (r) and p-values (p) for each correlation were specified; #: indicate the level of statistical significance. d. Position Weight Matrice of discovered motif from enrichment motif analysis and comparison to Amino Acid Response Element (AARE) identified in human from JASPAR database. P = p-value of similarity; E = false positive number, q= minimum false discovery rate. e. Mean AARE number found in each AAT sequences according to cluster. *: t-test significant differences between clusters. f. Mean RQ of AAT from each cluster in CM+100nM Halofuginone condition, compared to CM and normalized on EF1 α . #: t-test significant differences from CM, *: t-test significant differences between clusters (N=5). g. Mean RQ of AAT from each cluster in starved supplemented or not with 4 μ M A92, compared to CM and normalized on EF1 α expression. #: t-test significant differences from CM, *: t-test significant differences between clusters (N=3). h. Mean RQ of each cluster in liver of Rainbow trout fed with High Protein (HP) or Low Protein (LP) dietary levels, compared to HP diet and normalized on EF1 α expression. #: t-test significant differences from HP, *: t-test significant differences between clusters (N=9).



Figure 7: Modelling the nutritional regulations of the RT AAT family and their related transport specificities

a. Hierarchical clustering of Spearman correlation coefficient between AAT expression and AA absorption measured from the dataset of the previous 10 experimental conditions analysed. This allowed the identification of three clusters α (green), β (grey) and γ (red). Nutritional regulation of clusters identified in Fig.6 were also specified (A, B or C) b. Posterior estimation values (Pv) for each AA and each cluster activity, explaining cluster participation to AA absorption. Stars indicate that posteriors with 97.5% of distribution is different from zero. c. Proposed model of the nutritional regulations of AA fluxes for each cluster activity and the implication of GCN2/mTOR activation in these regulations. Black arrows indicate AA flux directions. Letter in each cluster referred to the specific activities estimated (α , β or γ) as well as their specific nutritional regulations outlined by hierarchical clustering (A, B or C). Green arrows: stimulating effect; crossed-out red arrows: inhibiting effect.



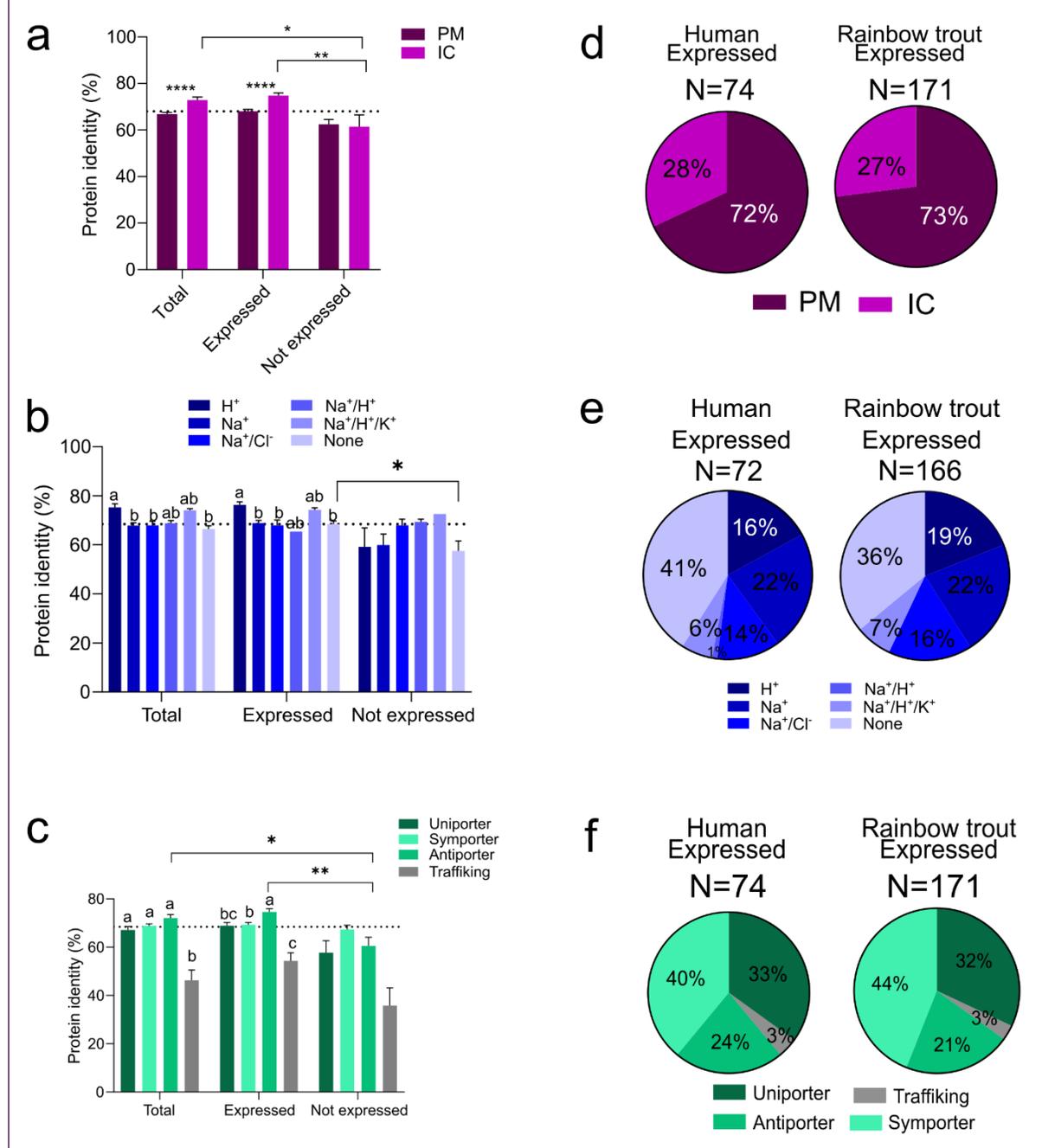


Figure S1: Repertoire of amino acid transporters (AAT) identified in Rainbow trout.

a.b.c Mean protein sequence identity, compared to human, by (a) cellular location (PM: plasma membrane, IC: intracellular), (b) ion dependency and (c) transport mechanism between total, expressed and non-expressed AAT. d.e.f Proportion between AAT according to (d) cellular location, (e) ion dependency and (e) transport mechanism in human and rainbow trout AAT pool; Chi² proportion test between human and Rainbow trout was not significant. *: t-test statistical significance; letters: One-way Anova statistical differences. Different letters indicate a significant difference (p value < 0.05).

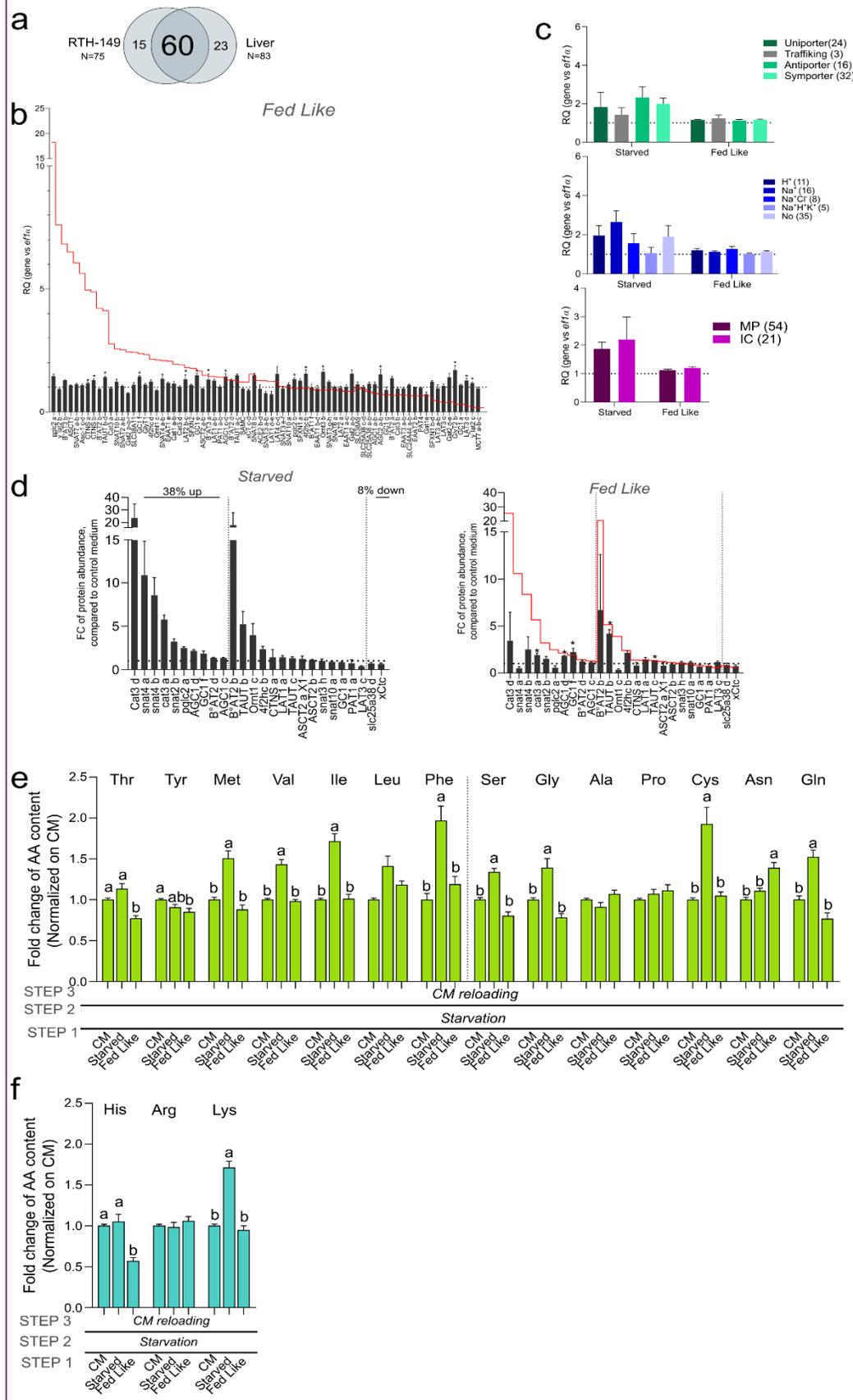


Figure S2: AAT dysregulation upon starvation influenced AA absorption and mTOR signalling

a. Venn diagram of AAT expressed in liver and in RTH-149 cell line. b. Relative quantification (RQ) of AAT in fed-like condition, compared to CM and normalized on EF1 α expression, classed from the most upregulated to the most downregulated AAT in starved condition. Red line refers to AAT profiles measured upon starved conditions (N=3). c. Mean RQ for AAT groups according to transport mechanism (top), ion dependency (middle) and cellular location (bottom) in starved and fed-like conditions, compared to CM and normalized on EF1 α expression. Numbers refer to AAT in each category (N=3). d. FC of protein abundance in starved (left panel) and fed-like (right panel) conditions, compared to CM, of AAT identified in proteomic analysis, classed from the most upregulated to the most downregulated in starved conditions. Red line refers to starved level (N=4). e.f. FC of individual NAA (e) and CAA (f) intracellular contents measured after step 3 and normalized to CM. Letters: One-way Anova statistical differences (N=7). Different letters indicate a significant difference (p value <0.05).



FIGURE S3

Le Garrec et al. 2024

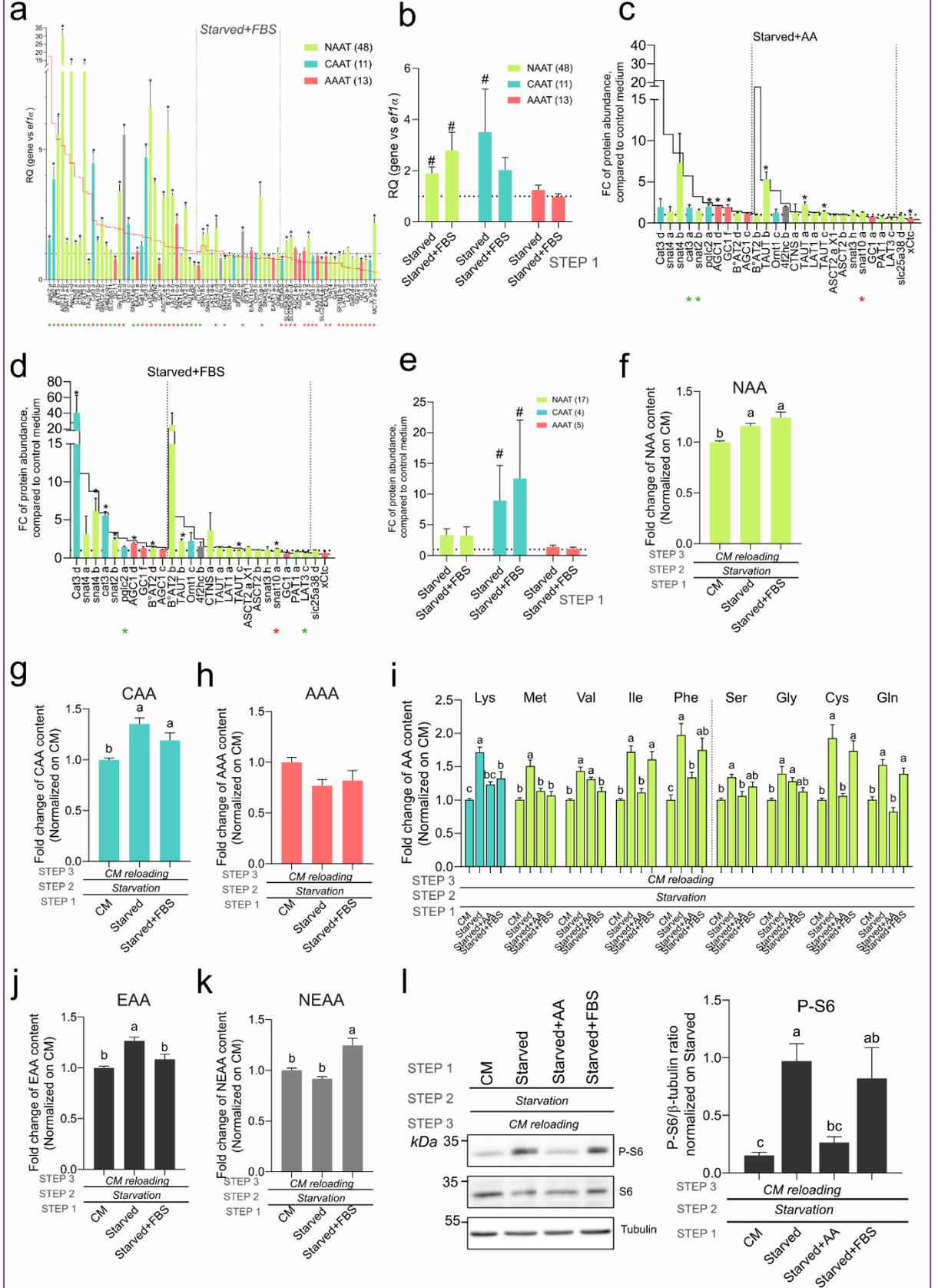


Figure S3: AA mainly drove AAT dysregulation influencing AA content and mTORC1 signalling

a. Relative Quantification (RQ) of AAT expressed in RTH-149 cell line in starved+FBS condition, compared to CM and normalized on EF1 α expression. AAT were classed from the most upregulated to the most downregulated in starved condition; red line refers to AAT profiles measured upon starved condition and colours to AAT category. Black *: t-test significant differences from CM; red and green * indicated below gene names represent t-test significant differences from starved condition, depending on regulation direction (red for upregulation and green downregulation) (N=3).

b. Mean RQ for each AAT category in starved condition supplemented or not with FBS, compared to CM and normalized on EF1 α expression. #: t-test significant differences from CM. Numbers refer to AAT in each category (N=3).

c.d. FC of protein abundance in starved+AA (c) and starved+FBS (d) conditions, compared to CM, of AAT identified in proteomic analysis, classed from the most upregulated to the most downregulated AAT in starved condition. Black line refers to starved level, colours to AAT category. *: t-test significant differences from CM (N=4). red and green * indicated below gene names represent t-test significant differences from starved condition, depending on regulation direction (red for upregulation and green downregulation).

e. Mean Fold Change of protein abundance for each AAT category in starved condition supplemented or not with FBS, compared to CM and normalized on EF1 α expression. #: t-test significant differences from CM. Numbers refer to AAT in each category (N=4).

f.g.h. FC of NAA (f), CAA (g), AAA (h), intracellular contents measured after step 3 and normalized to CM. Letters: One-way Anova statistical differences (N=7 and N=3 for AAA).

i. FC of the 9 AA identified as being subjected to intracellular enrichment following a starvation. Intracellular contents of the indicated AA were measured at step 3 and normalized to CM. Letters: One-way Anova statistical differences (N=7).

j.k. FC of EAA (j), NEAA (k) intracellular contents measured after step 3 and normalized to CM. Letters: One-way Anova statistical differences (N=7).

l. Representative Western Blot and quantification of S6 phosphorylation state measured at step 3 and normalized on β -tubulin and starved condition. Letters: One-way Anova statistical differences (N=7). Different letters indicate a significant difference (p value <0.05).



Figure S5: Single AA deficiencies affect AAT expression but with fewer consequences on AA absorption and mTOR signalling; while highlighting specific AA for mTOR activation

a. FC of the 9 AA identified as being subjected to intracellular enrichment following a starvation. Intracellular contents of the indicated AA were measured at step 3 and normalized to CM. letters: One-way Anova statistical differences (N=7). b. Pearson correlation between the indicated AA intracellular contents and S6 phosphorylation state measured from the dataset of the previous 10 experimental conditions analysed. Confident intervals were shown, r=pearson coefficient; p=p-value. c. Venn diagram of upregulated (left) and downregulated (right) AAT in each single deficiencies, colours refer to AAT category.



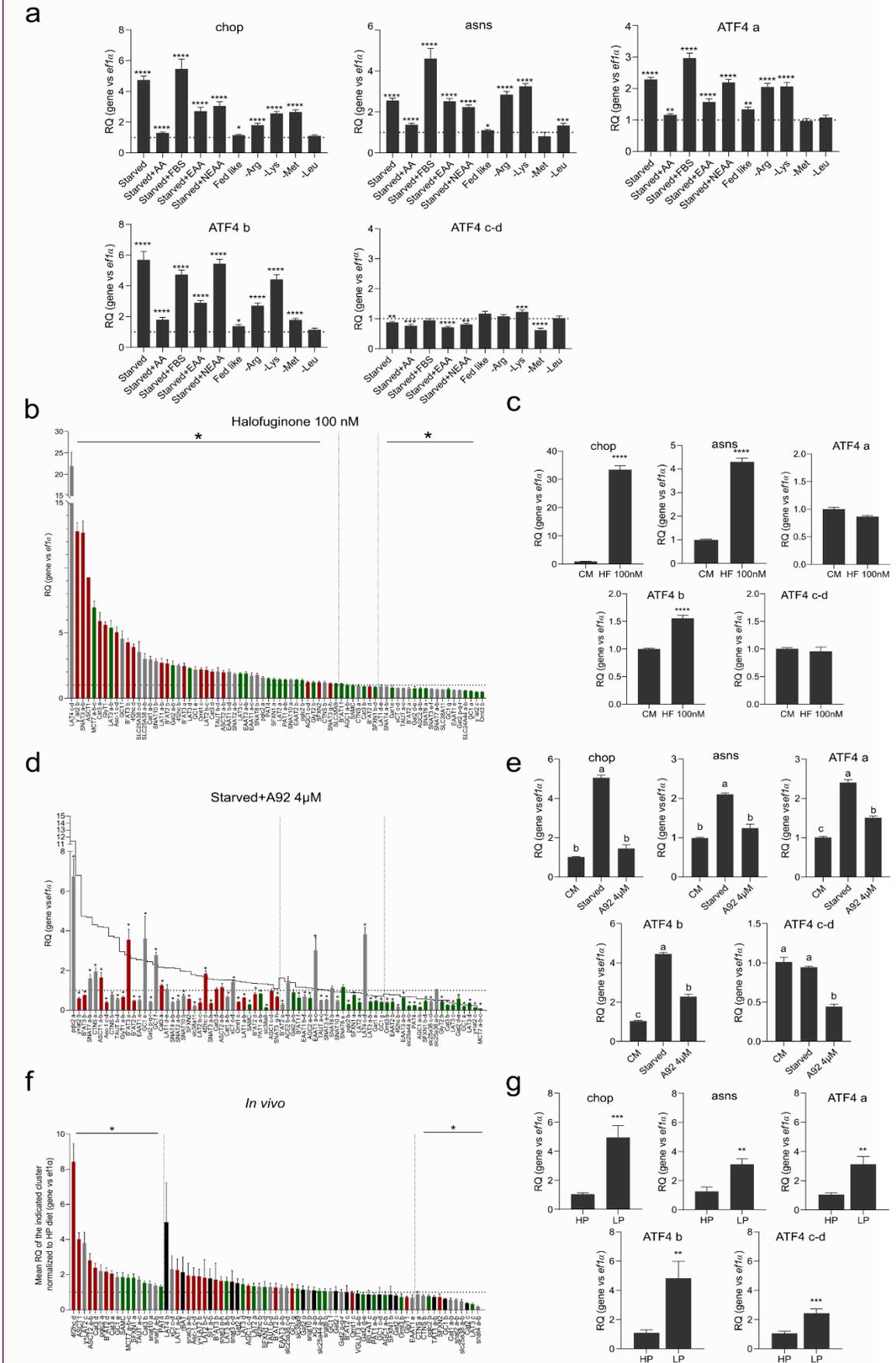


Figure S6: Insightful knowledge brought by clustering of AAT according to their nutritional regulations

a. Relative Quantification (RQ) of GCN2 target genes (chop, asns and ATF4 paralogs) in RTH-149 cell line in the 10 experimental conditions tested, compared to CM and normalized on EF1 α expression. *: t-test significant differences level compared to CM. b. RQ of AAT in CM+100nM Halofuginone condition, compared to CM and normalized on EF1 α expression, classed from the most upregulated to the most downregulated AAT. Colours refer to cluster. *: t-test statistical differences from CM (N=5). c. RQ of GCN2 target genes in CM+100nM Halofuginone, compared to CM and normalized on EF1 α expression. *: t-test significant differences level compared to CM (N=5). d. RQ of AAT in starved+A92 conditions, compared to CM and normalized on EF1 α expression, classed from the most upregulated to the most downregulated AAT in starved condition. Grey line refers to AAT profiles measured upon starved condition and colours to clusters. *: t-test statistical differences from CM (N=3). e. RQ of GCN2 target genes in starved conditions supplemented or not with 4 μ M A92, compared to CM and normalized on EF1 α expression. Letters: One-way Anova statistical differences. (N=3). f. RQ of AAT *in vivo* in liver of rainbow trout fed with Low Protein (LP) diet, compared to High Protein diet (HP) and normalized on EF1 α expression, classed from the most upregulated to the most downregulated. Colours refer to clusters; black bars correspond to AAT only express *in vivo*, so not found in RTH-149 cells. *: t-test statistical differences from CM (N=9). g. RQ of GCN2 target genes *in vivo* in liver of rainbow trout fed with LP and HP diets, compared to HP and normalized on EF1 α expression. *: t-test significant differences level compared to HP (N=9).



Supplementary Table 1: Rainbow trout AAT identification and expression profile.

In silico identification of rainbow trout AAT, compared to human, with paralogs number, gene ID and attributes names. Blue italic AAT refer to genes identified compared to *D. rerio* AAT. Expression profile in different biological models were specified: Y=Yes, N=No. *In vivo* expression: pool of RT tissues (stomach, gut, liver, muscle, ovary, spleen, kidney, brain and adipose tissue). * : for Cat1a and Ornt1b, geneID and chromosom position correspond to Omyk_1.0 genome. All CAAT referred in this table were previously identified by Morin and coworkers¹³.

Human transporter	Human gene	Paralogs Number	Substrate Category	Chromosoms	geneID	Attributes name	In vivo expression	Liver expression	RTH-149 expression
EAAT3	slc1a1	2	A	9	110531767	<i>EAAT3 a</i>	Y	Y	Y
				20	110500880	<i>EAAT3 b</i>	Y	Y	Y
EEAT2	slc1a2	4	A	1	110522323	<i>EAAT2 a</i>	Y	N	N
				2	110497158	<i>EAAT2 b</i>	Y	N	Y
				26	118944446	<i>EAAT2 d</i>	N	N	N
				6	110527005	<i>EAAT2 c</i>	N	N	N
EEAT1	slc1a3	5	A	1	110502566	<i>EAAT1 a</i>	Y	N	Y
				5.2	110524216	<i>EAAT1 c</i>	Y	N	Y
				5.1	110523776	<i>EAAT1 b</i>	Y	Y	Y
				12	110537147	<i>EAAT1 d</i>	Y	Y	Y
				6	110525225	<i>EAAT1 e</i>	Y	Y	Y
ASCT1	slc1a4	2	N	1	110531632	<i>ASCT1 a</i>	Y	Y	Y
				23	110531639	<i>ASCT1 b</i>	Y	Y	Y
ASCT2	slc1a5	2	N	24	110503495	<i>ASCT2 a</i>	Y	Y	Y
				27	110507436	<i>ASCT2 b</i>	Y	Y	Y
EAAT4	slc1a6	0	A	Not Found					
EAAT5	slc1a7	3	A	5	110524687	<i>EAAT5 a</i>	N	N	N
				8	110531019	<i>EAAT5 b</i>	N	N	N
				28	110509189	<i>EAAT5 c</i>	N	N	N
EAAT6	slc1a8	4	A	5	110524108	<i>EAAT6 b</i>	Y	N	N
				1	110489874	<i>EAAT6 a</i>	Y	N	N
				18	110497072	<i>EAAT6 d</i>	N	N	N
				7	110497076	<i>EAAT6 c</i>	N	N	N
EAAT7	slc1a9	2	A	13	110486646	<i>EAAT2 a</i>	Y	Y	N
				12	110538991	<i>EAAT2 b</i>	Y	Y	N
rBAT	slc3a1	1	T	20	110499302	<i>rBat</i>	Y	Y	N
4f2hc	slc3a2	4	T	10	110533969	<i>4f2hc a</i>	N	N	N
				21	110500797	<i>4f2hc b</i>	Y	Y	Y
				27	110507427	<i>4f2hc c</i>	N	N	N
				Y	110509955	<i>4f2hc d</i>	Y	Y	Y



GAT1	slc6a2	8	N	7	110528658	<i>Gat1 b</i>	Y	Y	N
				17	110504503	<i>Gat1 d</i>	Y	N	N
				9	110531998	<i>Gat1 a</i>	N	N	N
				16	110492407	<i>Gat1 c</i>	Y	N	N
				15	110499848	<i>Gat1 f</i>	N	N	N
				18	110496877	<i>Gat1 e</i>	Y	Y	Y
				15	110499842	<i>Gat1 g</i>	N	N	N
				21	110514342	<i>Gat1 h</i>	N	N	N
GlyT2	slc6a5	3	N	6	110526924	<i>GlyT2 b</i>	Y	N	Y
				2	110499833	<i>GlyT2 a</i>	N	N	N
				26	110499833	<i>GlyT2 d</i>	N	N	N
TAUT	slc6a6	4	N	7	110528591	<i>TAUT a</i>	Y	Y	Y
				17	110493294	<i>TAUT c</i>	Y	Y	Y
				9	110531953	<i>TAUT b</i>	Y	Y	Y
				16	110492485	<i>TAUT d</i>	Y	Y	Y
PROT	slc6a7	1	N	10	110533742	<i>PROT</i>	N	N	N
GlyT1	slc6a9	2	N	8	110530321	<i>GlyT1 a</i>	Y	Y	Y
				28	110508726	<i>GlyT1 b</i>	Y	Y	Y
GAT3	slc6a11	0	N	Not Found					
BGT1	slc6a12	0	N	Not Found					
GAT2	slc6a13	18	N	2	110493383	<i>Gat2 a</i>	Y	N	Y
				30	110521389	<i>Gat2 b</i>	Y	N	Y
				15	110490150	<i>Gat2 c</i>	Y	Y	N
				15	110499854	<i>Gat2 d</i>	Y	Y	Y
				21	110499843	<i>Gat2 e</i>	Y	Y	Y
				27	110507993	<i>Gat2 f</i>	N	N	N
				7	110528327	<i>Gat2 g</i>	N	N	N
				7	110528327	<i>Gat2 h</i>	N	N	N
				7	110527587	<i>Gat2 i</i>	Y	Y	N
				7	110528308	<i>Gat2 j</i>	N	N	N
				7	110528307	<i>Gat2 k</i>	Brain	Y	N
				17	110494125	<i>Gat2 l</i>	N	N	N
				23	110503031	<i>Gat2 m</i>	N	N	N
				12	110537741	<i>Gat2 n</i>	Brain	N	N
				12	110537636	<i>Gat2 o</i>	Y	Y	N
				17	110494093	<i>Gat2 p</i>	Y	Y	Y
				17	110494094	<i>Gat2 q</i>	Y	Y	Y
				17	110494095	<i>Gat2 r</i>	Y	Y	Y
ATB ⁰⁺	slc6a14	1	C	7	110528352	ATB ⁰⁺	Y	Y	N
B ⁰ AT2	slc6a15	4	N	1	110524453	B ⁰ AT2 a	Y	N	Y
				2	110499724	B ⁰ AT2 b	Y	Y	Y



				12	118937783	B ⁰ AT2 c	Y	Y	N
				16	110491573	B ⁰ AT2 d	Y	Y	Y
B ⁰ AT3	slc6a17	3	N	9	110531270	B ⁰ AT3 a	Y	N	Y
				16	110491175	B ⁰ AT3 b	Y	N	Y
				17	110494349	B ⁰ AT3 c	Y	N	N
XT2	slc6a18	2	N	32	110489359	XT2 a	Y	N	N
				32	110489437	XT2 b	Y	N	N
B ⁰ AT1	slc6a19	6	N	2	110514444	B ⁰ AT1 a	Y	N	N
				3	110520772	B ⁰ AT1 c	Y	N	N
				2	110516599	B ⁰ AT1 b	Y	N	N
				3	110519055	B ⁰ AT1 d	Y	N	N
				18	110496758	B ⁰ AT1 e	Y	N	N
				32	110489357	B ⁰ AT1 f	Y	N	Y
SIT1	slc6a20	2	N	2	110539196	SIT1 a	Y	Y	N
				3	110511872	SIT1 b	Y	Y	N
Cat1	slc7a1	3	C	10*	110533230*	Cat1 a*	Y	Y	Y
				10	110533232	Cat1 b	Y	Y	Y
				27	110507241	Cat1 c	N	N	N
Cat2	slc7a2	4	C	14	110489197	Cat2 a	Y	N	N
				31	110504480	Cat2 b	Y	N	N
				31	110504711	Cat2 c	Y	Y	N
				Y	110510086	Cat2 d	N	N	N
Cat3	slc7a3	4	C	10	110534152	Cat3 a	Y	Y	Y
				14	110488786	Cat3 b	Y	Y	Y
				31	110504989	Cat3 c	N	N	N
				Y	110510151	Cat3 d	Y	Y	Y
Cat4	slc7a4	2	C	6	110525572	Cat4 a	Y	N	N
				11	110535941	Cat4 b	Y	N	N
LAT1	slc7a5	5	N	1	110511826	LAT1 a	Y	Y	Y
				2	110493900	LAT1 b	Y	Y	Y
				6	110514126	LAT1 c	N	N	N
				9	110532220	LAT1 d	Y	Y	Y
				16	110491824	LAT1 e	Y	Y	Y
y ⁺ LAT2	slc7a6	5	C	6	110526237	y ⁺ lat2 a	N	N	N
				8	110530061	y ⁺ lat2 b	Y	Y	Y
				32	110487934	y ⁺ lat2 c	Y	Y	Y
				18	110496550	y ⁺ lat2 d	N	N	N
				26	110506393	y ⁺ lat2 e	N	N	N
y ⁺ LAT1	slc7a7	2	C	9	110531642	y ⁺ lat1 a	Y	N	N
				21	110500506	y ⁺ lat12 b	Y	N	N



LAT2	slc7a8	3	N	8	110530618	LAT2 a	Y	Y	Y
				9	110531623	LAT2 b	Y	Y	Y
				21	110500480	LAT2 c	Y	Y	Y
B ⁰⁺ AT	slc7a9	3	C	19	110497769	B ⁰⁺ AT a	N	N	N
				25	110505695	B ⁰⁺ AT b	N	N	N
				26	110510393	B ⁰⁺ AT c	Y	Y	N
Asc-1	slc7a10	4	N	1	110524148	Asc-1 a	Y	N	N
				2	110499202	Asc-1 b	Y	N	N
				6	110514610	Asc-1 c	Y	Y	Y
				26	110516700	Asc-1 d	Y	Y	Y
xCt	slc7a11	4	A	15	110490496	xCt a	Y	Y	N
				21	110499969	xCt b	Y	Y	N
				14	110487732	xCt c	Y	Y	Y
				31	110505014	xCt d	Y	Y	Y
Asc-2	slc7a12	0	N	Not Found					
AGT1	slc7a13	0	N	Not Found					
slc7a14	slc7a14	3	C	18	110527386	slc7a14 a	Y	N	N
				7	110527387	slc7a14 b	N	N	N
				15	110490917	slc7a14 c	Y	Y	N
MCT7	slc16a6	5	N	13	110485325	MCT7 a	Y	Y	Y
				13	110485326	MCT7 b	Y	Y	Y
				12	118937837	MCT7 c	Y	Y	Y
				20	110499208	MCT7 d	Y	N	N
				23	110502925	MCT7 e	N	N	N
TAT1	slc16a10	3	N	4	110522149	TAT1 a	Y	Y	N
				8	110529198	TAT1 b	Y	Y	N
				25	110504195	TAT1 c	N	N	N
VGLUT2	slc17a6	3	A	6	110526515	VGLUT2 a	Y	N	N
				26	110506645	VGLUT2 b	Y	N	N
				30	110521189	VGLUT2 c	Y	N	N
VGLUT1	slc17a7	4	A	12	118937784	VGLUT1 a	Y	N	N
				13	110487029	VGLUT1 b	Y	N	N
				16	110491576	VGLUT1 c	Y	N	N
				20	110491576	VGLUT1 d	Y	N	N
VGLUT3	slc17a8	2	A	1	110522804	VGLUT3 a	Y	Y	N
				2	110497771	VGLUT3 b	Y	Y	N
Ornt2	slc25a2	0	C	Not Found					
AGC1	slc25a12	4	A	3	110520101	AGC1 a	Y	Y	Y
				22	110501456	AGC1 b	Y	Y	Y
				8	110530664	AGC1 c	Y	Y	Y
				28	110509207	AGC1 d	Y	Y	Y



AGC2	slc25a13	2	A	18	110509207	AGC2 a	Y	N	Y
				32	110488013	AGC2 b	Y	N	Y
Ornt1	slc25a15	3	C	10	110534225	Ornt1 a	N	N	N
				27*	110507247*	Ornt1 b*	N	N	N
				27	110508105	Ornt1 c	Y	Y	Y
GC2	slc25a18	0	A	Not Found					
GC1	slc25a22	7	A	1	110523386	GC1 a	Y	Y	Y
				2	110516669	GC1 b	Y	Y	N
				6	110526530	GC1 c	Y	Y	N
				6	110518525	GC1 d	Y	Y	N
				7	110527759	GC1 e	Y	Y	Y
				17	110494701	GC1 f	Y	Y	Y
				30	110521172	GC1 g	Y	Y	Y
SAMC	slc25a26	1	N	17	110494503	SAMC	Y	Y	Y
Ornt3	slc25a29	2	C	4	110522494	Ornt3 a	N	N	N
				19	110498176	Ornt3 b	Y	Y	Y
slc25a38	slc25a38	4	N	12	110538473	slc25a38 a	Y	Y	Y
				13	110486514	slc25a38 b	Y	Y	Y
				13	110485796	slc25a38 c	Y	Y	Y
				17	110493547	slc25a38 d	Y	Y	Y
slc25a44	slc25a44	2	N	6	110526738	slc25a44 a	Y	Y	Y
				26	110517597	slc25a44 b	Y	Y	Y
VIAAT	slc32a1	5	N	4	110493547	VIAAT a	N	N	N
				7	110527704	VIAAT b	Y	N	N
				17	110494768	VIAAT c	Y	N	N
				9	110532052	VIAAT d	Y	N	N
				16	110492348	VIAAT e	Y	N	N
PAT1	slc36a1	2	N	14	110489216	PAT1 a	Y	Y	Y
				31	110504544	PAT1 b	Y	Y	Y
PAT2	slc36a2	0	N	Not Found					
PAT3	slc36a3	0	N	Not Found					
PAT4	slc36a4	1	N	27	110507984	PAT4	Y	Y	Y
SNAT1	slc38a1	0	N	Not Found					
SNAT2	slc38a2	2	N	21	110499958	SNAT2 a	Y	Y	Y
				15	110490511	SNAT2 b	Y	Y	Y
SNAT3	slc38a3	8	N	7	110528155	SNAT3 a	Y	Y	Y
				17	110494279	SNAT3 b	Y	Y	Y
				7	110527782	SNAT3 c	Y	Y	N
				17	110494674	SNAT3 d	Y	Y	N
				9	110532146	SNAT3 e	N	N	Y
				16	110492273	SNAT3 f	N	N	Y



				9	110532471	<i>SNAT3 g</i>	Y	N	Y
				16	110492139	<i>SNAT3 h</i>	Y	N	Y
SNAT4	slc38a4	2	N	15	110490512	<i>SNAT4 a</i>	Y	Y	Y
				21	110499957	<i>SNAT4 b</i>	Y	Y	Y
SNAT5	slc38a5	0	N	Not Found					
SNAT6	slc38a6	2	N	19	110497839	<i>SNAT6 a</i>	N	N	N
				25	110505626	<i>SNAT6 b</i>	Y	Y	Y
SNAT7	slc38a7	2	N	6	110526454	<i>SNAT7 a</i>	Y	Y	Y
				26	110506580	<i>SNAT7 b</i>	Y	Y	Y
SNAT8	slc38a8	2	N	2	110495203	<i>SNAT8 a</i>	Y	N	N
				26	110506232	<i>SNAT8 b</i>	N	N	Y
slc38a9	slc38a9	1	C	5	110523173	slc38a9	Y	Y	Y
SNAT10	slc38a10	2	N	20	110499205	<i>SNAT10 a</i>	Y	N	Y
				23	110503021	<i>SNAT10 b</i>	Y	Y	Y
slc38a11	slc38a11	1	N	3	110505257	<i>slc38a11</i>	N	N	Y
LAT3	slc43a1	4	N	10	110534431	<i>LAT3 a</i>	Y	Y	Y
				19	110498668	<i>LAT3 b</i>	Y	Y	Y
				14	110488829	<i>LAT3 c</i>	Y	Y	Y
				31	110505037	<i>LAT3 d</i>	Y	Y	Y
LAT4	slc43a2	4	N	Y	110517633	<i>LAT4 a</i>	Y	Y	N
				10	110534814	<i>LAT4 b</i>	Y	Y	N
				24	110503649	<i>LAT4 c</i>	Y	Y	Y
				27	110507524	<i>LAT4 d</i>	Y	Y	Y
SFXN1	SLC56A 1	4	N	1	110530947	<i>SFXN1 a</i>	Y	Y	Y
				14	110487787	<i>SFXN1 b</i>	Y	Y	Y
				23	110502652	<i>SFXN1 c</i>	Y	Y	N
				31	110504533	<i>SFXN1 d</i>	Y	Y	Y
SFXN2	slc56a2	1	N	23	110502746	<i>SFXN2</i>	Y	Y	Y
SFXN3	slc56a3	0	N	Not Found					
Cystinosin	CTNS	2	N	1	110503198	<i>CTNS a</i>	Y	Y	Y
				5	110524220	<i>CTNS b</i>	Y	Y	Y
pqlc2	slc66a1	2	N	9	110532347	<i>pqlc2 a</i>	Y	Y	Y
				16	110492259	pqlc2 b	Y	Y	Y



Supplementary Table 2: List of primers designed and used for the study

Table of newly designed and validated primers

Genes	Forward Primer	Reverse Primer	Efficiency
EAAT3 a & EAAT3 b	5'-GATCTCTTCCAGCTCTGCCA-3'	5'-GAGCTGGGCAATGAAGATGG-3'	1.97
EAAT2 a	5'-AGGCCCAGGAACAAGTGTAT-3'	5'-GAACGCAATCACCATGACGA-3'	1.87
EAAT2 b	5'-ATGCTGGTCAGATCGTCACT-3'	5'-GTATGAGTCTCCCACCACGT-3'	1.93
EAAT1 a & EAAT1 c	5'-TCCTGAGACGCAACCTCTTT-3'	5'-CCATCTTCCCAGACGCTTTG-3'	1.98
EAAT1 b & EAAT1 d	5'-ATCGTGGTGCTCATCATCCA-3'	5'-CTCAGTCAGGTTGGTCAGGT-3'	2.02
EAAT1 e	5'-TATGACCAAGAGCAACGGGG-3'	5'-AGTGCAAATCCCAGCCCTAT-3'	1.92
ASCT1 a & ASCT1 b	5'-GGTCATCCTGCCTCTCATCT-3'	5'-GGATGAAACGACTGATCCGC-3'	2.00
ASCT2 a & ASCT2 b	5'-ATGGCGTTCATCATCTCCCC-3'	5'-GAAAGGCAGCAGACACCAAG-3'	1.93
EAAT6 a & EAAT6 b	5'-CCTCCTCCCCTTCTTCTACC-3'	5'-CCGATCCACATTGCAGTTCT-3'	2.04
EAAT7 a & EAAT7 b	5'-AGCCATCTTCATCGCTCAGA-3'	5'-GGTACGCATTCTGTCAAGCA-3'	1.80
Gat1 a	5'-GACAGCACCCTCACCTTTC-3'	5'-GGAAGGTTAGATGGGCAGGA-3'	2.08
Gat1 b	5'-TCCATGCTCCTGATACCTGG-3'	5'-TCGGAGACAGGCTGAATAGAA-3'	1.80
Gat1 d	5'-TGTTCAAGTGCAGTCCAAATGG-3'	5'-GCAATGTTGGTCTCGGCAA-3'	1.95
Gat1 e	5'-CTCTGTTGGTTGTTGGGGTC-3'	5'-GGCACACAGACACATCATGG-3'	2.04
GlyT2 b	5'-AGACACATACGCTGCCTCTT-3'	5'-TAGGAGTCACAAAGGCCAG-3'	1.99
TAUT a & TAUT c	5'-GGGGTCTGGGTCATCTGTTT-3'	5'-ACGTTGCAGGCTCTGGGTAC-3'	1.98
TAUT b & TAUT d	5'-TATCACTCCCGTCCTCTGTG-3'	5'-AACTCGCACCTCCCTTTACT-3'	1.97
GlyT1 a & GlyT1 b	5'-ACAGAAATGGAGGAGGAGCC-3'	5'-CCACACCTTTGAACATGGGG-3'	2.03
Gat2 a & Gat2 b	5'-GCCACAGAGCGATGAGAAGA-3'	5'-AGGGGATGAAGAAAGCACCT-3'	2.01
Gat2 c	5'-GCTTTAGTGGCCTTCATCTCC-3'	5'-ATGTGGCTGGGGTGACATAC-3'	1.91
Gat2 d & Gat2 e	5'-TGTCATGTTTGAAGGAGT-3'	5'-GGAGAGGTGTGGGTTCAACA-3'	1.98
Gat2 i	5'-GTTTCGGAGGTCTGGGCTTT-3'	5'-ACAGTCAAACAACACACAGGT-3'	1.90
Gat2 k	5'-AGGTTTGGATGGATGCAGGA-3'	5'-ATGTCCACACCCTGTTCTCC-3'	1.97
Gat2 n	5'-GTGTGCACAGCTACCTTCATC-3'	5'-AGGGCCATCTGTTCTGCAT-3'	1.88
Gat2 o	5'-TCACCACTACTTCTGCTGCC-3'	5'-TCCTGAGTACCTGATTCTTTCC-3'	2.01
Gat2 p & Gat2 q & Gat2 r	5'-GTTCACTCTCTCCTCCACCC-3'	5'-CCGTGTCTCTGTCTAGGAGG-3'	1.93
Gat2 f	5'-GAGGGTATCGGCTATGCAGG-3'	5'-AGAGGAGAAGTCAACACAGTCA-3'	1.95
B ⁰ AT2 a	5'-ACGAGTGATGATGTCTCCCC-3'	5'-GAGATCCGGGTAGTGTCTGC-3'	1.95
B ⁰ AT2 c	5'-ACAACCCCATCCACAACAAC-3'	5'-TGTCGTTTAAACAGGCCCAGA-3'	2.02
B ⁰ AT2 d	5'-GCGAGGATGGTCAGGAGG-3'	5'-AGCTCCAGGAAGAACAAGGG-3'	1.97
B ⁰ AT2 b	5'-TGCTGCCCCGTGTATGTG-3'	5'-GTTCTGAGGGCTTAAAGGTGG-3'	2.02
B ⁰ AT3 a	5'-GCACAGAGGAGAGATGGGTG-3'	5'-CGGGTCAGAGGTCAGAGATG-3'	2.09



B ⁰ AT3 c	5'-GAAGATTGTTCTCGAGCCCC-3'	5'-CGCTAGCTCCAGGAAGAAGA-3'	1.89
B ⁰ AT3 b	5'-CTCTCCCATGCCTTCTCACC-3'	5'-GGGTTGTGTTGTGTTGGGTT-3'	1.95
XT2 a & XT2 b	5'-ACGGAATAGGACGGTTCAGT-3'	5'-CTCTGTGTCGGGGAAGTTCA-3'	1.98
B ⁰ AT1 a & B ⁰ AT1 b	5'-CATCTACACCCGAGGAACCA-3'	5'-GGAAAGGAATCATGAATGCACCT-3'	1.98
B ⁰ AT1 c & B ⁰ AT1 d	5'-CCCCGCCATCATGTTTGTGTC-3'	5'-ACTCATTATCCTTCTTGCAGCAG-3'	1.98
B ⁰ AT1 e	5'-CCTACCTCGTATGGGACCAG-3'	5'-CCTGTTACTTTTAGTCCATCGGT-3'	2.02
B ⁰ AT1 f	5'-GGAGGCGATCACTGGTATTG-3'	5'-CCAGAACAGGTTGGGCTTG-3'	1.94
SIT1 a & SIT1 b	5'-TGTCCTGGCGTGTGTATCAT-3'	5'-CTCTCCATGCTCCAATGCTG-3'	2.00
LAT1 a & LAT1 b	5'-TACGCCTTCTCCAACGACAT-3'	5'-GATAGGCAGCAGGATATTCACC-3'	1.93
LAT1 d & LAT1 e	5'-GGAGGCCCATCAAGATTTGG-3'	5'-GTACCCCAAGATAGGCGG-3'	1.88
LAT2 a	5'-GCCACAATGCTTCAACACCT-3'	5'-TGGGTTGAACACATCTCCTAGA-3'	1.90
LAT2 b & LAT2 c	5'-GGCCTTCTGCTCATCTTCT-3'	5'-CCCTTCGTTTCCCTGGATA-3'	2.05
Asc-1 a	5'-TGGAAGAAGCCCAAACCTTTACA-3'	5'-AGGTTGCTGACTCGATGAAGT-3'	2.00
Asc-1 b	5'-TGCAGACATGGATGGAGGAA-3'	5'-ACTGAACCCGAGTGCTCTAG-3'	1.93
Asc-1 c & Asc-1 d	5'-TCGCCGTCAGATAGAGTCAC-3'	5'-CAGCTCAGCGTAACACATGG-3'	1.96
xCt a & xCt b	5'-GCTGATCAACTTTGCCTCCT-3'	5'-GGTGCACGGTCAGGTAGTA-3'	2.01
xCt c & xCt d	5'-TCTGGGAGTGTTGGAATGTCT-3'	5'-CATCTGTGGTCCAAAGGCCT-3'	1.93
MCT7 a & MCT7 b & MCT7 c	5'-TGTCCCAGTACTTCAGCAGG-3'	5'-CTGGTCAGGTCGGATGATGA-3'	1.85
MCT7 d	5'-TCCATCTGCGTCTTCACTATGA-3'	5'-GGCAGGAAGGTCAGACAGTA-3'	1.91
TAT1 a & TAT1 b	5'-GAGCAAGGTGTTCAACGTCA-3'	5'-CACATGAGCAGAACCTCCTTG-3'	1.89
VGLUT2 a & VGLUT2 b	5'-ATGGAGTCCGTCAAGATGAGA-3'	5'-ACAGAGGTGCTTTCTTCTCCT-3'	1.92
VGLUT2 c	5'-ATCCCGAACCCGTTAAGCAT-3'	5'-GCAGTCACATAAAGGCGGTT-3'	2.13
VGLUT1 a & VGLUT1 b	5'-TGCTCGTACACACTACAGCT-3'	5'-CCCAAACTGCCATAGACGT-3'	1.91
VGLUT1 c & VGLUT1 d	5'-GGCAGCACGAACCTCACATT-3'	5'-GCATAGGACCCACAAAAGGC-3'	2.01
VGLUT3 a & VGLUT3 b	5'-CGCAGTCGTAATAATCATGTCAAC-3'	5'-GAACCCTGAGATGGCAAAGC-3'	1.82
AGC1 a & AGC1 b	5'-CTCCACCAGCTCCTTCGTAG-3'	5'-CCTCTGTGGTGAATTTGTCTCTT-3'	1.89
AGC1 c & AGC1 d	5'-CAGGGTGATGGTTCCAGGT-3'	5'-TTCTCCTACGAACGAGCCTG-3'	1.96
AGC2 a & AGC2 b	5'-CTGGGAGCAGTAGAGTCCTG-3'	5'-TCCTGTCAATGTCCACCAGA-3'	1.95
GC1 a	5'-ATCGGAGGAGGAGGAAGGAA-3'	5'-GTCAAACAGTCCAGCATCCC-3'	1.97
GC1 b	5'-ACATATCAACTCTCTGACGACCA-3'	5'-CCCTCTGTACATCCCGAAGT-3'	1.82
GC1 c & GC1 d	5'-GGTCAGAAGCTTAGCCTGC-3'	5'-TGCTGTATGGGACCTCAACT-3'	2.04
GC1 e	5'-TTTCCATTGTCTCGCGTTG-3'	5'-TCTGCTGCTTGGTCATGGTA-3'	1.93
GC1 f	5'-AACGAGGAGAGCTACAACGG-3'	5'-GCTGGTCTTGTCTCATGCAG-3'	1.97
GC1 g	5'-AGGATCCAGTCTATGAACAGGG-3'	5'-TGTTCTTGTCACTTAGTTGCCA-3'	2.01
SAMC	5'-GAATAGCAGCGTTCGTACC-3'	5'-GTGCCAGAAAACAGACCCG-3'	2.05
slc25a38 a & slc25a38 b	5'-CCCACATCTGTACAGGAGGA-3'	5'-TCAGGACTTGAGCCCCATG-3'	1.85



slc25a38 c & slc25a38 d	5'-GGTCAAGACTCACATCCAGGT-3'	5'-ATCAGTTCCTCCCTGTCTCC-3'	1.98
slc25a44 a & slc25a44 b	5'-GGATATGTGGCCTCCCTTCT-3'	5'-TGCCTTCAACCTGCACTCTA-3'	1.94
VIAAT b & VIAAT e	5'-TCTAAAGCCTCAGGTCTGGG-3'	5'-GTCTTCGTCTCCTCGTACA-3'	1.82
VIAAT c & VIAAT d	5'-GTGTAACGAGTTGGCATCAGA-3'	5'-GCGCACCAGAATTCCATCC-3'	1.96
PAT1 a & PAT1 b	5'-GGCATCGTCACCTTCTCTA-3'	5'-TGAAGGGCAAAGGTGATGTAGA-3'	2.09
PAT4	5'-CACCAGGGCATCACGTTTAC-3'	5'-GTGAACACAGACCACACCC-3'	2.00
SNAT2 a & SNAT2 b	5'-GATTATCATCCAGGCACCGC-3'	5'-AGGGAGAAGATGGACACAGC-3'	1.94
SANAT3 a & SNAT3 b	5'-TCAGTGTATCCTGCCTCTG-3'	5'-TAGGCCGTCTGTGAGTTGAG-3'	1.94
SNAT3 c & SNAT3 d	5'-ATCTACACTGAGCTCCGCAA-3'	5'-GGGAAGAGCACAAATGGGGA-3'	1.83
SNAT3 e & SNAT3 f	5'-CCTACAGCAAAGTGGACCCT-3'	5'-CACGAAGAGGAGACACAGGG-3'	1.96
SNAT3 g & SNAT3 h	5'-CTGGCTCCATCATCACCATG-3'	5'-GTGGAAAGATGATGATGACGCT-3'	1.91
SNAT6 b	5'-CCTGGCTTTCTCCTTCTCT-3'	5'-CTCTGAGTCTACGTGGCTGT-3'	1.92
SNAT7 a & SNAT7 b	5'-TGTTGGCACCTGGTATGTCA-3'	5'-CACACTGCTCACATGACACT-3'	1.90
SNAT8 a	5'-TCATCTTCCCAGGGCTATGTC-3'	5'-ACTCCCCTATTCCTACCCAGT-3'	2.07
SNAT8 b	5'-CAAAGTCAGGGTGGTGTGC-3'	5'-AGTGCTGGTGATTTTGGTTGT-3'	2.00
SNAT10 a	5'-CCCCAGATCAAAGGACCTGA-3'	5'-CTCAGACTGCCCTCTTCTC-3'	1.97
SNAT10 b	5'-CCCCAGATCAAAGGACCTGA-3'	5'-CTCAGACTCTTCTCCTCCCG -3'	2.09
slc38a11	5'-GGAGAATGGCGAAGGGAAAC-3'	5'-TGCTACCAAACCAGGAGAAAA-3'	1.91
LAT3 a & LAT3 b	5'-ATGAAGGAGTGCAGCGTAGA-3'	5'-GGTGTGGACGATGAAGGAAATT-3'	1.92
LAT3 c	5'-ACATTCTGTCAACGTTGTGTCA-3'	5'-ATCGTGTCTGTTCTCTGAGCA-3'	1.82
LAT3 d	5'-TGTGGCAGAGACAGAGAAGAG-3'	5'-GTGGAGGATGAAGGTCAGGA-3'	1.97
LAT4 b	5'-CAACATCCAACCTGAACTCCTGT-3'	5'-TTCAGAGAACGGGGAGAGC-3'	1.85
LAT4 a	5'-CTCTGAACTTCTGTCTCGGC-3'	5'-GTCAACGCCATCCACCATC-3'	1.94
LAT4 c & LAT3 d	5'-GTACCTCCAGATGAACGGCT-3'	5'-TGGACAGATTCTTGGGGTCG-3'	1.95
SFXN1 a	5'-AGACTGGCACCGTGTACATC-3'	5'-CGGCTCCTTGATGTTAATGTCC-3'	1.96
SFXN1 c	5'-AAGCGTTCCAGTCCTAAA-3'	5'-GGGATTATGCATGGTGGGTG-3'	2.00
SFXN1 b & SFXN1 d	5'-TGCTCCTCTCTCAGTCAATCA-3'	5'-AATGCCGTGTTTCAGTTCCC-3'	1.78
SFXN2	5'-TCACGACTGGATGAGGCTAA-3'	5'-ACCCACTGCCAGAACACTAC-3'	1.96
CTNS a	5'-GGCAGCTTCAGTCTCATTAG-3'	5'-TAGGAAGTCATTTGGCCCCA-3'	1.98
CTNS b	5'-GGAGGCAGCTTCAGTCTCAT-3'	5'-AATCGTTTGGACTCACTGGC-3'	2.07
ATF4 a	5'-GCTGTCCTTCCCTTGGCTAT-3'	5'-GGGCTGCAGGAACCAATAAG-3'	1.93
ATF4 b	5'-AATTCTCCTTCTATCCCCTCCTC-3'	5'-GGTCAAACCTCACTCAGGTTCG-3'	1.91
ATF4 c & ATF4 d	5'-TTGTTTAGTTTGTCTCCTTCCCC-3'	5'-CTTCTCAGCCATCCAGTCCA-3'	1.80

Table of primers previously published



Genes	Forward Primer	Reverse Primer	Refs	
4f2hc b	5'-GGAGAGTGGTCGGAACAAGT-3'	5'-TCTCCTGGTCCAACCTCGTTC-3'	13	
4f2hc d	5'-CACCTCGCTGCAAAGACATT-3'	5'-TTGCCAACGTCCAGAGGAGAT-3'		
Cat1 a & Cat1 b	5'-GCTGCACTGTCAACATCACT-3'	5'-TGGTCTTGCTCTCTGGTTGT-3'		
Cat3 a	5'-GCGAACGTGAAGTCAACTGT-3'	5'-CAACAAGATCCGCCCAAAGG-3'		
Cat3 b	5'-CGGACTGTAAAGTTCAATCGGA-3'	5'-GGAGCAGCATCTTACCGAAG-3'		
Cat3 d	5'-ACACCAACACCTCCAGCATA-3'	5'-CCCGAAGTAGGCCGAAGAAAC-3'		
y+LAT2 b	5'-CCATCTCCATGCCATTGTG-3'	5'-AGGCGTTGAGTCCCTCCATAG-3'		
y+LAT2 c	5'-GTATCGGGGTGGCTCTTTCT-3'	5'-TCCAGGTCTAGGTCCAGGTGA-3'		
Ornt1 c	5'-ACGCTGTCCTTTTCATGAGC-3'	5'-GGACCACACCGAACTCTTCT-3'		
Ornt3 b	5'-ACATTGGACTTTGCAGCAGG-3'	5'-GGCGTTGATGAAGGTCAGAC-3'		
SNAT4 a & SNAT4 b	5'-TCCTTTGGTATGTCGGTCTTCA-3'	5'-GCAGTCATTAGCAGCAAGTGA-3'		
slc38a9	5'-GTATTGACATAGTGCCTGCGG-3'	5'-GAGTCGGCTGTAGTAGTGCA-3'		
Pqlc2 a	5'-AGCAGTGTGTTTGAGAGCGTG-3'	5'-TCCCAAACCCATACCGATCC-3'		
Pqlc2 b	5'-TTTGTTTTCTGCTGCTGTGG-3'	5'-GCAGAGAAGCCAGGACATA-3'		
B ⁰ +AT c	5'-GCCTACGATGGGTGGAATCA-3'	5'-CAAAAGTCACAGCAACAGCG-3'		
rBAT	5'-GAGGAGAGGCAGCAGTGTTA-3'	5'-AGGATCTTGTTGTGGGTCCA-3'		
chop	5'-CGACAATGTCCAACAACCTG-3'	5'-ACGAGGAGAACGAGGTGCTA-3'		32
asns	5'-CTGCACACGGTCTGGAGCTG-3'	5'-GGATCTCGTCTGGGATCAGGTT-3'		33
EF1 α	5'-TCCTCTTGGTCGTTTCGCTG-3'	5'-ACCCGAGGGACATCCTGTG-3'		18



DISCUSSION

Notre étude globale de la régulation des TAA chez la TAC a mis en lumière que, malgré la double duplication du génome induisant un nombre élevé de TAA chez cette espèce, leur régulation globale par les conditions nutritives apparaît concertée, en démontrant notamment la participation de la voie GCN2 à une partie de ces régulations. Cette régulation globale des TAA par les conditions nutritionnelles met également en évidence un rôle déterminant de cette famille de protéines dans le contrôle du pool d'AA intracellulaire et de ses fonctions en tant que molécules de signalisation, notamment pour la voie mTORC1. Notre étude pouvant faire l'objet de diverses discussions, différents points seront repris dans cette dernière partie.

Premièrement, si les TAA chez la TAC possèdent des propriétés de transport analogues aux descriptions réalisées chez d'autres modèles d'étude, alors une certaine cohérence devrait émerger dans les groupes de régulations définis. Deuxièmement, bien qu'ils répondent fortement à la carence en AA, nous avons démontré que les carences spécifiques en AAE n'induisaient pas des réponses homogènes sur la dérégulation des TAA, permettant l'émergence de signatures spécifiques selon la carence considérée. Une partie de ce travail de thèse s'est également intéressé à l'impact des AANE sur la régulation des TAA, que ce soit lors de carence ou lors d'excès. Ensuite, même si les mécanismes de régulation des TAA du groupe A semblent bien définis, ceux inhérents aux groupes B et C restent indéterminés. Des pistes, quant aux voies signalétiques sous-jacentes, seront proposées. De plus, la mise en évidence d'un potentiel ERAA enrichi dans les régions promotrices des TAA du groupe A a contribué à valider le caractère GCN2 dépendant de ce groupe. Cependant, un second ERAA distinct a également pu être identifié, questionnant sur les fonctions biologiques de ces deux motifs et sur leur fonctionnalité. D'autre part, les observations réalisées *in vitro* ont pu être validées *in vivo*, malgré une composante glucide influençant potentiellement l'expression des TAA. La double duplication du génome de la TAC et les différents paralogues de TAA en découlant peuvent également subir, au cours de l'évolution, différentes destinées, pouvant conduire alors à une potentielle diversification de leur fonction et de leur régulation. Par ailleurs, cette étude a aussi démontré une activation de mTORC1 par certains AA, dont deux non conventionnels, ce qui questionne sur la sensibilité de cette machinerie cellulaire aux différents AA chez la TAC, comparativement à d'autres modèles d'étude. Enfin, bien qu'elle représente une nouvelle méthode d'analyse de la régulation des TAA et

apparaisse applicable à d'autres modèles d'étude et pour d'autres thématiques, notre étude globale des TAA nécessite encore des points de compréhension quant aux régulations et aux fonctions des TAA dans l'homéostasie des AA chez la TAC, requérant ainsi des outils méthodologiques difficiles d'accès dans notre modèle.

L'analyse globale de l'expression des TAA chez la TAC a mis en évidence, en plus d'une corrélation apparente entre TAA dérégulés et AA absorbés, l'existence de groupes de régulation en réponse aux conditions nutritionnelles. Y a-t-il une logique apparente dans ces régulations ?

Au cours de cette étude, nous avons pu observer l'existence d'une corrélation apparente entre l'expression des TAA de différentes catégories (neutres, cationiques, anioniques) et la concentration intracellulaire des AA de même nature. Nous ne pouvons cependant pas formellement affirmer que les TAA de la TAC transportent bien les AA de manière équivalente aux descriptions réalisées sur d'autres modèles d'étude, notre analyse s'étant portée sur la régulation des TAA et non leur propriété de transport. Cependant, cette apparente corrélation tend à suggérer que, dans l'ensemble, les TAA de la TAC pourraient transporter les AA de manière équivalente aux descriptions réalisées précédemment (Partie II.B, Tableau 2).

A partir des régulations transcriptionnelles des TAA dans diverses conditions nutritionnelles, cette étude a mis en évidence trois groupes de TAA présentant des profils de régulations distincts. Sur la base des connaissances acquises chez les mammifères, ces TAA possèdent des propriétés de transport (localisation cellulaire, substrat, dépendance aux ions ou mécanismes de transport) spécifiques, répertoriées sur la Figure 27*. Il apparaît ainsi que les distributions de ces différentes propriétés ne sont pas homogènes au sein des trois groupes de régulations où, notamment, les proportions de localisations cellulaires et de mécanismes de transport des TAA sont significativement différentes. Etant donné que les mécanismes de régulation du groupe A, GCN2 dépendants, ont pu être élucidés dans ce travail de thèse,

* Bien que représenté sur la figure 28, le partage des TAA selon leur dépendance aux ions n'est pas discutée dans cette partie car plusieurs catégories ne possèdent que peu de représentants, induisant une répartition dans chaque groupe peu robuste.

contrairement aux groupes B et C où ces mécanismes restent encore à être déterminés, ce seront principalement les propriétés de transport de ce premier groupe qui seront discutées dans cette partie.

Premièrement, la représentation des TAA intracellulaires dans le groupe A est minime, avec seulement 2 TAA mitochondriaux sur les 19 TAA constituant ce groupe. Chez le modèle mammifère, le pool intracellulaire en AA neutres et cationiques est déterminé par les flux d'AA par les TAA à la membrane plasmique, leur taux d'utilisation/production par le métabolisme et la synthèse protéique étant, à l'égard du transport, négligeables¹²⁸. De cette manière, il apparaît cohérent que les TAA régulés par la disponibilité en AA de manière GCN2 dépendante soient majoritairement des TAA de la membrane plasmique, déterminants pour l'influx d'AA en condition de carence. De la même manière, alors que très homogènes dans les groupes B et C, les TAA anioniques sont très peu représentés dans ce groupe A, où seulement AGC1 c-d, transporteur d'aspartate et de glutamate, est présent. Il a été démontré que, chez les mammifères, les concentrations intracellulaires en AA anioniques sont principalement contrôlées métaboliquement par la conversion de glutamine et d'asparagine notamment^{126,128}, accompagnée d'un flux très faible dépendant des TAA. Si les TAA anioniques n'ont que peu d'effet sur l'accumulation cytosolique de ces AA, il apparaît encore une fois rationnel que ces derniers ne soient que très peu représentés dans le groupe A. Enfin, une dernière ségrégation intéressante est que plus de la moitié des TAA fonctionnant comme des antiports sont retrouvés dans le groupe A (53%, Figure 27). Cette catégorie de TAA, décrits comme des « Harmoniseurs » chez les mammifères, est considérée comme permettant la majorité du flux rapide d'AA protéinogènes dans une cellule¹²⁶. Chez l'Homme, il a été démontré que cette catégorie de TAA, accompagnée des « Chargeurs » responsables de l'accumulation des AA nécessaires aux mécanismes d'échanges des harmoniseurs, représentaient les deux principales catégories de TAA surexprimés par GCN2 lors d'une carence en AA¹²⁸, ce qui reflètent, en partie, les observations réalisées ici. Ces affirmations restent tout de même spéculatives car il est, à ce jour, impossible d'affirmer que, dans notre modèle, ces TAA sont bel et bien intracellulaires, en charge du transport des mêmes

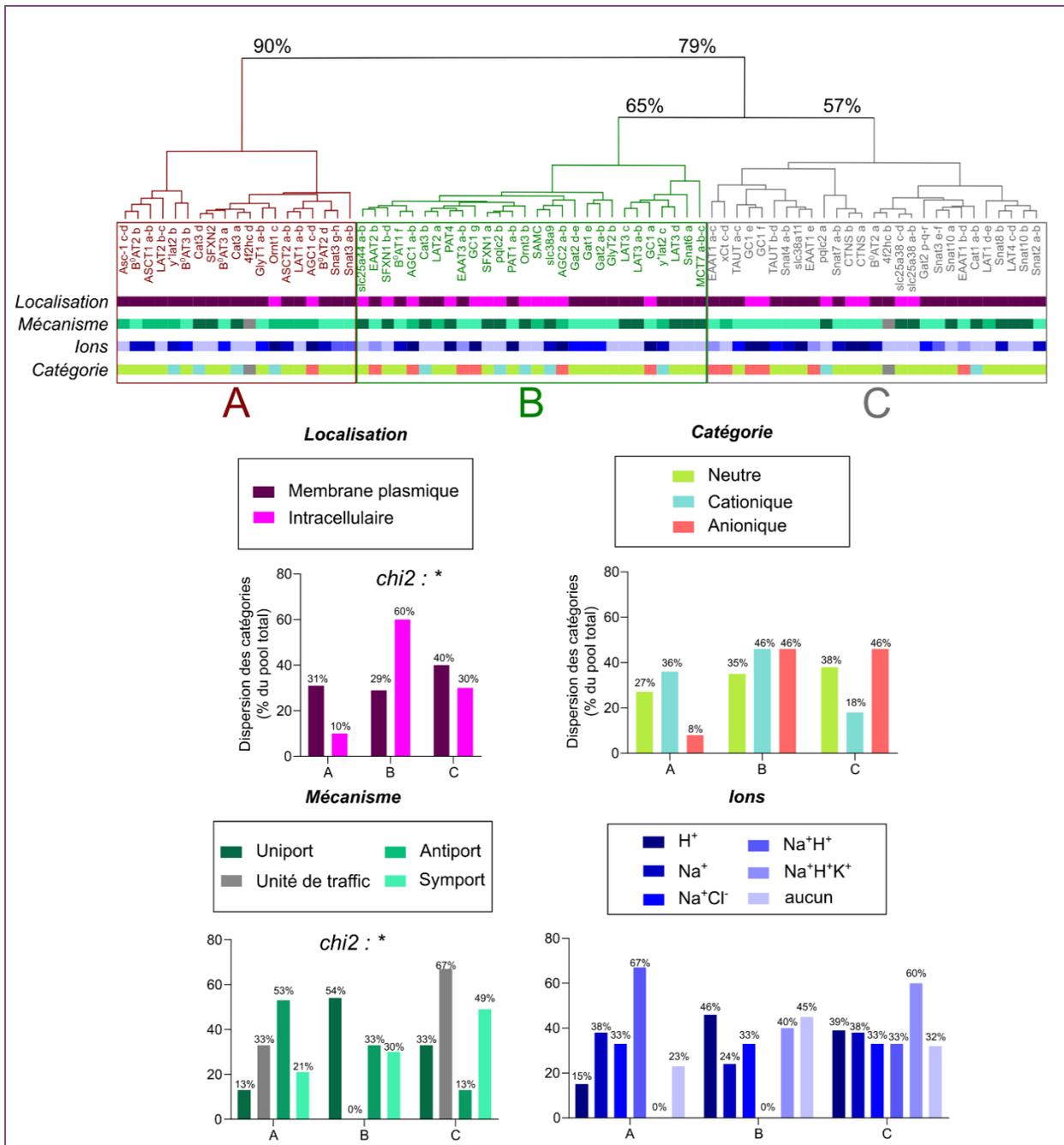


Figure 27 : Distribution des propriétés des TAA selon les groupes de régulation identifiés (A, B et C), dans la lignée RTH-149. Les propriétés des TAA spécifiés sont leur localisation cellulaire, catégorie, mécanisme de transport et dépendance aux ions, selon les descriptions réalisées chez les mammifères. La dispersion de chaque propriété identifiée dans les groupes de régulation, représentant la proportion d'une propriété dans chaque groupe comparativement son total, est également évaluée. *: test de proportionnalité de Chi² significativement différent entre les différentes catégories.

AA que décrit sur d'autres modèles, ou fonctionnent tels des harmoniseurs ou des chargeurs. Cependant, la ségrégation des TAA selon leur mode de régulation chez la TAC semble démontrer

une certaine cohérence avec leur mode de fonctionnement et les descriptions réalisées chez d'autres modèles, en insistant sur des TAA membranaires responsables d'un influx rapide d'AA, maximisant alors leur absorption en condition de carence*.

Les carences en un seul AA démontrent généralement une réponse transcriptionnelle forte des TAA, avec tout de même des différences de profils selon l'AA considéré. Serait-il possible d'utiliser les TAA comme des biomarqueurs de carence spécifique en AA ?

Le fait d'enlever un seul AA du milieu de culture induit des dérégulations transcriptionnelles des TAA, démontrant une perturbation de l'homéostasie cellulaire. Cependant, selon l'AA considéré, le pool de TAA dérégulé varie : fortes surexpressions en carence en Arginine et Lysine, forte sous-expression en carence en Méthionine et, probablement le plus étonnant de tous, très peu de dérégulations en carence en Leucine. Ce dernier résultat fut fort inattendu car, chez les mammifères, la carence en Leucine est démontrée pour induire la surexpression de nombreux TAA et est également utilisée de manière routinière pour induire GCN2 car il s'agit d'un des AA dont cette voie est le plus sensible pour son activation^{60,64,318,319}. Ainsi, en plus de n'avoir quasiment aucun effet sur l'activation des cibles de GCN2, la carence unique en leucine n'entraîne que de très faibles dérégulations des TAA**.

Bien que les profils généraux de dérégulation des TAA par les carences spécifiques semblent bien distincts, un pool de TAA apparaît dérégulé pour toutes les carences considérées : les TAA du groupe A (Figure 28). Ainsi, l'activation de GCN2 dans toutes ces carences induit une surexpression générale d'un pool de TAA commun, en ligne avec les descriptions réalisées chez les mammifères (avec des identités de TAA également similaires). Bien que le nombre de TAA

* Une des critiques majeures pouvant être conduite sur ce travail de thèse est que l'ensemble des caractérisations de régulation des TAA a été réalisée sur une seule lignée cellulaire, la lignée RTH-149. Des effets lignées dépendants pouvant être observés^{271,272}, il est communément admis qu'avant de conclure sur une observation, cette dernière doit être validée sur 2 à 3 lignées différentes. Dans ce contexte, mener des études analogues sur d'autres lignées cellulaires permettraient de démontrer le caractère universel des observations réalisées ici.

** Une hypothèse pourrait être qu'il s'agit ici d'un mécanisme lignée cellulaire dépendant, faisant que les RTH-149 sont insensibles à cette carence particulière. Cependant, les résultats préliminaires obtenus sur trois autres lignées cellulaires dérivées d'intestin de TAC tendent à démontrer un caractère universel de l'observation actuelle : la carence en leucine n'activant également pas les cibles de GCN2 dans les lignées RTgutGC, RTdi-MI et RTpi-MI.

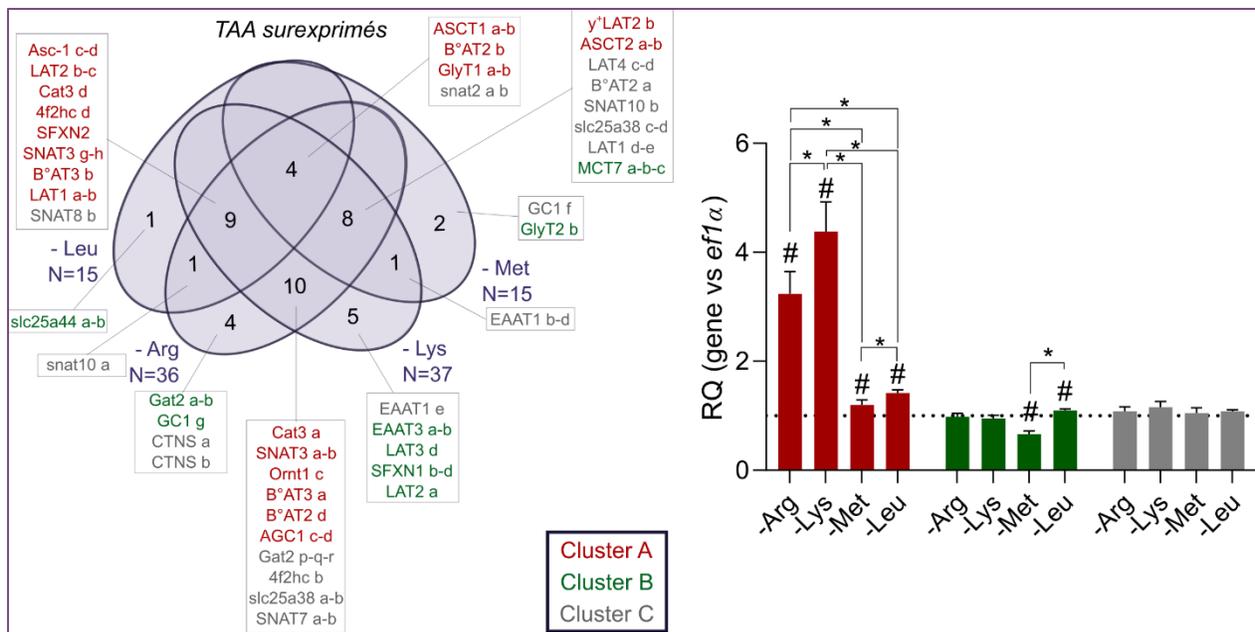


Figure 28 : Dérégulations des groupes de TAA par les carences spécifiques en un AA. (Gauche) Diagramme de Venn des TAA significativement surexprimés dans les 4 carences spécifiques testées dans les RTH-149. Les TAA ainsi identifiés sont caractérisés selon leur appartenance aux 3 groupes de régulation précédemment identifiés : A, B et C. (Droite) Quantification relative des trois groupes de régulation des TAA dans les 4 carences spécifiques étudiés. # : différence significative d'expression comparée au milieu complet ; * : différence significative d'expression entre les carences indiquées (test de Student).

significativement surexprimés par des carences en Met et Leu soit plus faible, l'induction globale significative du groupe A, néanmoins faible elle aussi, en leur absence démontre l'admissibilité du regroupement de TAA établis*, globalement surexprimés, qu'importe la carence en AA testée.

Cependant, une observation plus particulière réalisée sur l'identité des TAA dérégulés en carence spécifique est que certains TAA ne sont dérégulés que par une carence donnée. En plus de cela, ces TAA n'appartiennent qu'aux groupes B et C, sous-entendant potentiellement des mécanismes de régulation plus éloignés de GCN2. Deux mécanismes de régulation des TAA seraient alors en jeu lors d'une carence simple en un AA : des surexpressions GCN2 dépendantes, dérégulant un pool commun de TAA, couplées à des régulations GCN2 indépendantes (au moins en partie) et *a priori* spécifiques de l'AA en carence. Bien qu'aucune explication n'ait pu être apportée expérimentalement, des dérégulations différentielles de TAA selon l'AA considéré ont

* Ce résultat tend aussi à démontrer que pour étudier globalement les profils de régulation des TAA, les regroupements selon leur catégorie (neutre, anionique, cationique) et selon leur groupe de régulation (A, B, C) apparaissent complémentaires, nous permettant ainsi de tirer des conclusions différentes.

également pu être mises en évidence chez les mammifères où, *in vitro*, une étude démontre une surexpression de CAT2 en carence spécifique en Arginine malgré une sous-expression pour la carence en méthionine, tout comme SFXN2, sous-exprimé en carence totale malgré une surexpression en carence spécifique en histidine. Dans cette étude, ces TAA n'appartiennent également pas aux pool de TAA répondant à toutes les carences (et donc probablement GCN2 dépendants)¹⁸⁹.

Répondre à une carence en méthionine ne demandant effectivement pas les mêmes ajustements cellulaires que répondre à une carence en arginine, la question actuelle est alors de comprendre quelles sont les voies régissant ces régulations spécifiques de TAA selon la carence considérée. Compte tenu de la participation de GCN2 aux régulations globales, serait-il possible que les variations de surexpression de TAA selon la carence en AA soient liées à des motifs d'ERAA spécifiques dans la région promotrice des TAA ? Cette question reste très ouverte et peu d'éléments de réponse sont amenés à ce sujet dans ce travail de thèse. Néanmoins, une analyse RNAseq pourrait, en plus de valider ces résultats, proposer une liste exhaustive de gènes répondant spécifiquement à une seule carence en AA. Cela fournirait le pouvoir statistique nécessaire à la discrimination de potentielles séquences d'ERAA différentes selon la carence et ainsi validerait, ou non, cette hypothèse.

Si les carences spécifiques en un seul AA présentent des sets de TAA dérégulés différents, une question, bien que plus appliquée, réside dans le potentiel que présente les TAA pour discriminer une carence en AA d'une autre. Les TAA pourraient alors constituer des biomarqueurs spécifiques à une carence ce qui, pour le milieu aquacole, pourrait représenter un outil diagnostique prometteur dans la détection de carence dans l'alimentation. Bien que les TAA du groupe A aient été démontrés significativement surexprimés *in vivo* par une diminution de l'inclusion protéique dans le régime, le potentiel de biomarqueurs des TAA pour des carences spécifiques restent encore à démontrer, ce qui pourrait être éventuellement évalué en utilisant des farines végétales spécifiquement déséquilibrées en un seul AA.

Pourtant tous considérés comme essentiels au métabolisme de la TAC, il apparaît que les 4 AAE testés en carences spécifiques offrent des réponses distinctes de dérégulations des TAA.

De plus, la minime activation de GCN2 par la carence spécifique en leucine questionne, notamment sur le réel caractère essentiel de cet AA chez notre modèle d'étude*.

Si les AAE n'induisent pas des réponses homogènes pour la régulation des TAA, qu'en est-il des AANE ?

Comme illustré dans l'introduction de cette thèse, les farines végétales utilisées en aquaculture comme substituts aux farines de poisson comportent généralement des profils en AA déséquilibrés : certains AAE sont présents en plus faible quantité alors que certains AANE sont parfois présents en plus grande quantité, pouvant aller pour le glutamate et la cystéine jusqu'à des teneurs deux fois plus élevées. Si les effets des carences en AAE ainsi engendrées ont fait l'objet de nombreuses études, l'effet de cet excès d'AANE sur la physiologie de la TAC n'a, quant à lui, jamais été approfondi. Dans ce contexte, l'effet de cet excès d'AANE sur l'expression des TAA a également été évalué dans les RTH-149.

Pour matérialiser cet excès d'AANE, les concentrations en Cystéine (Cys, C), Aspartate (Asp, D) et Glutamate (Glu, E)** ont été poussées à l'extrême avec des concentrations 10 fois supérieures à celles du milieu de culture. Après 24h de traitement, l'expression génique des TAA et des marqueurs de GCN2 a été analysée. Comme illustré sur le Figure 29 (A, B et C), plusieurs TAA sont surexprimés par cet excès d'AA. D'un point de vue global, il apparaît que ce sont majoritairement les TAA anioniques qui sont surexprimés par ces excès d'AA (Figure 29.D), rappelant également l'effet de stimulation de l'expression de ces TAA par la présence d'AA et de sérum.

* Bien que n'ayant pas été évaluée formellement, une carence spécifique en leucine n'empêche pas les cellules de proliférer, où très rapidement elles atteignent une confluence totale au même rythme que des cellules supplémentées en leucine, illustrant une fois de plus le caractère potentiellement non essentiel de cet AA.

** Le profil de l'aspartate est considéré comme équilibré dans la majorité des farines végétales, comparativement aux farines de poisson. L'excès en cet AA a également été analysé du fait de sa nature anionique, comme le glutamate, de manière à évaluer si les effets observés en excès de glutamate sont liés à sa nature anionique ou à des processus propres à cet AA.

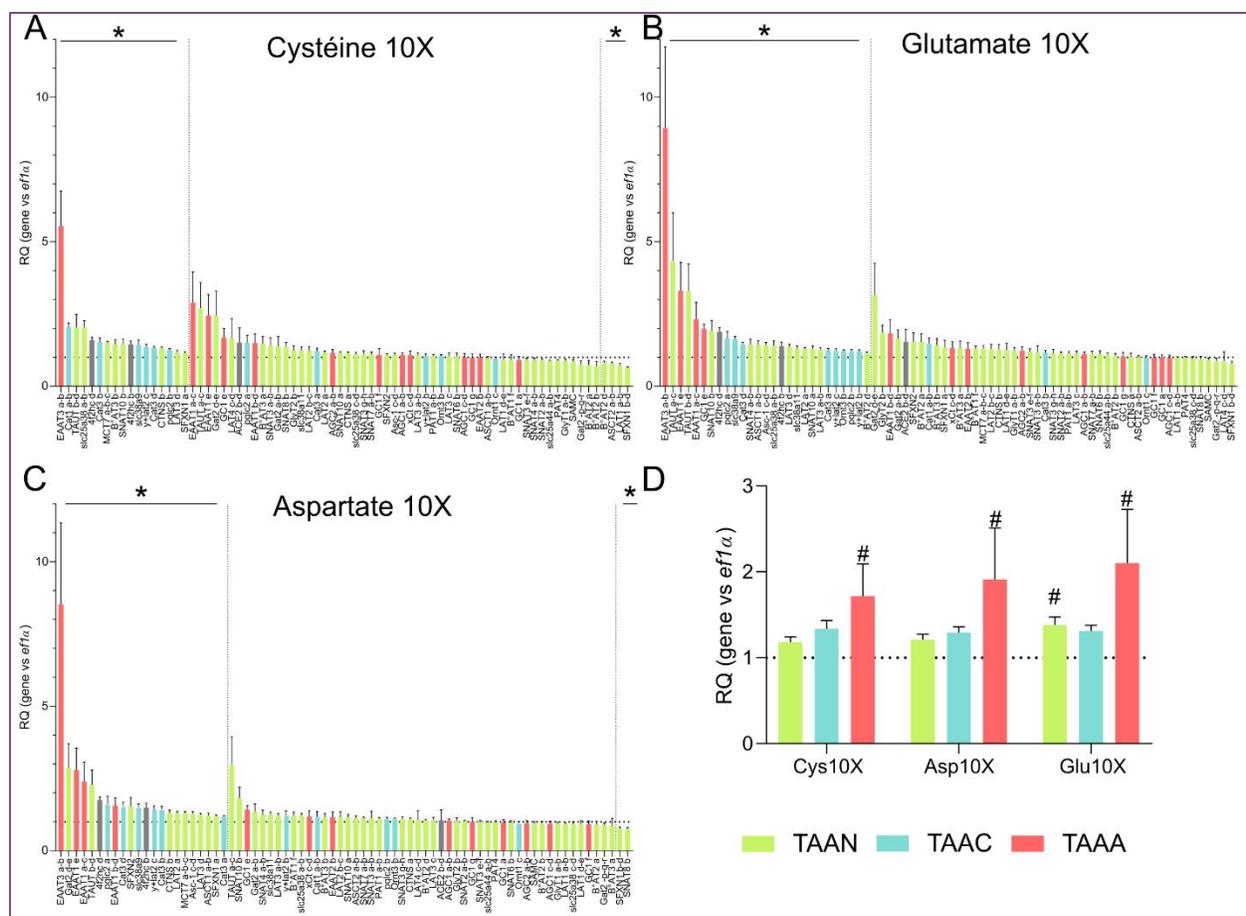


Figure 29 : Dérégulation des TAA par l'excès d'AANE. (A-C) Quantification relative (RQ) des TAA en condition d'excès de Cystéine (A), de Glutamate (B) et d'Aspartate (C) dans les RTH-149 après 24h de traitement. L'expression est comparée à un milieu complet (MC), contrôle, normalisée sur l'expression de EF1 α . Les couleurs réfèrent aux catégories de TAA (neutre, cationique, anionique). * : test de Student significativement différent de MC. (D) RQ moyen de tous les TAA selon leur catégorie de transport (neutre, cationique, anionique) dans les 3 conditions expérimentales testées. # : test de Student significativement différent de MC.

La contribution de GCN2 dans ces dérégulations semble minime car une faible induction est observée uniquement en excès de glutamate (Figure 30). De plus, concernant l'identité des TAA surexprimés et compte tenu de leur appartenance aux groupes précédemment identifiés, il apparaît que ce sont majoritairement les TAA des groupes B et C qui sont surexprimés en conditions d'excès (Figure 31.A). Ce constat est également à mettre en parallèle d'une induction significativement supérieure de ces deux derniers groupes (Figure 31.A), probablement dû à la dispersion des TAA anioniques majoritairement dans ces derniers (et rappelant une fois de plus le caractère complémentaire de nos deux modes de regroupement des TAA).

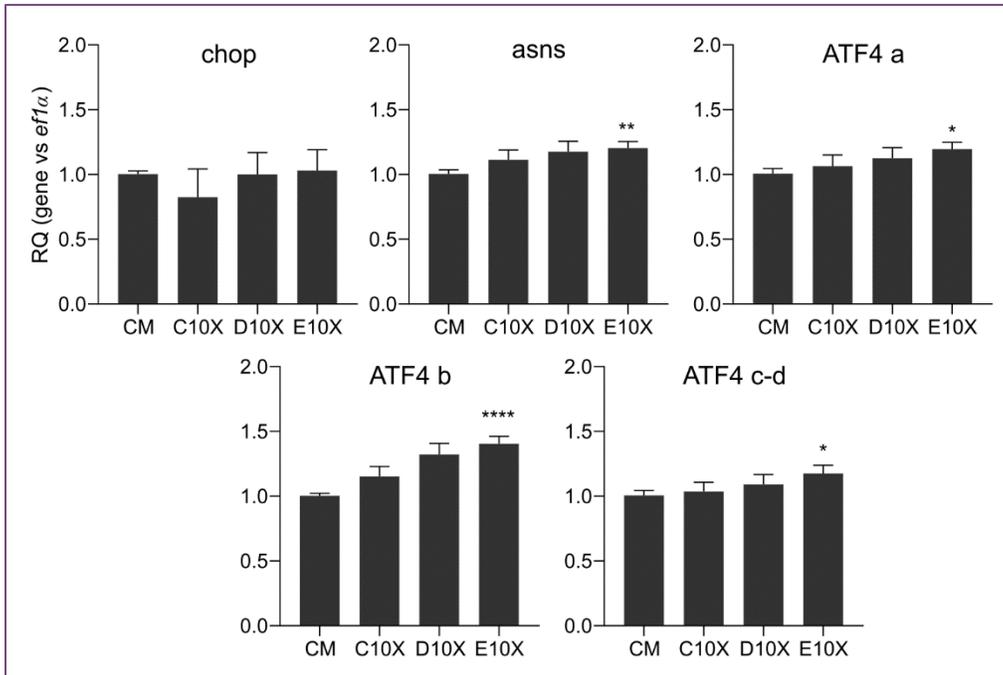


Figure 30 : Induction de GCN2 par l'excès d'AANE. RQ des gènes cibles de GCN2 (*chop*, *asns* et paralogues d'*ATF4*) dans les conditions d'excès d'AANE : cystéine (C), aspartate (D) et glutamate (E). * : niveau de significativité des différences d'expression comparée au milieu complet (CM) (test de Student).

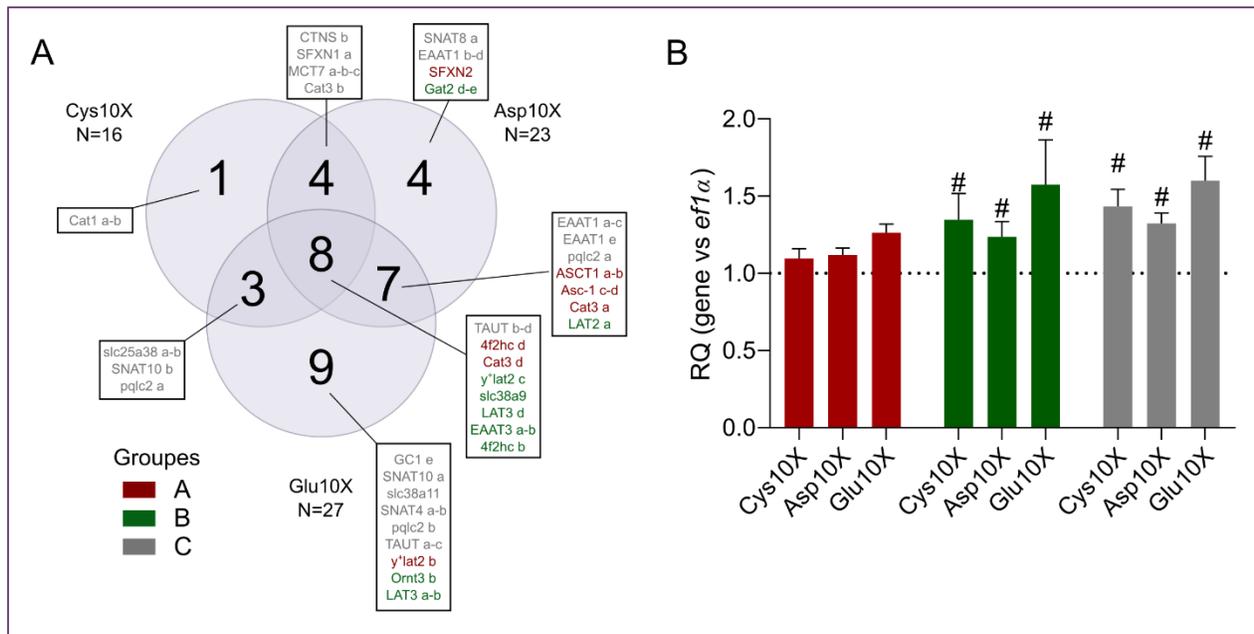


Figure 31 : Identité des TAA surexprimés par un excès d'AANE et regroupement selon leur groupe de régulation. (A) Diagramme de Venn de l'identité des TAA significativement surexprimés par les conditions d'excès d'AANE, les couleurs réfèrent aux groupes de régulation des TAA (A, B et C). (B) RQ moyen dans les conditions d'excès d'AANE pour les trois groupes de régulation identifiés. # : différence significative de l'expression comparée au milieu complet (test de Student).

GCN2 étant activé en cas d'absence d'AA, la faible induction de ses cibles observées en condition d'excès de glutamate pourrait être due, non pas à l'excès d'AANE en lui-même, mais

plutôt à un effet de compétition de cet AA sur l'influx des autres AA, induisant ainsi une carence en d'autres AA. D'un point de vue comparatif il apparaît alors, qu'en nombre et qu'en niveau de dérégulation, les TAA dérégulés par un excès d'AANE restent néanmoins faibles, comparés aux carences d'AA précédemment étudiés. Comme pour les expériences précédentes, il serait intéressant de coupler ces données d'expression de gènes avec des analyses de contenu intracellulaire en AA et d'activation de mTOR, afin de déterminer si ces dérégulations perturbent réellement l'homéostasie des AA et de caractériser l'impact que ces excès d'AANE dans les farines végétales peuvent induire sur la physiologie de la TAC.

Comme évoqué précédemment, les carences spécifiques en 1 AAE n'induisent pas des réponses homogènes sur la dérégulation des TAA. Si les résultats obtenus concernant la carence en leucine posent des questions quant au caractère essentiel de cet AA, qu'en est-il des carences spécifiques en AANE ? En se basant sur les mêmes AA que ceux testés en excès, cette question a également été esquissée durant cette thèse. Comme représenté sur la Figure 32 (A, B, C), une carence spécifique en 1 seul AANE induit tout de même des dérégulations significatives des TAA. La carence en Cystéine induit la dérégulation d'un pool de TAA plus conséquent que les carences en Aspartate et Glutamate, illustrée par une surexpression globale significative des 3 catégories de TAA (Figure 32.D).

Cet effet plus marqué de la Cystéine est également mis en évidence par une induction des cibles de GCN2 plus importante, comparée aux deux autres AANE (Figure 33). A noter, tout de même, que ces inductions des cibles de GCN2 sont bien moindres que celles observées en conditions de carence en AAE (arginine et lysine notamment). Cette induction, bien que faible, de GCN2 par la carence en cystéine se met également en parallèle de la surexpression significative des TAA du groupe A dans cette condition (Figure 34.A et 34.B). Pour l'ensemble des carences en AANE, ces derniers sont cependant mixés à d'autres TAA des groupes B et C, groupes globalement significativement surexprimés dans ces carences spécifiques en AANE, ce qui induit potentiellement des dérégulations de TAA liées à des mécanismes GCN2 indépendants également.

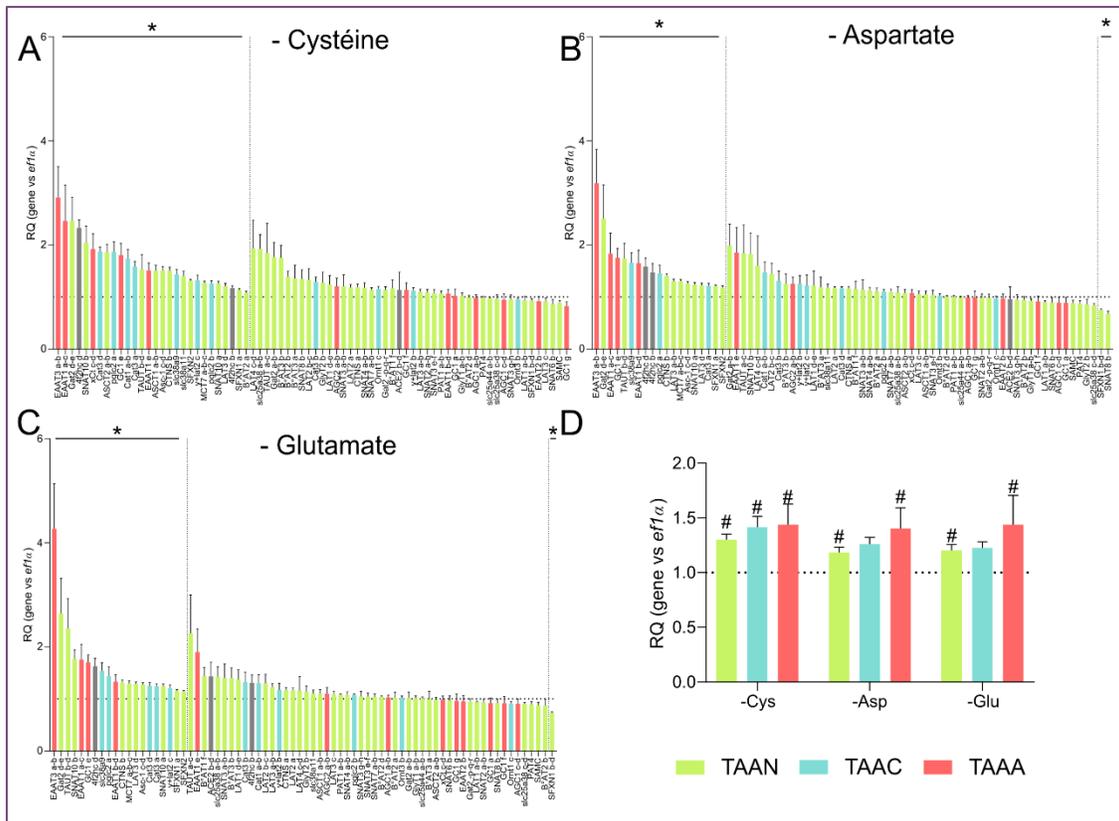


Figure 32 : Dérégulation des TAA par la carence en AANE. (A-C) Quantification relative (RQ) des TAA en condition de carence en Cystéine (A), Aspartate (B) et Glutamate (C) dans les RTH-149 après 24h de traitement. L'expression est comparée à un milieu complet (MC), contrôle, normalisée sur l'expression de EF1 α . Les couleurs réfèrent aux catégories de TAA (neutre, cationique, anionique). * : test de Student significativement différent du milieu complet (MC). (D) RQ moyen de tous les TAA selon leur catégorie de transport (neutre, cationique, anionique) dans les 3 conditions expérimentales testées. # : test de Student significativement différent de MC.

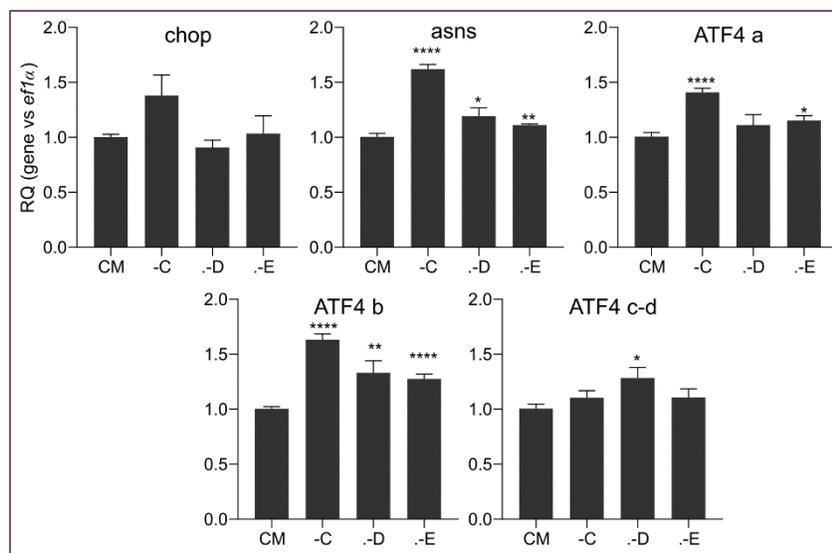


Figure 33 : Induction de GCN2 par la carence en AANE. RQ des gènes cibles de GCN2 (chop, asns et paralogues d'ATF4) dans les conditions de carence en cystéine (C), aspartate (D) et glutamate (E). * : niveau de significativité des différences d'expression comparée au MC (test de Student).

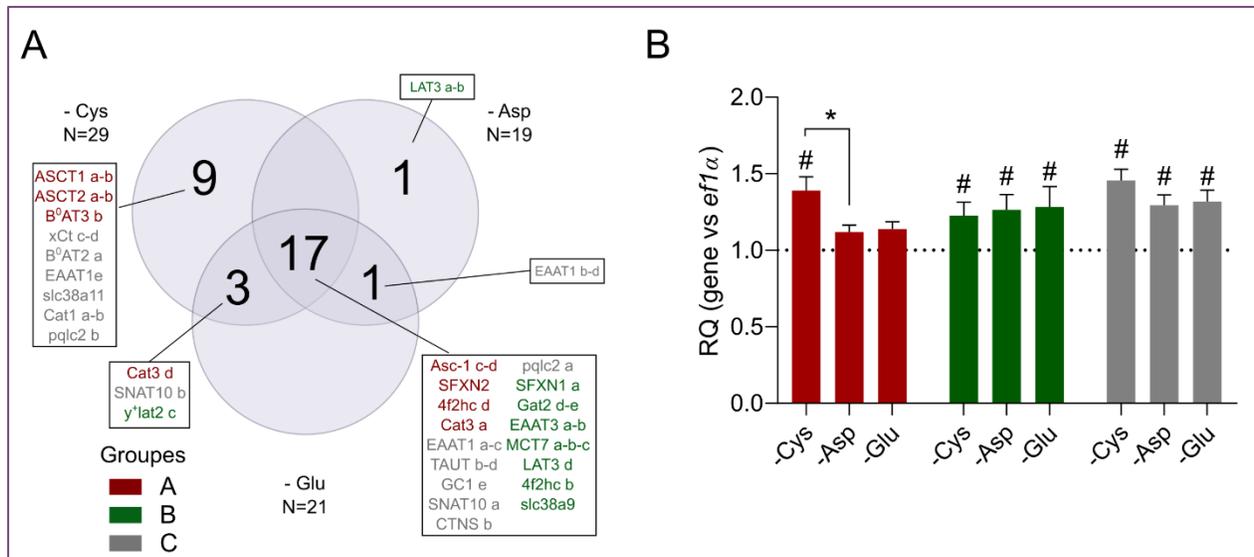


Figure 34 : Identité des TAA surexprimés par une carence en AANE et regroupement selon leur groupe de régulation. (A) Diagramme de Venn de l'identité des TAA significativement surexprimés par les conditions de carence en AANE, les couleurs réfèrent aux groupes de régulation des TAA (A, B et C). (B) RQ moyen dans les conditions de carence en AANE pour les trois groupes de régulation identifiés. # : différence significative de l'expression comparée au milieu complet (test de Student).

Au vu de ces dérégulations des TAA et de l'activation de GCN2, bien que toutes deux relativement faibles lors de carence en AANE, couplées aux effets minimes de la carence en leucine, il se pose alors clairement la question d'éclaircir, chez la TAC, quels sont les AAE/AANE dont la carence serait susceptible d'activer GCN2. Des différences peuvent déjà être notées sur la capacité d'induction de GCN2 entre les modèles mammifères et téléostéens, où, par exemple, la carence en glutamine, AANE, est connue chez les mammifères pour induire GCN2 *in vitro*³²⁰. Cependant, il a été démontré que les lignées cellulaires de poissons étaient insensibles à l'absence de cet AA, sans altération de leur capacité proliférative^{321*}. Etant donné que même chez les mammifères certaines carences en AANE (glutamine, sérine, cystéine) activent GCN2, bien que faiblement³²², identifier les AA activant préférentiellement cette voie dans notre modèle

* Bien que non présenté ici car les expérimentations ne sont pas allées à leur terme, les effets d'une carence en glutamine ont également été évaluées sur les RTH-149, n'entraînant effectivement pas de différences de prolifération visuelle, également sans effet sur l'activation de GCN2.

permettrait d'apporter des éléments de réponses supplémentaires pour l'identification des AA fonctionnellement essentiels chez la TAC.

Bien que le mécanisme régissant la régulation des TAA du groupe A ait été déterminé dans notre étude, les régulations inhérentes aux groupes B et C restent, pour le moment, inconnues. Quels mécanismes pourraient alors régir la régulation de ces deux derniers groupes ?

Notre étude a mis en lumière que les TAA appartenant au groupe A étaient strictement régulés par la présence d'AA et de manière GCN2 dépendante. D'après leur régulation par les conditions nutritionnelles, deux autres groupes de TAA ont cependant émergés, les groupes B et C, pour lesquels nous n'avons pu apporter d'éléments de réponse quant à leur mode de régulation par les nutriments, malgré des tendances observées : le groupe B tendant à être sous-exprimé en carence et le groupe C surexprimé avec une composante dépendante du sérum.

De manière à matérialiser la part de régulation des TAA par les AA et le sérum, nous avons mis en place, durant ce travail de thèse, un calcul de dépendance de l'expression des TAA selon la présence, ou non, de ces composés. Ce calcul, détaillé en Figure 35, représente ainsi la dépendance aux AA et au sérum de la régulation d'un TAA en carence totale : une valeur positive exprime un effet stimulateur de la présence du composé sur l'expression du TAA (comparé à la carence totale, l'ajout du composé augmente l'expression du TAA), une valeur négative un effet répresseur (comparé à la carence totale, l'ajout du composé diminue l'expression du TAA). En reprenant nos 3 groupes de régulations précédemment identifiés, il apparaît que leur dépendance aux AA et au sérum sont distinctes, avec une réponse au niveau transcriptionnel et protéique également cohérente (Figure 35).

Il apparaît ainsi que le groupe A est, en globalité, bel et bien réprimé par la présence d'AA, en ligne avec nos observations précédentes de la régulation de ces TAA strictement dépendante des AA et de GCN2. Un point cependant soulevé par ce calcul de dépendance est l'effet stimulateur du sérum sur l'expression des TAA de ce groupe : un milieu carencé supplémenté en

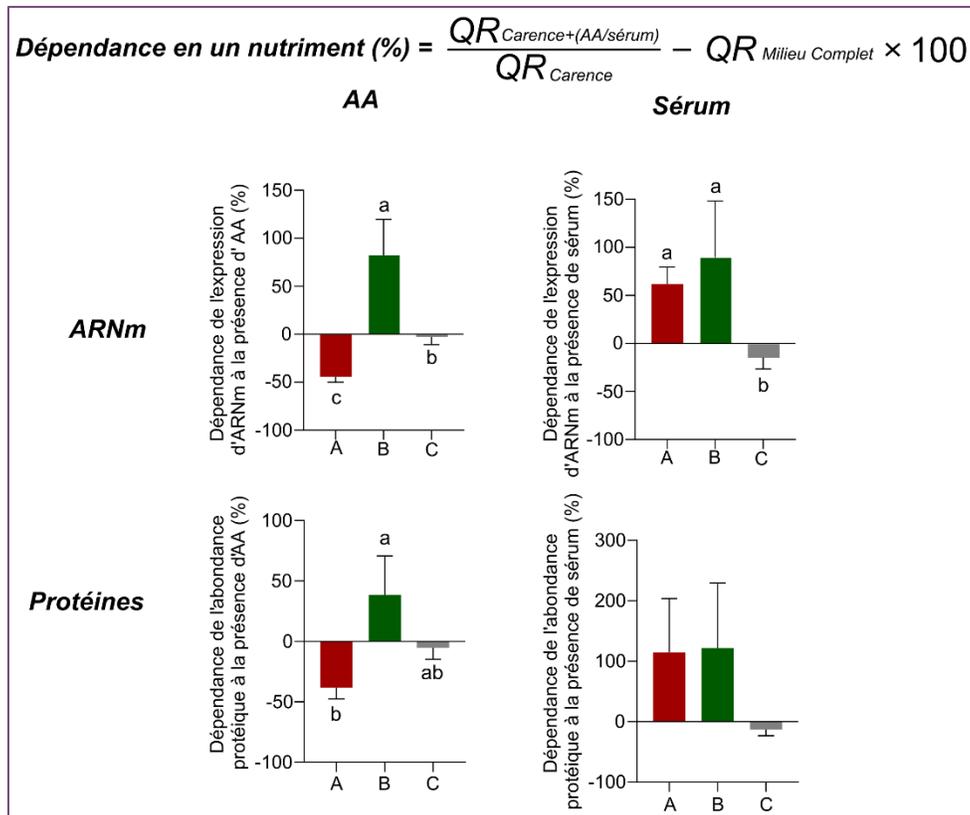


Figure 35 : Dépendance de l'expression de l'ARNm et de l'abondance protéique en présence d'AA et de sérum. Le calcul de dépendance mis en place est explicité, QR = quantification relative dans ladite condition (comparativement au milieu complet). Les couleurs réfèrent aux groupes de régulation des TAA ; les lettres correspondent aux différences significatives d'après une ANOVA à une voie.

sérum induisant une surexpression supérieure à un milieu totalement carencé. Cette observation paraît alors surprenante car cette surexpression supplémentaire en carence par l'ajout de sérum ne semble toucher que les TAA du groupe A, GCN2 dépendants, sous-entendant alors un potentiel lien entre l'activation de GCN2 et la présence de sérum. Bien que des résultats similaires aient déjà pu être observés chez le modèle murin pour LAT1³²³ et Cat1³²⁴, TAA GCN2 dépendants dans le modèle étudié, aucun élément de réponse n'a été apporté pour tenter d'expliquer cet effet. Comprendre les mécanismes sous-jacents à cette observation demandera alors de plus amples investigations qui seront notamment permises par une meilleure caractérisation des composés présents dans le sérum.

Dans le cas des groupes B et C, notre calcul de dépendance démontre un effet stimulateur des AA et du sérum sur l'expression du groupe B et un effet généralement répresseur de ces deux

composés, plus marqué pour le sérum, sur l'expression du groupe C. Dans la suite de cette partie, l'objectif sera de proposer des pistes quant aux mécanismes de régulation de ces deux groupes.

Comme illustré dans notre étude et par le calcul de dépendance, les TAA appartenant au groupe C sont généralement surexprimés par la carence avec un effet mixte des AA et du sérum. Pour la régulation par les AA, il a notamment été démontré un effet intermédiaire de GCN2 sur la régulation de ces TAA : présence moyenne d'éléments de réponse aux AA (ERAA) dans leur région promotrice, accompagnée d'une réponse moyenne aux inhibiteurs et activateurs de GCN2 utilisés. Si l'absence d'AA, *via* GCN2, régule en partie l'expression de ces TAA, cela n'explique cependant pas l'entièreté des régulations observées : d'autres facteurs, dépendants du sérum, interviennent dans ce mécanisme. Avec ce profil dépendant du sérum, il apparaît alors cohérent que certains composants propres à ce dernier sont déterminants dans les régulations de ce groupe de TAA. Le sérum de veau fœtal est un complément de croissance communément utilisé en culture cellulaire car il permet de fournir de nombreux composants essentiels à la prolifération cellulaire. L'inconvénient étant que, produit à partir du plasma de fœtus bovins, sa composition, bien que riche, est très aléatoire* et souvent inconnue³²⁵. Sont ainsi retrouvés dans le sérum des acides gras, du glucose, des AA mais surtout de nombreuses protéines dont des facteurs de croissance³²⁶. Une étude protéomique a en effet identifié plus de 150 protéines différentes dans plusieurs sources de sérum, marquant notamment la présence de nombreux facteurs de croissance comme l'IGF-I/II (*insulin like growth factor I/II*), le TGF1 (*transforming growth factor β 1*), le bFGF (*basic fibroblast growth factor*), etc³²⁶. Les facteurs de croissance possèdent de nombreux rôles dans les voies signalétiques cellulaires, convergeant notamment, pour certaines, vers l'activation de mTORC1²¹. La question ici mise en lumière serait alors d'identifier quels composants du sérum sont responsables des régulations des TAA du groupe C. Etant donné les liens précédemment établis chez d'autres modèles d'études sur la régulation des TAA par les

* L'aspect aléatoire de la composition du sérum selon le lot utilisé pose plusieurs problèmes en culture cellulaire, questionnant notamment sur la reproductibilité de certains résultats obtenus. C'est d'ailleurs pour cette raison que de plus en plus de recherches se portent sur l'élaboration de sérums « artificiels », dont la composition pourra être contrôlée et connue³²⁵.

facteurs de croissance^{229,327}, nous pourrions avancer l'hypothèse que ces composés soient les éléments déterminants à ces régulations.

Parmi les voies potentielles qui pourraient participer à la régulation des TAA du groupe C, les voies PI3K/AKT et MAPK/ERK seraient les plus probables. Ces deux voies sont en effet activées par un même stimulus : la fixation de facteurs de croissance (l'insuline ou l'IGF, par exemple) sur un récepteur à tyrosine kinase qui sera alors activé et induira la cascade signalétique^{328,329}. PI3K/AKT convergera vers l'activation de mTORC1²⁰ tandis que ERK1-2, une fois phosphorylé, pourra aussi transloquer vers le noyau où, par le biais de phosphorylations, il activera des facteurs de transcription (FT) comme elk-1. Ce dernier interagira avec l'élément de réponse au sérum, activant à son tour d'autre FT comme c-fos, fra, myc ou egr-1³³⁰. Ces FT iront, par la suite, réguler des gènes clés dans la prolifération cellulaire, la différenciation ou encore la réponse au stress³³¹. En plus de la réponse sérum dépendante des TAA du groupe C, incitant à penser à une implication de ces voies dans les régulations observées, il a pu être démontré chez les mammifères que ces FT et ces voies modulent l'expression de certains TAA, de même identité que ceux retrouvés dans notre groupe C.

Par exemple, il a été démontré *in vitro* que l'activité de transport du système A (SNAT1-2-4) était stimulée de manière ERK1-2 dépendante dans un milieu dépourvu d'AA et de sérum³³², TAA également démontrés régulés par la présence d'insuline^{229,327}. De la même manière TAUT³³³ et CTNS³³⁴ * sont régulés transcriptionnellement par la disponibilité en facteurs de croissance, *via* erg-1, cible de ERK-1-2³³⁰. De plus, SNAT3 apparaît surexprimé dans un milieu sans sérum, dépendamment de la présence d'insuline et en lien avec la voie PI3K/AKT³³⁶ ; voie qui a également été reconnue comme régulatrice de l'expression de PQLC2³³⁷ et Cat-1³³⁸. Une autre étude a aussi démontré que l'activité de transport des systèmes L (LAT1-2-3-4) et A (SNAT1-2-4) était stimulée

* Pour CTNS, un ERAA a également été retrouvé dans la séquence promotrice du gène chez les mammifères³³⁴, illustrant la mixité de régulation probable du gène, comme tous ceux retrouvés dans notre groupe C. En plus de cela, Erg-1 apparaît être un FT régulé par les AA de manière GCN2 indépendante^{318,335}, incitant donc à valider les modes de régulations observés du cluster C tout en ajoutant une composante AA.

par l'insuline et l'IGF-I de manière mTORC1 dépendante³³⁹ *. Enfin, il a également été mis en évidence que GC1 était déterminant dans la sécrétion d'insuline en réponse à une élévation de glucose³⁴⁰. Bien que cela ne constitue pas une preuve de la régulation du TAA par les facteurs de croissance, compte tenu de son implication dans des processus analogues, il apparaît rationnel que des régulations similaires à celles précédemment décrites puissent être envisageables pour GC1.

Ainsi, chez les mammifères, plusieurs pistes conduisent à penser que plusieurs TAA sont régulés par les facteurs de croissance. L'identité de ces TAA étant très relative à ceux identifiés dans notre groupe C, approfondir cette piste de régulation apparaît alors intéressant pour ce groupe. Pour élucider ces mécanismes, des inhibiteurs pharmacologiques de ces voies pourraient être utilisés, notamment au vu du grand nombre disponible pour inhiber ERK1-2³⁴¹. De plus, tester la régulation transcriptionnelle de nos TAA en présence d'hormone comme l'insuline pourrait être pertinent. Cette piste a été traitée, mais faute d'effets visibles de l'insuline dans notre modèle d'étude sur ses cibles décrites chez les mammifères**, ce travail n'a pas été abouti. Il a été démontré que, chez la TAC, l'insuline n'avait que peu d'effet métabolique (notamment sur l'absorption d'AA), en comparaison à l'IGF-I³⁴³; facteur de croissance qui aurait alors pu potentiellement être préféré. Une autre possibilité, discutée plus en détail par la suite, est que notre modèle d'étude ne soit pas idéal pour des études concernant ce genre de régulation.

Si la régulation de certains TAA, précédemment décrits, est dépendante de la voie PI3K/AKT convergeant vers l'activation de mTORC1, alors l'inhibition de ce dernier devrait conduire à une dérégulation des TAA sous sa dépendance. Dans ce contexte, nous avons étudié l'effet de la rapamycine, inhibiteur de mTORC1, sur l'expression de nos TAA (Figure 36).

* Cette étude met également en lumière l'effet du glucose dans la régulation de l'activité de transport. Ce point, étudié de manière préliminaire, sera discuté plus tardivement dans cette partie.

** Chez le rat, la stimulation de l'expression de la Glucokinase et au contraire la répression de la Phosphoenol-pyruvate carboxykinase (PEPCK) par l'insuline sont très bien établies³⁴². Cependant, dans les RTH-149, nous avons échoué à montrer un quelconque effet de différentes doses d'insuline et à différents temps d'exposition sur l'expression de ces gènes.

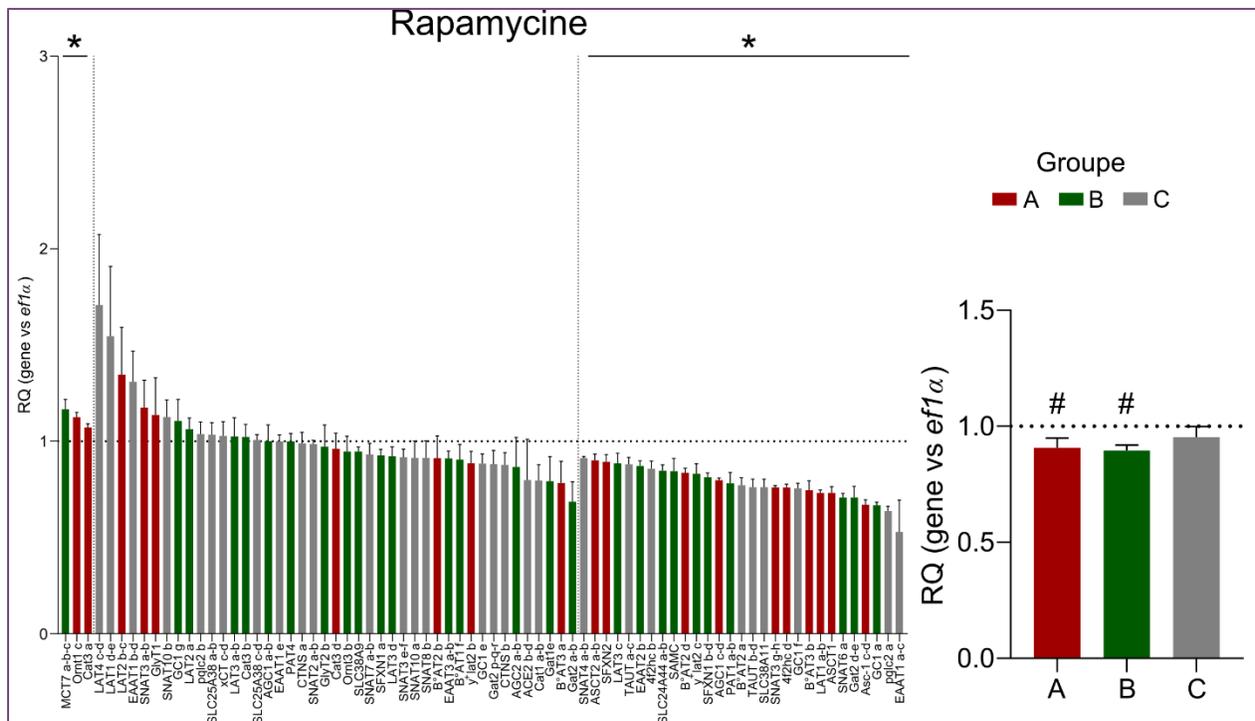


Figure 36 : Réponse des TAA à un traitement à la rapamycine. Quantification relative (RQ) des TAA en milieu complet supplémenté en Rapamycine (100nM), en comparaison à un milieu contrôle. Les couleurs sont dépendantes des groupes de régulation précédemment identifiés. La quantification relative moyenne pour chaque groupe apparaît également ; # et * : différence significative de l'expression en comparaison à la condition contrôle (test de Student).

Comme illustré sur la Figure 36, la rapamycine a un effet stimulateur minime sur l'expression des TAA. De plus, l'effet répressur observé ne semble pas être particulièrement marqué pour les TAA du groupe C, sous-entendant que la voie de régulation décrite chez les mammifères pour certains d'entre eux, *via* PI3K/AKT/mTORC1 ne soit potentiellement pas la voie majoritaire responsable des régulations de ce groupe. Une implication potentiellement plus forte de MAPK/ERK pourrait alors être préférée. Cependant, il est à noter que les groupes A et B sont, en moyenne, significativement réprimés par la rapamycine, suggérant un effet dépendant de mTORC1 sur leur expression. Pour le cluster A, des études transcriptomiques réalisées chez les mammifères ont mis en évidence que, pour certains gènes impliqués, entre autres dans le transport des AA, la rapamycine et la carence en AA pouvaient avoir des effets opposés sur leur expression^{318,344}. GCN2 et mTORC1 possédant de nombreux points de dialogue, il n'apparaît pas surprenant, dans notre étude, que les TAA GCN2 dépendants puissent également être transcriptionnellement régulés *via* mTORC1, comme démontré chez les mammifères⁶⁶.

Dans le cas du groupe B, la répression observée en carence, dépendante des AA et du sérum est, quant à elle, en lien avec un effet significativement répresseur de la rapamycine sur leur expression, apparaissant de ce fait, au moins en partie, régulés transcriptionnellement par l'activation de mTORC1. Des analyses supplémentaires seraient tout de mêmes nécessaires pour valider l'implication de mTOR, en associant d'autres inhibiteurs de la voie comme la Torin, ou encore en identifiant réellement les cibles terminales en charge de ces régulations transcriptionnelles. Par exemple, le cluster B contient la moitié des TAA lysosomaux identifiés (ainsi que d'autres conditionnels comme PAT1 a-b). Une régulation transcriptionnelle mTOR dépendante *via* TFEB, FT de la biogénèse lysosomale, pourrait alors être envisageable.

Finalement, la découverte d'un potentiel ERAA dans la région promotrice des gènes du groupe A a été un argument supplémentaire pour confirmer la régulation GCN2 dépendante de ce groupe. Cette stratégie a également été menée pour les TAA des groupes B et C mais, malheureusement, aucun motif n'a pu être retrouvé significativement enrichi dans l'un de ces groupes. Ce résultat pourrait signifier que ce n'est pas un mécanisme commun qui régit l'expression de tous les TAA de ces deux groupes, mais probablement différentes régulations conjuguées.

L'analyse des régulations des TAA a mis en lumière l'existence d'un potentiel ERAA dans les promoteurs des TAA du groupe A : ERAA fonctionnels et possibilité d'extension aux autres groupes ?

Grâce à une analyse d'enrichissement, un motif a été retrouvé significativement présent dans les promoteurs des TAA du groupe A. Ce motif, significativement similaire à la région de liaison d'ATF4 sur l'ERAA mammifère, se retrouve également en lien avec la réponse AA dépendante de ce groupe, son expression dépendante de GCN2 avec une corrélation significative de ses gènes cibles (chop, asns et ATF4) et de ces TAA. Ce résultat met ainsi en lumière que, comme chez les mammifères, les gènes GCN2 dépendants et notamment les TAA, seraient surexprimés grâce à un élément de réponse conservé chez la TAC.

Cependant, une analyse d'enrichissement réalisée avec des paramétrages différents* a mis en évidence un autre motif enrichi dans notre groupe A, différent du premier ERAA dit « type ». Ce nouveau motif, appelé « New » (Figure 37.A), s'est retrouvé significativement enrichi dans notre groupe en grande partie parce que les deux paralogues de Asc-1 (c et d) possédaient ce motif plus de 25 fois chacun. En analysant les sites possibles de ce motif sur l'intégralité des TAA, il est cependant apparu que, mis à part pour Asc-1 c-d, l'ERAA « New » identifié se retrouvait en réalité significativement enrichi dans les promoteurs des TAA du groupe B (Figure 37.C), marquant une distribution quasiment opposée à l'ERAA « Type » (Figure 37.B). Ce résultat fut relativement étonnant car ce motif était toujours significativement similaire à l'ERAA mammifère. Dans ce contexte, il a pu être démontré qu'en carence en AA, certains gènes étaient réprimés de manière GCN2 dépendante^{318,344}. AFT4 ayant également été décrit pour pouvoir exercer un effet répresseur sur l'expression de certains gènes³⁴⁵⁻³⁴⁷, la question serait ici de savoir si, dans le cas du groupe B, la régulation de l'expression dépendante des AA ne pourrait finalement pas être due à ce nouveau motif particulier.

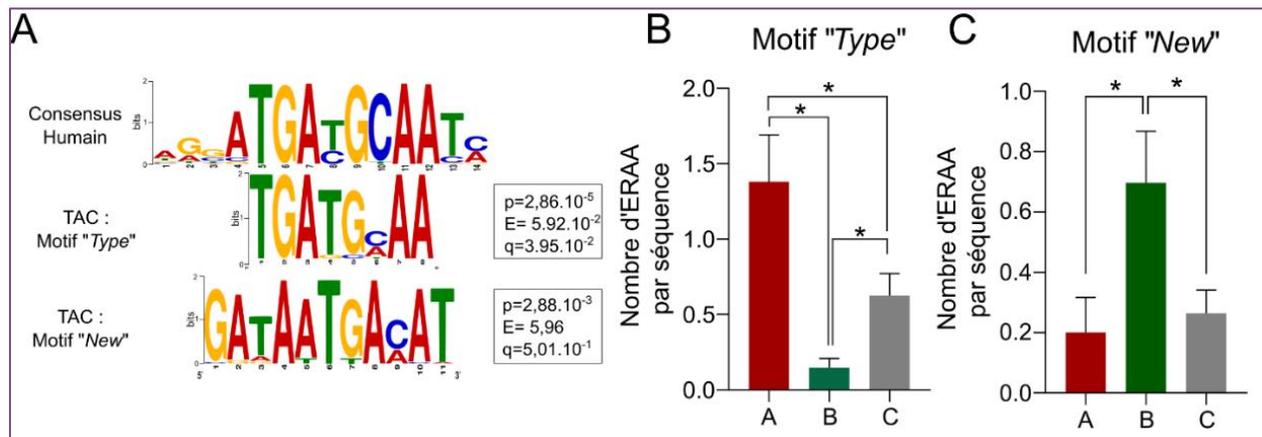


Figure 37 : Motifs des éléments de réponse aux AA (ERAA) identifiés dans le génome de la TAC. (A) matrice de poids de position de l'ERAA identifié chez l'homme, alignée aux deux motifs retrouvés, « Type » et « New » significativement enrichi dans le groupe A et significativement similaires à l'ERAA humain. (B-C) Nombre moyen d'ERAA « Type » (B) et « New » (C, sans Asc-1 c-d) identifiés dans les promoteurs des trois groupes de TAA. * : significativité de différences (test de Student).

* La mise en évidence du motif dit « type » d'ERAA a été réalisée en cherchant un motif retrouvé une fois par promoteur du groupe A. Pour le deuxième motif dit « New », l'enrichissement a été réalisé en recherchant un motif pouvant être retrouvé un nombre de fois indéfini dans les régions promotrices des TAA du groupe A.

Ce résultat est d'autant plus intéressant que, sur nos 4 paralogues d'ATF4 identifiés chez la TAC, la régulation transcriptionnelle d'ATF4 c-d est totalement différente des deux autres paralogues et des autres cibles de GCN2. L'expression de ATF4 c-d est, dans toutes nos conditions expérimentales, positivement corrélée avec l'expression moyenne des TAA du groupe B, sous-entendant un potentiel lien entre ce FT et l'expression de ces TAA. Qui plus est, ATF4 est aussi connu chez les mammifères pour constituer une cible de mTORC1 qui, sous certaines conditions, induit une partie des gènes répertoires de ATF4, de manière dépendante de l'insuline³⁴⁸. D'après la sous-expression d'ATF4 c-d dépendante du sérum dans notre étude ainsi que l'effet significatif de la rapamycine sur l'expression des TAA du groupe B et des paralogues d'ATF4 (Figure 38), il apparaît envisageable que ces gènes soient dérégulés en carence à travers un axe mTORC1 – ATF4, comme précédemment décrit chez les mammifères et potentiellement indépendants de GCN2. Cette expression particulière d'ATF4 c-d pourrait être le fruit d'une fonctionnalisation particulière de ces paralogues*, en comparaison aux deux autres, offrant alors un niveau de régulation supplémentaire à l'expression des TAA dans notre modèle**. Caractériser les modes de régulations d'ATF4 c-d et les conséquences biologique sous-jacentes, ainsi que les dialogues entre mTOR et GCN2 chez la TAC, constitue des pistes intéressantes pour continuer à approfondir la dynamique de régulation des TAA par la disponibilité en nutriments.

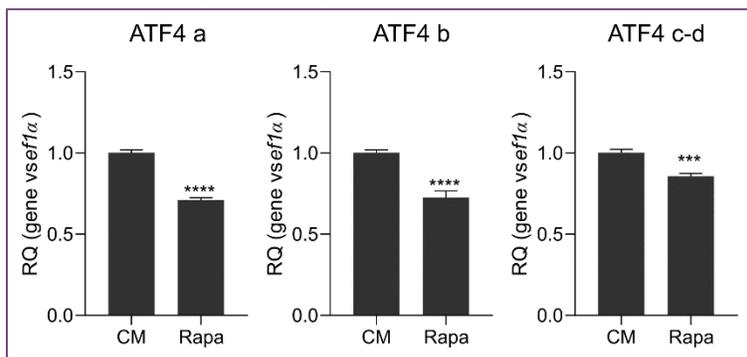


Figure 38 : Réponses des paralogues d'ATF4 à un traitement à la rapamycine. Quantification relative des 4 paralogues d'ATF4 en condition Milieu Complet (CM) supplémenté en rapamycine (100nM), comparativement au CM. * : niveau de significativité en comparaison au MC (test de Student).

* Cette idée de fonctionnalisation différente entre différents paralogues d'un même gène fera le fruit de plus amples discussions dans une prochaine partie.

** Un fait intéressant est qu'*in vivo*, ATF4 c-d ne présente pas les mêmes régulations qu'*in vitro*, où en condition restreinte en protéine, son profil de régulation est similaire aux deux autres paralogues identifiés, surexprimés. Une explication claire à ce phénomène reste peu aisée à avancer, tant les mécanismes de régulation de ces paralogues sont inconnus et aussi compte tenu des régulations systémiques, non contrôlables, retrouvées à l'échelle de l'organisme.

La fonctionnalité de ces deux motifs identifiés dans le génome de la TAC est alors primordiale à valider, ce qui sera réalisé très prochainement grâce au clonage de ces deux séquences dans des plasmides couplés à de la luciférase, comme précédemment décrit^{58,60} : si, lors d'une carence, il y a induction de la luciférase, alors ces motifs sont effectivement fonctionnels chez la TAC.

La réponse AA dépendante de nos TAA a été validée *in vivo*. Cependant, la composition en glucides du régime utilisé a potentiellement induit des régulations différentielles des TAA : qu'en est-il de la régulation des TAA par les glucides ?

L'analyse de l'expression des TAA et des cibles de GCN2 *in vivo* a mis en évidence qu'en diminuant le taux d'inclusion de protéines dans l'aliment, la réponse entraînée dans le foie consistait en une élévation de l'activation de GCN2, accompagnée d'une surexpression globale et significative des TAA du groupe A, validant ainsi les résultats obtenus *in vitro*. En plus de démontrer la convenance des modèles *in vitro* pour le décryptage des régulations moléculaires des TAA, ce complément *in vivo* a également mis en lumière que, bien que couvrant les besoins nutritionnels en protéines des TAC (inclusion d'environ 40% de protéines, contre des besoins limites de 37%³⁴⁹), la diminution de leur inclusion entraînait une élévation significative de l'activation de GCN2, questionnant sur la réelle couverture des besoins nutritionnels et sur l'effet de l'élévation de GCN2 sur la physiologie de l'animal.

La diminution de l'inclusion des protéines dans le régime alimentaire a été compensée par une augmentation de celle de glucides. Comme évoqué dans l'introduction de cette thèse, les glucides ont un métabolisme intrinsèquement lié à celui des AA ; les TAA étant des régulateurs importants du métabolisme glucidique¹⁷¹, tout comme les glucides sont en capacité de réguler l'expression des TAA¹⁹³. Dans ce contexte, il est alors fortement probable que cette inclusion de glucides dans le régime a aussi influencé l'expression des TAA. Par exemple, SNAT2 a-b, originellement surexprimé par une carence en AA, est retrouvé significativement sous-exprimé dans le régime LP (« *Low Protein* »/haute teneur en glucides), suggérant un possible effet répresseur du glucose sur son expression, comme cela a déjà été démontré chez le modèle murin¹⁹³. Bien que non décrit pour être transcriptionnellement régulé par le glucose, le TAA SNAT4 a-b possède, dans notre étude, le même comportement que SNAT2 a-b. Compte tenu de

leur proximité de fonctions, notamment dans le contrôle de l'homéostasie du métabolisme glucidique¹⁷¹, il est possible que les mêmes mécanismes de régulation soient à l'œuvre pour ce TAA.

Au vu de cette régulation probable des TAA par le glucose et de manière à croiser les résultats obtenus *in vivo*, des expérimentations ont été conduites sur les RTH-149 pour décrire le comportement d'expression des TAA en présence de fortes teneurs en glucose. Les résultats, présentés dans la Figure 39, ont démontré que des teneurs en glucose 5 fois plus importantes n'engendraient cependant que de très faibles dérégulations des TAA dans notre modèle. En plus de posséder des amplitudes de dérégulations très faibles (de 0.78 à 1.24), relativement rares *in vitro*, le partage d'identité avec les TAA dérégulés *in vivo* est moindre, où seulement 5 TAA (SNAT4 a-b, ASCT1 a-b, MCT7 a-b-c, Cat3 a et Cat3 d) sont retrouvés dérégulés de manière significative et similaire dans les deux modèles.

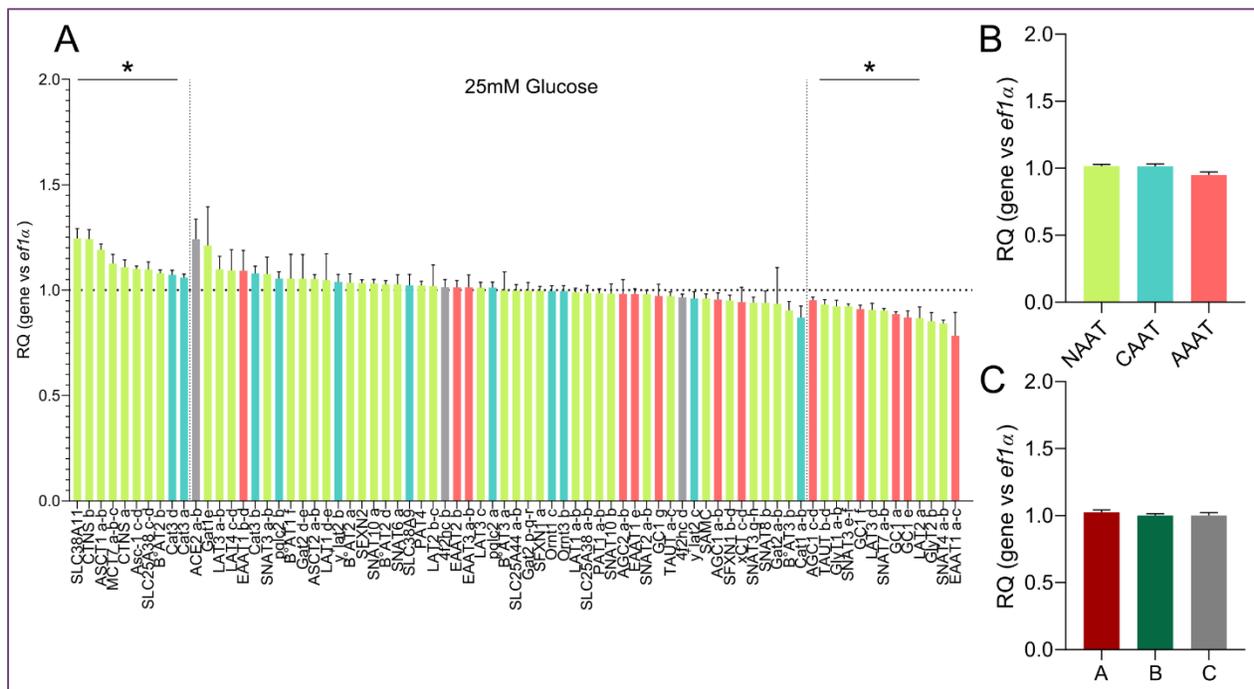


Figure 39 : Régulation transcriptionnelle des TAA par le glucose. (A) Quantification relative (RQ) des TAA dans les RTH-149 après 24h de traitement avec un excès de glucose (25mM), classé du plus surexprimé au plus sous-exprimé. Les couleurs réfèrent à la catégorie de transport, * : différence significative de l'expression comparée à la condition contrôle (milieu complet) (test de Student). (B-C) RQ moyen en excès de glucose pour les catégories de transport (B) et les groupes de régulation (C).

Il serait alors tentant d'affirmer que les dérégulations observées *in vivo* sont exclusivement liées aux AA, avec une composante négligeable des glucides. Cependant, valider cette observation

en se basant sur une seule lignée cellulaire apparaît, dans ce cas, un peu fragile. Le milieu de croissance des RTH-149, le MEM, contient du glucose. Ces cellules proliférant donc de manière routinière en présence de ce nutriment, il serait probable que la déconnexion observée soit en réalité le résultat d'une adaptation de notre lignée cellulaire au glucose, empêchant d'observer de réels effets quant à la régulation des TAA par ce nutriment*. Répliquer cette expérience sur des lignées cellulaires ne proliférant pas dans du MEM (*Minimal Essential Medium*) comme, par exemple, les RTL-W1 (lignée hépatique proliférant dans un milieu de culture L-15, dont la source glucidique n'est pas du glucose mais du galactose), permettrait potentiellement de mieux caractériser et comprendre l'effet du glucose sur la régulation transcriptionnelle des TAA.

Finalement, bien que non retrouvé enrichi dans un des groupes de régulation de TAA, Le motif consensus de l'élément de réponse aux glucides (ChORE) humain se retrouve significativement plus présent dans les promoteurs des TAA du groupe C (Figure 40), dont notamment SNAT2 a-b et SNAT4 a-b, accompagnés de 5 autres TAA retrouvés en interaction avec ChREBP par CHIP-seq chez les mammifères : Gat2, LAT4, xCt, TAUT et GC1¹⁹⁴. Même si cela ne constitue pas une preuve de régulation transcriptionnelle de ces TAA par les glucides, notamment parce que la fonctionnalité de ce motif chez la TAC reste à démontrer, ce premier élément de réponse pointe vers une régulation probable des TAA par ce nutriment, comme chez les mammifères. La prédominance des TAA du groupe C concernés par la présence de ce ChORE et dérégulés par le régime LP (Figure 40) tend également à apporter de nouvelles pistes quant aux voies de régulations potentielles de ce groupe.

* L'idée que la lignée RTH-149 ne soit pas un modèle approprié pour l'étude du métabolisme glucidique est également appuyée par l'incapacité que nous avons eu d'observer quelconque effet de l'insuline et du glucagon sur les gènes décrit chez l'homme pour être sensibles à ces hormones. De plus, il apparaît que certaines enzymes clés de la néoglucogenèse, les G6PC (*glucose-6-phosphatase*) ne sont pas exprimées dans les RTH-149, appuyant une nouvelle fois cette idée de modèle non-approprié pour ce genre de question. Au cours du processus d'immortalisation, les lignées cellulaires subissent des reprogrammations génétiques/métaboliques, c'est d'ailleurs pourquoi une étude doit se porter sur plusieurs lignées pour se prémunir d'effets lignées cellulaires dépendants. Il faut cependant noter qu'une étude a mis en évidence que de fortes teneurs en glucose induisaient un stress oxydant dans la lignées RTH-149³⁵⁰, comme il est également connu chez les mammifères³⁵¹, suggérant donc que certaines voies liées à ce nutriment sont tout de même conservées dans cette lignée. Concernant le métabolisme des AA, la validation *in vivo* et les précédentes études menées au laboratoire^{268,272} attestent tout de même d'une conservation des mécanismes clés de régulation dans notre modèle.

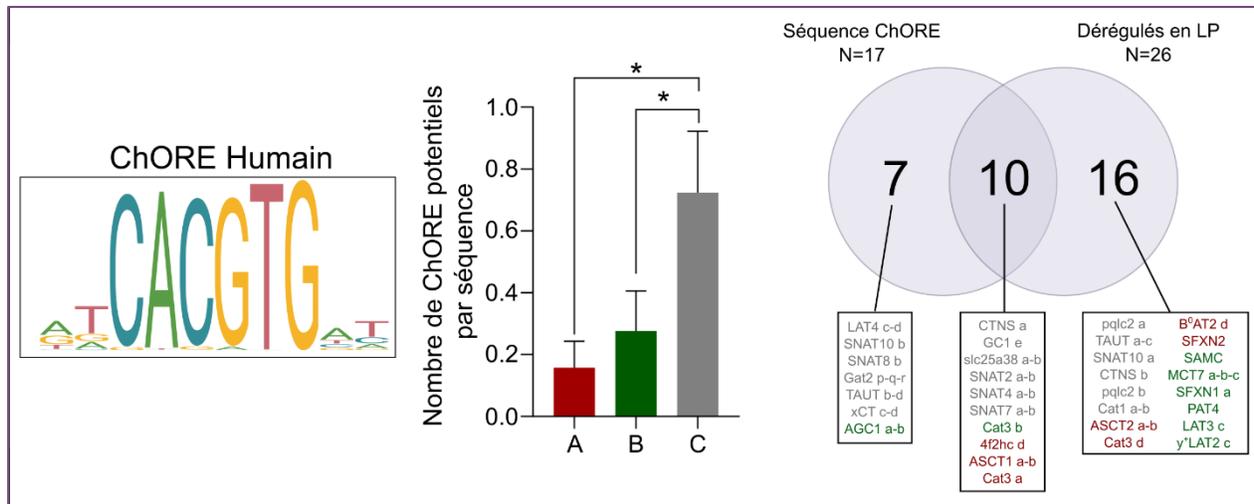


Figure 40 : Présence de l'élément de réponse aux glucides (ChORE) humain dans les régions promotrices des TAA de la TAC. Matrice de poids de position de motif ChORE identifié chez l'homme (d'après la base de donnée Jaspard) et nombre moyen d'occurrence de ce motif dans les régions promotrices des TAA de chaque groupe de régulation. * : différence significative (test de Student). Diagramme de Venn de l'identité des TAA présentant un potentiel motif ChORE dans leur promoteur et étant dérégulés in vivo dans le foie des TAC nourries avec le régime LP. Les couleurs réfèrent au cluster de régulation des TAA.

Malgré une potentielle conservation des fonctions globales des TAA chez la TAC, la double duplication entière du génome induit une diversité de régulation.

Comme évoqué dans l'introduction de cette thèse, la double duplication entière du génome chez la TAC a conduit à l'émergence de paralogues codant pour un même TAA. Sur les 75 TAA humains, un total de 219 gènes a été retrouvé dans le génome de la TAC. Au cours de l'évolution, ces différents paralogues peuvent subir différentes destinées, les amenant à disparaître ou à changer de fonction. Ainsi, après l'évènement de double duplication entière du génome des salmonidés, 4 destinées différentes peuvent survenir pour les paralogues : la non-fonctionnalisation (également connue sous le nom de pseudogénéisation), à travers laquelle des mutations sur un paraglogue conduisent à la perte de ses fonctions, la sous-fonctionnalisation, pour laquelle chaque paraglogue retiendra un sous-ensemble de la fonction originale du gène, la néo-fonctionnalisation, pour laquelle des mutations permettront à une des copies d'acquérir une nouvelle fonction, ou encore la conservation des mêmes fonctionnalités entre les différents paralogues mais avec un effet de dosage de leur expression (figure 41)^{286,287}.

Il est actuellement admis que la majorité des gènes dupliqués a subi une pseudogénéralisation²⁸⁶. Ceci explique éventuellement pourquoi « seuls » 219 TAA ont pu être identifiés dans le génome de la TAC alors que, théoriquement, ce nombre aurait dû être de 300 (2 duplications totales des 75 TAA retrouvés chez l'Homme). Sur ces 219 TAA identifiés, au moins 42 n'ont pu être retrouvés exprimés chez la TAC. Bien qu'il ne soit pas possible d'écartier une expression spécifique d'un tissu ou de cellules non inclus à notre étude, ni une expression différentielle au cours de certains stades spécifiques de développement, il se pourrait également que ces 42 gènes présents mais non exprimés puissent être le résultat du processus de pseudogénéralisation.

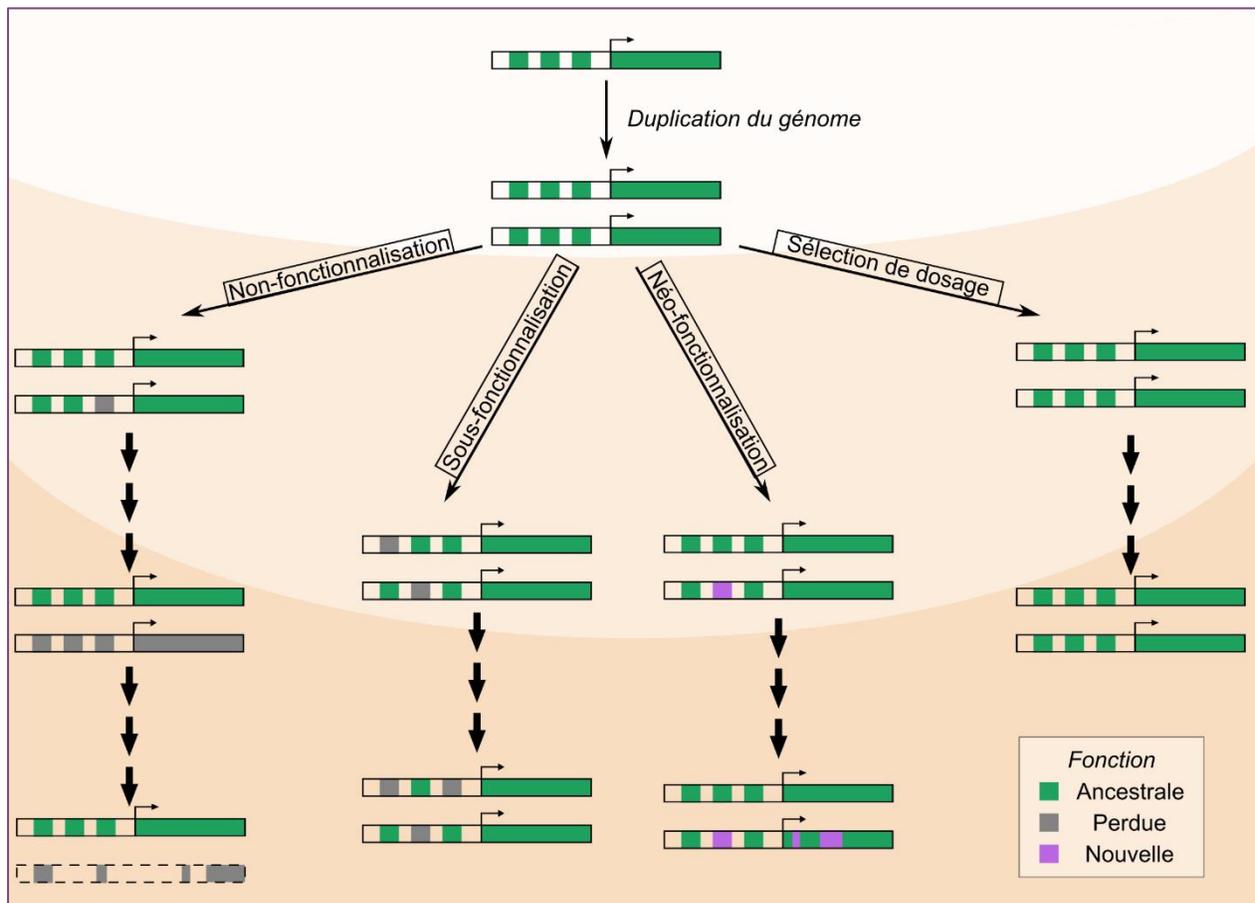


Figure 41 : Représentation des quatre destinées possibles aux paralogues issues de la duplication du génome, adapté de Glasauer et Neuhaus, 2014²⁸⁶.

Une autre destinée, pour les gènes dupliqués, est la sous-fonctionnalisation*. D'après le modèle de duplication-dégénération-complémentation, un gène ancestral possédant plusieurs rôles cellulaires (expression dans différents tissus, différents modes de régulation transcriptionnelle, etc.) peut se retrouver, après un épisode de duplication, à partager ces différentes fonctions entre les paralogues. De cette manière, à eux tous, les paralogues assureront les mêmes fonctions que le gène ancestral. Des cas de sous-fonctionnalisation ont pu être démontrés à plusieurs reprises chez les téléostéens, notamment illustré par l'étude évoquée en Introduction sur le poisson zèbre, où les différents paralogues de EAAT2 et EAAT3 possédaient des localisations tissulaires différentes²⁹² **. Cette destinée est particulièrement intéressante dans le cadre de cette thèse car des paralogues de certains TAA ont pu être retrouvés dans des groupes de régulation différents. Sur les 11 TAA concernés (B⁰AT2, LAT2, γ -LAT2, Cat3, 4f2hc, LAT1, AGC1, SNAT3, GC1, pqlc2, Gat2), des différences de regroupement sous-entendent des différences de régulation, et donc potentiellement des événements de sous-fonctionnalisation ayant conduit à un partage des fonctions du TAA ancestral. Etant donné le manque global de connaissances sur la régulation transcriptionnelle des TAA chez les mammifères, il ne peut être écarté le fait que ces différences de régulation sont, pour certains TAA, le fruit d'une néo-fonctionnalisation. Cette destinée consiste à obtenir, au cours du processus de pseudogénération, une mutation favorable permettant l'acquisition d'une nouvelle fonction pour le gène. Si nous ne connaissons pas tous les modes de régulation du gène ancestral, il est impossible de conclure quant au caractère sous- ou néo-fonctionnalisé de nos paralogues. Néanmoins, du fait de son mode d'acquisition, le processus de néo-fonctionnalisation apparaît extrêmement rare et peu d'études ont aujourd'hui réellement démontrées des néo-fonctionnalisations de paralogues après duplication²⁸⁷. Quoiqu'il en soit, ces compartimentalisations des différents paralogues pourraient conduire à un affinement des régulations d'un TAA, où la résultante du pool final de ce dernier serait ajustée par plusieurs régulations indépendantes selon les conditions biologiques

* Il est estimé que, sur les gènes dupliqués exprimés, 87% montrent des profils d'expression différents les uns comparativement aux autres, sous-entendant des phénomènes de sous- ou de néo-fonctionnalisation²⁸⁷.

** De la même manière, *in vivo*, nous avons démontré que certains paralogues de TAA possédaient des profils d'expression différents entre le foie et l'intestin.

de l'organisme. Bien évidemment, ces différences de modes de régulation entre paralogues ne constituent pas une preuve réelle de sous- ou de néo-fonctionnalisation, mais tendent à démontrer, néanmoins, la grande plasticité de régulation des TAA chez la TAC induite par la duplication du génome.

Enfin, la dernière destinée pour les gènes dupliqués est un effet de dosage de l'expression génique, pour lequel les paralogues garderont la même fonction que le gène ancestral mais leur expression à tous deux sera diminuée pour se retrouver à un taux comparable au gène ancestral²⁸⁶ *. Ce phénomène – relativement vrai pour les gènes liés aux ribosomes, aux protéines avec de nombreuses interactions ou celles impliquées dans des voies signalétiques – pourrait également, de manière spéculative, s'appliquer à certains TAA où, en se basant sur les groupes précédemment établis, plusieurs paralogues d'un même TAA sont retrouvés dans un même groupe de régulation (13 TAA : B⁰AT2, B⁰AT3, SFXN1, Cat3, LAT3, EAAT1, TAUT, SNAT3, GC1, CTNS, Gat2, slc25a38, SNAT10), sous-entendant ainsi des modes de régulation conservés pour ces gènes.

Bien évidemment, ces quatre destinées ne sont pas indépendantes car des effets de mixages sont généralement observés entre les différents paralogues²⁸⁶. Par exemple, dans notre cas, certains paralogues d'un TAA sont à la fois regroupés et dispersés au sein des groupes de régulation (B⁰AT2, Cat3, SNAT3, GC1 et Gat2), suggérant des sous/néo-fonctionnalisations couplées à des effets de dosage de l'expression. Cependant, il est impossible, pour la majorité des TAA identifiés dans cette étude, de proposer une appartenance à une éventuelle destinée, notamment en raison du manque de discrimination entre certains paralogues aux séquences trop proches, masquant ainsi les régulations propres à chaque paraglogue**.

Bien qu'en moyenne 3 paralogues aient été retrouvés par TAA humain chez la TAC, il est à noter que la duplication spécifique à chaque gène apparaît, dans certains cas, inégale : pour

* Une autre possibilité est que les gènes dupliqués soient dits sur-retenus : ces derniers auront des fonctions égales mais sans réponse de dosage entre les paralogues. Ce cas, relativement rare, est notamment vrai pour les protéines kinase et les facteurs de transcription²⁸⁶.

** A noter également que tous les TAA dont l'expression a été validée *in vivo* mais non exprimés dans notre modèle d'étude, concernant entre 48 et 66 TAA, n'ont pu être caractérisés quant à leur mode de régulation par les nutriments.

certaines TAA, un seul si ce n'est aucun orthologue n'est identifié dans le génome de la TAC, alors qu'au contraire, pour d'autres TAA, un nombre extravagant de paralogues a été identifié*. Cela pose de nombreuses questions quant aux fonctions biologiques relatives de ces différents paralogues, mais également quant aux conséquences de l'absence de certains orthologues des TAA de mammifères chez la TAC** : si, chez l'homme, la perte de fonction d'un TAA peut conduire à une pathologie, quelle pourrait être la réalité biologique propre à cette absence chez la TAC ? Par exemple, si PAT2 est impliqué dans l'activation de mTORC1 dépendant des AA chez les mammifères³⁵², quelle est la réalité biologique de son absence chez la TAC ? Au contraire, est-ce que son absence chez la TAC n'illustre pas le principe de redondance de fonction des TAA, les fonctions de PAT2 pouvant alors être assurées par un autre TAA ? Ces questions resteront ouvertes car aucun élément de réponse n'a été avancé durant cette thèse à ce sujet, mais cela illustre tout de même les nombreux questionnements relatifs aux événements de duplication du génome et à leurs conséquences.

Une limitation qui peut être portée à notre étude est que l'identification des TAA chez la TAC a été réalisée en comparaison aux TAA identifiés chez les mammifères. Néanmoins, il ne peut être écarté que les téléostéens, donc la TAC, puissent aussi posséder des TAA non présents chez les mammifères et donc non identifiés dans cette étude. Dans ce contexte, l'étude phylogénétique précédemment citée et menée chez le poisson zèbre a mis en évidence que, en comparaison aux mammifères, le poisson zèbre possédait deux membres de plus dans la famille SLC1, nommés *slc1a8* et *slc1a9*, TAA perdus au cours de l'évolution chez la majorité des tétrapodes²⁹². Si, par homologie de séquence, nous essayions d'identifier ces TAA chez la TAC, l'annotation porterait préférentiellement sur certains paralogues de *slc1a7* pour *slc1a8* et sur certains paralogues de *slc1a2* pour *slc1a9*. Cette idée introduit alors une autre explication possible quant à la perte de certains TAA mammifères dans le génome de la TAC : des erreurs d'annotations.

* C'est notamment le cas de *Gat2*, pour qui 18 paralogues différents ont été identifiés, dont au moins 8 réellement exprimés.

** Ces absences pour certains TAA chez la TAC, comparativement aux mammifères, ne sont pas forcément le fruit d'une perte chez les téléostéens, mais peut-être d'un gain du côté des mammifères. Des études phylogéniques permettraient potentiellement d'éclaircir les processus évolutifs liés à ces absences de TAA.

Dans l'exemple de *slc1a2* et *slc1a7*, ces gènes comportent respectivement selon l'annotation du génome de la TAC, 6 et 7 paralogues, au-dessus des 4 théoriques retrouvés après la double duplication du génome. Bien que d'autres événements de duplication individuels ne puissent être écartés, il apparaît envisageable, au vu des similarités de séquences des différents membres d'une même sous-famille, que certains gènes annotés *slc1a7* appartiennent en réalité au membre *slc1a8*, tout comme certains annotés *slc1a2* pourraient appartenir à *slc1a9*. Comme illustré sur l'arbre phylogénétique basé sur l'alignement des séquences protéiques de ces différents gènes chez la TAC et le poisson zèbre (Figure 42), il apparaît en effet que les séquences protéiques de *slc1a2d* et *slc1a2e* sont plus proches de *slc1a9* que des paralogues de *slc1a2* du poisson zèbre. De même, 4 paralogues identifiés dans notre étude comme appartenant à *slc1a7* seraient en réalité plus proches de *slc1a8* du poisson zèbre, renforçant alors l'idée d'erreurs d'annotation du génome de la TAC disponible.

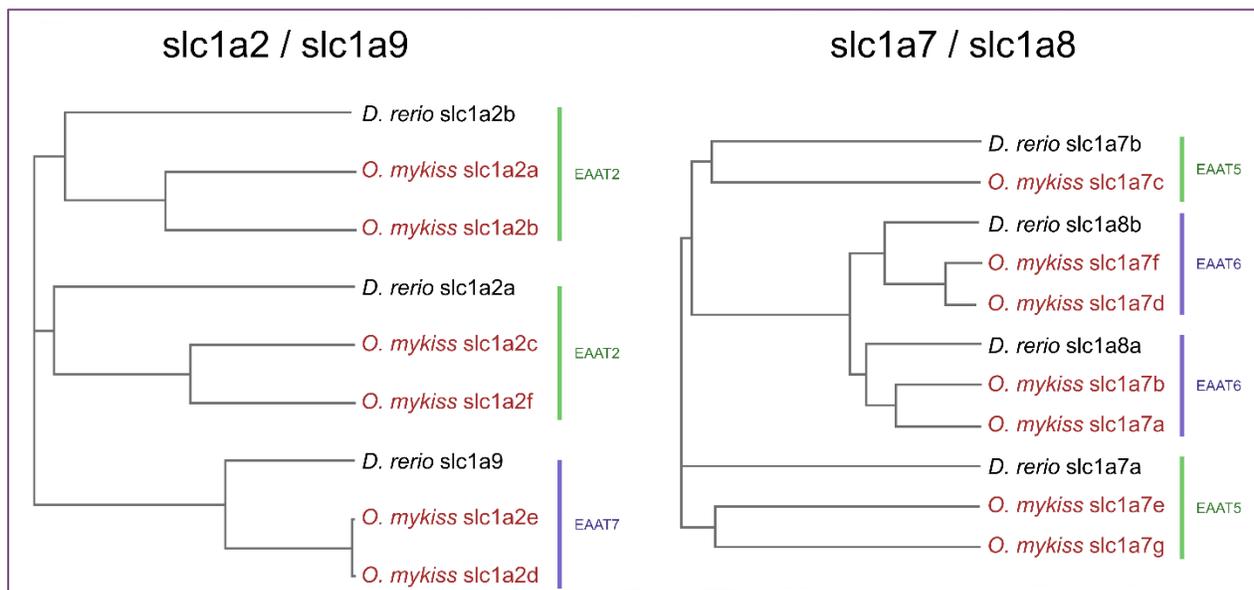


Figure 42 : Arbre phylogénétique d'alignement des séquences protéiques des paralogues de *slc1a2* et *slc1a9* (gauche) et de *slc1a7* et *slc1a8* (droite) chez la TAC et le poisson zèbre

Un autre exemple d'annotations incertaines est *slc38a3*, comportant 8 paralogues identifiés. Pour deux d'entre eux, l'annotation et l'attribution à *slc38a3* n'était pas claire et une potentielle attribution à *slc38a5*, sans orthologue identifié chez la TAC, pouvait être possible. Un choix devant être fait, ces paralogues ont finalement été classés parmi les orthologues du gène *slc38a3* humain mais, étant donné la forte proximité entre *slc38a3* et *slc38a5* chez le modèle

mammifère en terme de fonctions et de séquences³⁵³, il n'apparaît pas invraisemblable que ces derniers soient mixés dans notre identification. De la même manière, nous pouvons citer l'exemple de GC1 et GC2, TAA très proches en fonction et en séquence, pour qui 7 paralogues ont été identifiés pour le premier, contre aucun pour le second.

L'une des solutions pour consolider l'attribution des paralogues à chaque membre SLC et potentiellement en identifier de nouveau, comparativement aux mammifères, serait de mener des études phylogénétiques larges pour chaque sous-famille de SLC. Cette méthode pourrait être couplée à des études de synténie, une autre analyse qui, selon la conservation des régions chromosomiques des paralogues, permet de déterminer leur attribution et leur ségrégation. Ces deux méthodes sont très utilisées pour éclaircir l'attribution de certains paralogues^{354,355} et, bien que ce travail puissent s'avérer laborieux, compte tenu du nombre de TAA et de sous-familles, il permettrait également d'offrir une annotation claire des différents paralogues aujourd'hui identifiés.

Quoiqu'il en soit, l'identification de l'ensemble de ces paralogues pour un même TAA chez la TAC, ainsi que la diversité observée de leur mode de régulation par les conditions nutritives, illustrent les mécanismes fins acquis grâce à la duplication du génome chez les salmonidés. Ces événements de duplications induisent une augmentation de complexité dans le génome de ces espèces et sont considérés comme les événements déterministes du succès évolutif et du rayonnement actuels des téléostéens à l'échelle globale²⁸⁶.

En intégrant la dérégulation des TAA, l'absorption des AA et l'activation de mTORC1, cette étude a potentiellement mis en évidence de nouveaux AA activateurs de mTOR.

Au début de notre étude, nous avons pu mettre en évidence un lien clair entre la dérégulation des TAA en carence totale, l'absorption d'AA après dérégulation des TAA et l'activation différentielle de mTORC1 ; le tout revenant à un niveau basal avec l'ajout d'AA et de sérum dans notre milieu carencé. Cette corrélation apparente est restée visible jusqu'à un certain point, mais a totalement disparu avec des conditions plus discriminantes comme les carences simples en un AA : les TAA étaient dérégulés, l'activation de mTORC1 différentielle après un traitement carencé en lysine et arginine, mais très peu d'effet sur le pool intracellulaire d'AA était

visible : comment est-il possible que mTORC1 soit plus actif après une carence en Arginine et Lysine alors que le pool intracellulaire d'AA était quasiment inchangé par rapport à la condition contrôle (notamment pour les activateurs de mTORC1 connus : la leucine, la méthionine ou l'arginine) ?

Sur ce constat, nous avons alors identifié 2 AA présents en quantité significativement plus importante après ces carences uniques : l'isoleucine (Ile) et la phénylalanine (Phe) ; 2 AA qui, pourtant, ne sont pas répertoriés comme des activateurs de mTORC1. Néanmoins, une corrélation significative entre le contenu intracellulaire en ces deux AA et l'activation de mTORC1 est apparue dans toutes nos conditions expérimentales ; résultat validé par une augmentation du statut de phosphorylation de S6 par la présence de ces deux AA.

Bien que jamais vraiment étayées, plusieurs études ont mis en lumière que, chez les mammifères, l'Ile influait sur le niveau d'activation de mTORC1 : diminution du statut de phosphorylation de ses cibles en absence d'Ile^{322,356,357} et, au contraire, augmentation du statut de phosphorylation en présence d'Ile³⁵⁸. Chez les mammifères, Sestrine 2, détecteur de leucine (Leu) cytosolique, a été démontré pour être aussi activé par l'Ile, bien que les concentrations requises soient 25 fois plus importantes²⁹. La détection de la Leu par Sestrine 2 se fait grâce à un domaine protéique spécifique, la « *Leucine pocket* », à laquelle se fixe la Leu qui interagira avec plusieurs AA de la poche pour garantir la stabilité de la liaison³⁵⁹. Cette liaison de l'AA à la *leucine pocket* entrainera alors une perte d'interaction entre Sestrine 2 et GATOR 2, induisant ainsi l'activation de mTORC1 par la présence de l'AA. La conformation ainsi déterminée de la *leucine pocket* permet de démontrer que seuls des AA structurellement similaires à la leucine sont en capacité d'effectuer des liaisons favorables avec les différents sites, comptant ainsi pour l'Ile et la Met, mais excluant les AA chargés ou polaires³⁵⁹. Lors de sa caractérisation, les auteurs ont aligné la séquence de la *leucine pocket* humaine avec celles de nombreuses autres espèces et ont démontré que les sites de liaison de la Leu dans la poche sont très conservés dans le règne animal (Figure 43)³⁵⁹. Cependant, en ajoutant la *leucine pocket* théorique de Sestrine 2 de la TAC, il apparaît que certains sites de liaison divergent, et notamment la Thr³⁷⁷ devenue une Arg (Figure 43). Cette Thr³⁷⁷, avec les Thr³⁷⁴ et Thr³⁸⁶, interagit avec la Leu pour la garder en place en formant des liaisons hydrogènes pour stabiliser l'interaction³⁵⁹. Des mutations au niveau des Thr³⁷⁴ et

Thr³⁸⁶ induisant une perte totale d'interaction avec la leucine³⁵⁹, il apparaît vraisemblable que cette divergence d'identité d'AA en position 377 pourrait entraîner des différences de sensibilité de Sestrine 2 aux AA.

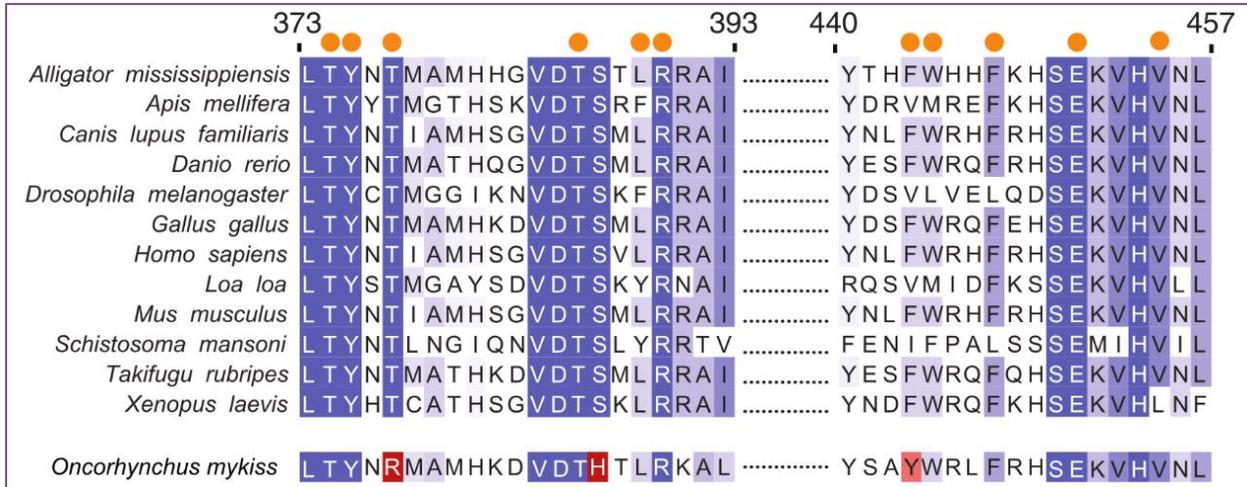


Figure 43 : Identité protéique de la Leucine pocket de Sestrine 2 chez plusieurs espèces. Alignement des séquences protéiques correspondant à la leucine pocket identifiée chez l'homme, comparé à plusieurs espèces animales, auxquelles a été ajouté manuellement la leucine pocket théorique la TAC (*Oncorhynchus mykiss*). Les couleurs bleues indiquent une augmentation de l'homologie de séquence, le rouge une divergence. Les points oranges représentent les sites d'interaction avec la leucine. Adapté de Saxton et al. (2016)³⁵⁹

Bien qu'il soit impossible, à ce stade, de déterminer les conséquences d'une telle modification de la séquence de la *leucine pocket* chez la TAC, il paraît probable que des différences de sensibilité à la Leu puissent prendre place dans notre modèle, comparé aux descriptions réalisées chez les mammifères. Ces différences restent *a priori* moindres car la majorité des sites d'interaction de la leucine est conservée, suggérant des capacités de liaison d'AA toujours probables. Notre étude démontre également une action comparable, quoique légèrement supérieure, de la Leu sur l'activation de mTORC1, ce qui pourrait sous-entendre une détection égale de la Leu et de l'Ile dans notre modèle. Des expériences d'immunoprécipitations pour identifier les AA qui induisent la perte d'interaction entre Sestrine2 et GATOR2, comme décrit précédemment²⁹, permettraient de déterminer si l'activation Ile-dépendante de mTORC1 se fait réellement par le biais de Sestrine 2, mais également d'évaluer la sensibilité de ce détecteur chez la TAC pour tous les AA*, en comparaison aux descriptions réalisées chez l'homme.

* Cette idée de niveau de sensibilité aux AA de mTORC1 chez la TAC, en comparaison aux mammifères, constitue également une idée intéressante car, aujourd'hui, les tests d'activation de mTORC1 par les AA

Concernant la Phe, des résultats analogues obtenus sur d'autres modèles d'études sont difficiles à identifier, bien qu'une tendance de diminution de phosphorylation des cibles de mTORC1 puisse être observée en absence de Phe³⁵⁶. A noter également qu'une deuxième étude a mis en évidence une augmentation du statut de phosphorylation de S6K1 par l'ajout de Phe, mais cela ne concernait cependant pas toutes les cibles de mTORC1 ; ainsi, par exemple, les phosphorylations de ULK-1 et de S6 n'étaient pas stimulées³⁵⁸. Ces deux mêmes études pointent également vers des activations différentielles de mTORC1 selon la disponibilité en d'autres AAE non conventionnels comme l'histidine ou la valine^{356,358}, également jamais démontrées comme de potentiels activateurs de mTORC1. Si plusieurs AA sont déterminants dans l'activation de mTORC1, et non les 4/5 aujourd'hui décrits avec leurs détecteurs respectifs, approfondir les mécanismes de détection des AA par mTORC1 devient aujourd'hui nécessaire, que ce soit chez les mammifères comme chez notre modèle pour lequel des divergences de mécanisme semblent clairement apparaître.

Dans ce contexte, offrir une vision exhaustive de l'effet de tous les AA sur l'activation de mTORC1 chez la TAC, et potentiellement identifier les mécanismes sous-jacents permettraient, couplé à l'identification des AA activant GCN2, d'affiner encore plus les identités des AA réellement fonctionnels chez cette espèce**.

se font à partir des concentrations d'AA connues pour activer mTORC1 chez les mammifères. Cependant, la TAC étant de nature carnivore, avec des besoins en AA supérieurs aux omnivores, serait-il possible que les quantités d'AA requises à l'activation de mTORC1 soient différentes chez cette espèce ?

** Compte tenu des liens récemment mis en évidence chez les mammifères entre l'activation de GCN2 et l'inactivation de mTORC1 par ubiquitination de ce dernier⁷¹, il serait également intéressant de démontrer l'existence de ce mécanisme chez la TAC, qui pourrait aider à expliquer l'activation de mTORC1 par plusieurs AA non conventionnels.

L'étude des régulations globales des TAA et de leurs effets sur l'homéostasie des AA a ici porté sur une espèce d'intérêt agronomique connue, mais pourtant non considérée comme modèle pour des études fondamentales. Du fait de son génome complexe, de nombreux outils moléculaires sont peu aisés à mettre en pratique. Néanmoins, notre étude démontre que la stratégie adoptée, relativement simple à mettre en œuvre, permet une caractérisation des mécanismes d'intérêts; ainsi potentiellement applicable aux espèces modèles mais également à tous les autres modèles moins conventionnels.

En règle générale, les études fonctionnelles des TAA sont permises grâce aux recoupements de multiples techniques mais toutes principalement basées sur des outils moléculaires: l'expression hétérologue d'un gène, son invalidation ou sa surexpression permettant effectivement de conclure sur ses fonctions biologiques. Cependant, chez la TAC, l'adaptation de ces outils mais surtout leur mise en œuvre est délicate, tant pour la capacité à discriminer les paralogues d'un gène que sur la pertinence de tous les cibler concomitamment. Qui plus est, dans le cas des TAA, la partie introductive de cette thèse a démontré les divers niveaux de complexité à leur étude chez les mammifères (effets compensatoires, indirects, etc.), s'additionnant donc à la complexité même de notre modèle. C'est pour cela que le développement de notre méthode, s'appuyant sur des techniques simples à mettre en œuvre mais réellement informative, ouvre des possibilités pour simplifier l'étude des TAA et permettre potentiellement de l'étendre à d'autres modèles moins conventionnels, ainsi qu'à d'autres domaines de recherche ou d'autres classes de nutriments (glucides, acides gras, etc.).

Le couplage des régulations globales des TAA et l'absorption des AA à de la modélisation mathématique nous a également permis de proposer un modèle global et général des flux d'AA dans notre modèle d'étude. Ce modèle global, bien qu'original, demande néanmoins à être validé et pour cela, l'appel aux outils moléculaires développés chez les espèces modèles devient nécessaire. Pour ce faire, il faudrait être en capacité d'invalider ou de surexprimer (tous) les TAA de chaque groupe d'activité défini, de manière à pouvoir attester de la véracité de notre modèle.

Des tentatives ont été réalisées sur nos lignées cellulaires pour mettre en place ces techniques avec, cependant, des résultats peu concluants. Par exemple, la technologie Crisper-Cas9 n'a pu aboutir dans nos lignées cellulaires, notamment à cause d'une capacité de

transfection faible de nos cellules, accompagnée d'une expression peu stable du guide fluorescent. De même, des sous-expressions par l'intermédiaire de SiRNA ont également été testées sur plusieurs TAA cibles. Cependant, les résultats étaient pour la plupart peu concluants : sur les 30 SiRNA établis ciblant 9 paralogues de 3 TAA, seuls 2 SiRNA ont apporté des résultats concluants sur l'expression de LAT1 a-b, constituant une cible potentielle intéressante* mais ne permettant pas d'offrir une vision globale quant aux fonctions des différents groupes de TAA.

De la même manière, la possession d'anticorps spécifiques pour chaque TAA aurait constitué un outil intéressant pour étudier leur abondance protéique selon les conditions nutritives** ou encore leurs localisations cellulaires. Cependant, la présence des paralogues et les différences de séquences protéiques, en comparaison aux anticorps développés chez les espèces modèles, rendent leur utilisation relativement inapplicable, non sans évoquer le fait que les anticorps des TAA mammifères disponibles n'offrent pas une liste exhaustive de tous les TAA identifiés ; le tout accompagné d'un développement de nouveaux anticorps spécifiques à notre modèle très délicat.

Un autre aspect intéressant pour l'étude fonctionnelle des TAA est leur modification post-traductionnelle qui peut jouer sur leur activité de transport. Ce champ étant déjà très peu traité chez les mammifères, il apparaît concevable qu'aucune donnée n'existe à ce sujet chez le poisson. Ces mécanismes constituent néanmoins des stratégies pour moduler l'activité des TAA, dont la régulation, chez les mammifères, semble pointer vers une potentielle implication de mTORC1^{218,230}. Dans ce contexte, pouvoir étudier les différentes modifications post-traductionnelles des TAA chez la TAC offrirait un nouveau niveau de compréhension quant à leurs régulations par les conditions nutritives et sur le maintien de l'homéostasie des AA. Compte tenu des difficultés concernant le développement d'anticorps, mener des études de

* LAT1 représente l'un des TAA le mieux décrit chez les mammifères. Pouvoir le sous-exprimer et étudier l'effet de ce TAA sur l'absorption d'AA et l'activation de mTORC1 chez la TAC constitue tout de même une idée intéressante qui devra être approfondie.

** Par le biais de l'analyse protéomique conduite, il apparaît cependant que, pour les TAA identifiés, l'abondance protéique est corrélée au niveau d'ARNm analysé, laissant penser que leur analyse par RT-qPCR est suffisant pour déduire l'abondance réel d'un TAA. De plus, la corrélation apparente observée entre niveau d'expression des catégories de TAA et l'absorption des AA apparentés tend à valider cette observation.

phospho³⁶⁰/glyco³⁶¹/ubiquitine³⁶²-protéomiques pour identifier de manière non sélective les TAA pouvant comporter des modifications post-traductionnelles, serait une première étape vers la compréhension de ce type de modifications, bien que cela ne permette pas encore, selon la technique utilisée, de conclure quant aux conséquences et aux mécanismes sous-jacents à ces modifications.

CONCLUSION

En plus de proposer une nouvelle méthode, simple à mettre en œuvre et potentiellement applicable à de nombreuses espèces, notre analyse globale de la régulation des TAA par les conditions nutritionnelles chez la TAC a mis en évidence le rôle central de la concertation nécessaire des TAA pour assurer l'absorption et l'homéostasie des AA. En partant d'un modèle complexe, nous avons réussi à discriminer des groupes de régulations distincts au sein des TAA, simplifiant, en quelque sorte, la compréhension de leur importance biologique et proposant des modèles généraux de dynamique de flux par les TAA. Une composante de régulation des TAA par les AA a également été démontrée, bien que l'ensemble des régulations des TAA ne soit pas encore résolu et demande de plus amples caractérisations. Cette étude met également en évidence l'intégration des AA et TAA, se régulant, finalement, les uns les autres.

Cette concertation de 75 TAA pour l'homéostasie de 20 AA protéinogènes reste néanmoins incroyable, tant les mécanismes de régulations sous-jacents doivent s'avérer fins. A titre d'exemple, une carence spécifique en un seul AA est susceptible de déréguler la moitié du répertoire de TAA de la cellule ; dont certains TAA non spécifiques à l'AA carencé. Comment se fait-il que, finalement, peu de différences de concentrations intracellulaires pour les autres AA soient observés ? D'autres mécanismes entrent-ils en jeu pour prévenir l'effet papillon ainsi engendré par la surexpression de tant de TAA ? S'agit-il de modifications post-traductionnelles qui permettraient de moduler l'activité des TAA ?

Un point de questionnement supplémentaire subsiste sur le rôle fonctionnel de chaque AA ; cette étude pointant le fait que certains AA, considérés essentiels, ne le seraient peut-être finalement pas tant que ça et inversement pour certains AANE. Les méthodes de définition des besoins nutritionnels d'une espèce sont aujourd'hui de plus en plus controversées¹³, car elles s'appuient généralement sur un stade de développement spécifique, dans des conditions contrôlées et avec des aliments très digestes²⁵⁷. Vues les résultats surprenants quant aux rôles de signalisation de certains AA étudiés, il serait intéressant d'étendre cette caractérisation pour tous les AA. Caractériser le rôle de chaque AA en tant que molécule de signalisation permettrait d'établir une liste des AA fonctionnellement essentiels dans la signalisation cellulaire chez la TAC

et, ainsi, de donner de plus amples éléments de réponse quant à la formulation d'aliments efficaces pour les animaux d'élevage.

BIBLIOGRAPHIE

1. Wu, G. (2021). *Amino Acids: Biochemistry and Nutrition* 2nd ed. (CRC Press) <https://doi.org/10.1201/9781003092742>.
2. Milo, R. (2013). What is the total number of protein molecules per cell volume? A call to rethink some published values. *BioEssays* 35, 1050–1055. <https://doi.org/10.1002/bies.201300066>.
3. von Voit, C. (1881). *Handbuch der Physiologie*. Band 6: *Handbuch der Physiologie des Gesamtstoffwechsels und der Fortpflanzung*.
4. Petsko, G.A., and Ringe, D. (2008). *Structure et fonction des protéines* (De Boeck Supérieur).
5. Bischoff, R., and Schlüter, H. (2012). Amino acids: Chemistry, functionality and selected non-enzymatic post-translational modifications. *J. Proteomics* 75, 2275–2296. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.01.041>.
6. Stapleton, P.P., Charles, R.P., Redmond, H.P., and Bouchier-Hayes, D.J. (1997). Taurine and human nutrition. *Clin. Nutr.* 16, 103–108. [https://doi.org/10.1016/S0261-5614\(97\)80234-8](https://doi.org/10.1016/S0261-5614(97)80234-8).
7. Hayes, K.C., and Sturman, J.A. (1981). Taurine in metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 1, 401–425. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.01.070181.002153>.
8. Petroff, O.A.C. (2002). GABA and glutamate in the human brain. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 8, 562–573. <https://doi.org/10.1177/1073858402238515>.
9. Böck, A., Forchhammer, K., Heider, J., Leinfelder, W., Sawers, G., Veprek, B., and Zinoni, F. (1991). Selenocysteine: the 21st amino acid. *Mol. Microbiol.* 5, 515–520. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb00722.x>.
10. Sakimura, K., Nakao, K., Yoshikawa, M., Suzuki, M., and Kimura, H. (2016). A novel Na⁽⁺⁾-Independent alanine-serine-cysteine transporter 1 inhibitor inhibits both influx and efflux of D-Serine. *J. Neurosci. Res.* 94, 888–895. <https://doi.org/10.1002/jnr.23772>.
11. Wu, G. (2013). Functional amino acids in nutrition and health. *Amino Acids* 45, 407–411. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1500-6>.
12. Wu, G. (2010). Functional amino acids in growth, reproduction, and health. *Adv. Nutr. Bethesda Md* 1, 31–37. <https://doi.org/10.3945/an.110.1008>.
13. Hou, Y., Yin, Y., and Wu, G. (2015). Dietary essentiality of “nutritionally non-essential amino acids” for animals and humans. *Exp. Biol. Med.* 240, 997. <https://doi.org/10.1177/1535370215587913>.
14. Chandel, N.S. (2021). *Amino Acid Metabolism*. Cold Spring Harb. *Perspect. Biol.* 13, a040584. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040584>.
15. Li, X., Bazer, F.W., Gao, H., Jobgen, W., Johnson, G.A., Li, P., McKnight, J.R., Satterfield, M.C., Spencer, T.E., and Wu, G. (2009). Amino acids and gaseous signaling. *Amino Acids* 37, 65–78. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0264-5>.
16. Zhang, N. (2018). Role of methionine on epigenetic modification of DNA methylation and gene expression in animals. *Anim. Nutr.* 4, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.08.009>.

17. Jefferies, H., Coster, J., Khalil, A., Bot, J., McCauley, R.D., and Hall, J.C. (2003). Glutathione. *ANZ J. Surg.* 73, 517–522. <https://doi.org/10.1046/j.1445-1433.2003.02682.x>.
18. Bröer, S., and Bröer, A. (2017). Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms. *Biochem. J.* 474, 1935–1963. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160822>.
19. Torres, M., and Forman, H.J. (2006). SIGNAL TRANSDUCTION. In *Encyclopedia of Respiratory Medicine*, G. J. Laurent and S. D. Shapiro, eds. (Academic Press), pp. 10–18. <https://doi.org/10.1016/B0-12-370879-6/00351-3>.
20. Panwar, V., Singh, A., Bhatt, M., Tonk, R.K., Azizov, S., Raza, A.S., Sengupta, S., Kumar, D., and Garg, M. (2023). Multifaceted role of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling pathway in human health and disease. *Signal Transduct. Target. Ther.* 8, 1–25. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01608-z>.
21. Saxton, R.A., and Sabatini, D.M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168, 960–976. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>.
22. Liu, G.Y., and Sabatini, D.M. (2020). mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 183–203. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0199-y>.
23. Kim, J., and Guan, K.-L. (2019). mTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth. *Nat. Cell Biol.* 21, 63–71. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0205-1>.
24. Guertin, D.A., Stevens, D.M., Thoreen, C.C., Burds, A.A., Kalaany, N.Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K.J., and Sabatini, D.M. (2006). Ablation in Mice of the mTORC Components *raptor*, *riCTOR*, or *mLST8* Reveals that mTORC2 Is Required for Signaling to Akt-FOXO and PKC α , but Not S6K1. *Dev. Cell* 11, 859–871. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.10.007>.
25. Harwood, F.C., Klein Geltink, R.I., O’Hara, B.P., Cardone, M., Janke, L., Finkelstein, D., Entin, I., Paul, L., Houghton, P.J., and Grosveld, G.C. (2018). ETV7 is an essential component of a rapamycin-insensitive mTOR complex in cancer. *Sci. Adv.* 4, eaar3938. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aar3938>.
26. Yue, S., Li, G., He, S., and Li, T. (2022). The Central Role of mTORC1 in Amino Acid Sensing. *Cancer Res.* 82, 2964–2974. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-4403>.
27. Durán, R.V., Oppliger, W., Robitaille, A.M., Heiserich, L., Skendaj, R., Gottlieb, E., and Hall, M.N. (2012). Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling. *Mol. Cell* 47, 349–358. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.043>.
28. Chen, J., Ou, Y., Luo, R., Wang, J., Wang, D., Guan, J., Li, Y., Xia, P., Chen, P.R., and Liu, Y. (2021). SAR1B senses leucine levels to regulate mTORC1 signalling. *Nature* 596, 281–284. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03768-w>.
29. Wolfson, R.L., Chantranupong, L., Saxton, R.A., Shen, K., Scaria, S.M., Cantor, J.R., and Sabatini, D.M. (2016). Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway. *Science* 351, 43–48. <https://doi.org/10.1126/science.aab2674>.

30. Buttgereit, F., and Brand, M.D. (1995). A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochem. J.* *312*, 163–167. <https://doi.org/10.1042/bj3120163>.
31. Simcox, J., and Lamming, D.W. (2022). The central mTOR of metabolism. *Dev. Cell* *57*, 691–706. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.02.024>.
32. Düvel, K., Yecies, J.L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A.I., Souza, A.L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., et al. (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol. Cell* *39*, 171–183. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.022>.
33. Cunningham, J.T., Rodgers, J.T., Arlow, D.H., Vazquez, F., Mootha, V.K., and Puigserver, P. (2007). mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1–PGC-1 α transcriptional complex. *Nature* *450*, 736–740. <https://doi.org/10.1038/nature06322>.
34. Goul, C., Peruzzo, R., and Zoncu, R. (2023). The molecular basis of nutrient sensing and signalling by mTORC1 in metabolism regulation and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *24*, 857–875. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00641-8>.
35. Napolitano, G., and Ballabio, A. (2016). TFEB at a glance. *J. Cell Sci.* <https://doi.org/10.1242/jcs.146365>.
36. Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljubic, M., Samali, A., and Gorman, A.M. (2016). The integrated stress response. *EMBO Rep.* *17*, 1374–1395. <https://doi.org/10.15252/embr.201642195>.
37. Costa-Mattioli, M., and Walter, P. (2020). The integrated stress response: From mechanism to disease. *Science* *368*, eaat5314. <https://doi.org/10.1126/science.aat5314>.
38. Zhang, G., Wang, X., Rothermel, B.A., Lavandero, S., and Wang, Z.V. (2022). The integrated stress response in ischemic diseases. *Cell Death Differ.* *29*, 750–757. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00889-7>.
39. Neill, G., and Masson, G.R. (2023). A stay of execution: ATF4 regulation and potential outcomes for the integrated stress response. *Front. Mol. Neurosci.* *16*, 1112253. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1112253>.
40. Karpinski, B.A., Morle, G.D., Huggenvik, J., Uhler, M.D., and Leiden, J.M. (1992). Molecular cloning of human CREB-2: an ATF/CREB transcription factor that can negatively regulate transcription from the cAMP response element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 4820–4824. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.11.4820>.
41. B'chir, W., Maurin, A.-C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Stepien, G., Fafournoux, P., and Bruhat, A. (2013). The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* *41*, 7683–7699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt563>.
42. Wek, R.C. (2018). Role of eIF2 α Kinases in Translational Control and Adaptation to Cellular Stress. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *10*, a032870. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032870>.

43. Cheng, G., Feng, Z., and He, B. (2005). Herpes simplex virus 1 infection activates the endoplasmic reticulum resident kinase PERK and mediates eIF-2 α dephosphorylation by the gamma(1)34.5 protein. *J. Virol.* *79*, 1379–1388. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.3.1379-1388.2005>.
44. Berlanga, J.J., Ventoso, I., Harding, H.P., Deng, J., Ron, D., Sonenberg, N., Carrasco, L., and de Haro, C. (2006). Antiviral effect of the mammalian translation initiation factor 2 α kinase GCN2 against RNA viruses. *EMBO J.* *25*, 1730–1740. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601073>.
45. Devi, L., and Ohno, M. (2013). Deletion of the eIF2 α Kinase GCN2 fails to rescue the memory decline associated with Alzheimer's disease. *PLoS One* *8*, e77335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077335>.
46. Roobol, A., Roobol, J., Bastide, A., Knight, J.R.P., Willis, A.E., and Smales, C.M. (2015). p58IPK is an inhibitor of the eIF2 α kinase GCN2 and its localization and expression underpin protein synthesis and ER processing capacity. *Biochem. J.* *465*, 213–225. <https://doi.org/10.1042/BJ20140852>.
47. Szaruga, M., Janssen, D.A., de Miguel, C., Hodgson, G., Fatafska, A., Pitera, A.P., Andreeva, A., and Bertolotti, A. (2023). Activation of the integrated stress response by inhibitors of its kinases. *Nat. Commun.* *14*, 5535. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40823-8>.
48. Donnelly, N., Gorman, A.M., Gupta, S., and Samali, A. (2013). The eIF2 α kinases: their structures and functions. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *70*, 3493–3511. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1252-6>.
49. Masson, G.R. (2019). Towards a model of GCN2 activation. *Biochem. Soc. Trans.* *47*, 1481–1488. <https://doi.org/10.1042/BST20190331>.
50. Hu, X., and Guo, F. (2021). Amino Acid Sensing in Metabolic Homeostasis and Health. *Endocr. Rev.* *42*, 56–76. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa026>.
51. Zaborske, J.M., Narasimhan, J., Jiang, L., Wek, S.A., Dittmar, K.A., Freimoser, F., Pan, T., and Wek, R.C. (2009). Genome-wide Analysis of tRNA Charging and Activation of the eIF2 Kinase Gcn2p. *J. Biol. Chem.* *284*, 25254–25267. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.000877>.
52. Vazquez de Aldana, C.R., Wek, R.C., Segundo, P.S., Truesdell, A.G., and Hinnebusch, A.G. (1994). Multicopy tRNA genes functionally suppress mutations in yeast eIF-2 α kinase GCN2: evidence for separate pathways coupling GCN4 expression to unchanged tRNA. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 7920–7932. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.12.7920-7932.1994>.
53. Inglis, A.J., Masson, G.R., Shao, S., Perisic, O., McLaughlin, S.H., Hegde, R.S., and Williams, R.L. (2019). Activation of GCN2 by the ribosomal P-stalk. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *116*, 4946–4954. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813352116>.
54. Yang, R., Wek, S.A., and Wek, R.C. (2000). Glucose Limitation Induces GCN4 Translation by Activation of Gcn2 Protein Kinase. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 2706–2717. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.8.2706-2717.2000>.
55. Ameri, K., and Harris, A.L. (2008). Activating transcription factor 4. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *40*, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.01.020>.

56. Huggins, C.J., Mayekar, M.K., Martin, N., Saylor, K.L., Gonit, M., Jailwala, P., Kasoji, M., Haines, D.C., Quiñones, O.A., and Johnson, P.F. (2016). C/EBP γ Is a Critical Regulator of Cellular Stress Response Networks through Heterodimerization with ATF4. *Mol. Cell. Biol.* *36*, 693–713. <https://doi.org/10.1128/MCB.00911-15>.
57. Kilberg, M.S., Shan, J., and Su, N. (2009). ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* *20*, 436–443. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.05.008>.
58. Bruhat, A., Jousse, C., Carraro, V., Reimold, A.M., Ferrara, M., and Fafournoux, P. (2000). Amino Acids Control Mammalian Gene Transcription: Activating Transcription Factor 2 Is Essential for the Amino Acid Responsiveness of the CHOP Promoter. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 7192–7204.
59. Jousse, C., Deval, C., Maurin, A.-C., Parry, L., Chérasse, Y., Chaveroux, C., Lefloch, R., Lenormand, P., Bruhat, A., and Fafournoux, P. (2007). TRB3 inhibits the transcriptional activation of stress-regulated genes by a negative feedback on the ATF4 pathway. *J. Biol. Chem.* *282*, 15851–15861. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611723200>.
60. Carraro, V., Maurin, A.-C., Lambert-Langlais, S., Averous, J., Chaveroux, C., Parry, L., Jousse, C., Örd, D., Örd, T., Fafournoux, P., et al. (2010). Amino Acid Availability Controls TRB3 Transcription in Liver through the GCN2/eIF2 α /ATF4 Pathway. *PLOS ONE* *5*, e15716. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015716>.
61. Averous, J., Bruhat, A., Jousse, C., Carraro, V., Thiel, G., and Fafournoux, P. (2004). Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *279*, 5288–5297. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311862200>.
62. Chen, Y., He, R., Han, Z., Wu, Y., Wang, Q., Zhu, X., Huang, Z., Ye, J., Tang, Y., Huang, H., et al. (2022). Cooperation of ATF4 and CTCF promotes adipogenesis through transcriptional regulation. *Cell Biol. Toxicol.* *38*, 741–763. <https://doi.org/10.1007/s10565-021-09608-x>.
63. Wortel, I.M.N., van der Meer, L.T., Kilberg, M.S., and van Leeuwen, F.N. (2017). Surviving Stress: Modulation of ATF4-Mediated Stress Responses in Normal and Malignant Cells. *Trends Endocrinol. Metab.* *28*, 794–806. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.07.003>.
64. Xiao, F., Huang, Z., Li, H., Yu, J., Wang, C., Chen, S., Meng, Q., Cheng, Y., Gao, X., Li, J., et al. (2011). Leucine deprivation increases hepatic insulin sensitivity via GCN2/mTOR/S6K1 and AMPK pathways. *Diabetes* *60*, 746–756. <https://doi.org/10.2337/db10-1246>.
65. Ye, J., Palm, W., Peng, M., King, B., Lindsten, T., Li, M.O., Koumenis, C., and Thompson, C.B. (2015). GCN2 sustains mTORC1 suppression upon amino acid deprivation by inducing Sestrin2. *Genes Dev.* *29*, 2331–2336. <https://doi.org/10.1101/gad.269324.115>.
66. Park, Y., Reyna-Neyra, A., Philippe, L., and Thoreen, C.C. (2017). mTORC1 Balances Cellular Amino Acid Supply with Demand for Protein Synthesis through Post-transcriptional Control of ATF4. *Cell Rep.* *19*, 1083–1090. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.042>.

67. Matsushima, R., Harada, N., Webster, N.J.G., Tsutsumi, Y.M., and Nakaya, Y. (2006). Effect of TRB3 on Insulin and Nutrient-stimulated Hepatic p70 S6 Kinase Activity. *J. Biol. Chem.* *281*, 29719–29729. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511636200>.
68. Salazar, M., Carracedo, A., Salanueva, Í.J., Hernández-Tiedra, S., Lorente, M., Egia, A., Vázquez, P., Blázquez, C., Torres, S., García, S., et al. (2009). Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J. Clin. Invest.* *119*, 1359–1372. <https://doi.org/10.1172/JCI37948>.
69. Averous, J., Lambert-Langlais, S., Mesclon, F., Carraro, V., Parry, L., Jousse, C., Bruhat, A., Maurin, A.-C., Pierre, P., Proud, C.G., et al. (2016). GCN2 contributes to mTORC1 inhibition by leucine deprivation through an ATF4 independent mechanism. *Sci. Rep.* *6*, 27698. <https://doi.org/10.1038/srep27698>.
70. Ryoo, H.D. (2024). The integrated stress response in metabolic adaptation. *J. Biol. Chem.* *300*, 107151. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107151>.
71. Ge, M.-K., Zhang, C., Zhang, N., He, P., Cai, H.-Y., Li, S., Wu, S., Chu, X.-L., Zhang, Y.-X., Ma, H.-M., et al. (2023). The tRNA-GCN2-FBXO22-axis-mediated mTOR ubiquitination senses amino acid insufficiency. *Cell Metab.* *35*, 2216-2230.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2023.10.016>.
72. Hediger, M.A., Cléménçon, B., Burrier, R.E., and Bruford, E.A. (2013). The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): Introduction. *Mol. Aspects Med.* *34*, 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.12.009>.
73. Hediger, M.A., Romero, M.F., Peng, J.-B., Rolfs, A., Takanaga, H., and Bruford, E.A. (2004). The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pflugers Arch.* *447*, 465–468. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1192-y>.
74. Höglund, P.J., Nordström, K.J.V., Schiöth, H.B., and Fredriksson, R. (2011). The Solute Carrier Families Have a Remarkably Long Evolutionary History with the Majority of the Human Families Present before Divergence of Bilaterian Species. *Mol. Biol. Evol.* *28*, 1531–1541. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq350>.
75. César-Razquin, A., Snijder, B., Frappier-Brinton, T., Isserlin, R., Gyimesi, G., Bai, X., Reithmeier, R.A., Hepworth, D., Hediger, M.A., Edwards, A.M., et al. (2015). A Call for Systematic Research on Solute Carriers. *Cell* *162*, 478–487. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.022>.
76. Scalise, M., and Indiveri, C. (2020). Amino Acids Transport and Metabolism 2.0. *Int. J. Mol. Sci.* *21*, 1212. <https://doi.org/10.3390/ijms21041212>.
77. Bröer, S., and Fairweather, S.J. (2018). Amino Acid Transport Across the Mammalian Intestine. *Compr. Physiol.* *9*, 343–373. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170041>.
78. Hyde, R., Taylor, P.M., and Hundal, H.S. (2003). Amino acid transporters: roles in amino acid sensing and signalling in animal cells. *Biochem. J.* *373*, 1–18. <https://doi.org/10.1042/bj20030405>.
79. Palacín, M., Estévez, R., Bertran, J., and Zorzano, A. (1998). Molecular Biology of Mammalian Plasma Membrane Amino Acid Transporters. *Physiol. Rev.* *78*, 969–1054. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.4.969>.

80. Pan, M., Souba, W.W., Karinch, A.M., Lin, C.-M., and Stevens, B.R. (2002). Specific reversible stimulation of system γ (+) L-arginine transport activity in human intestinal cells. *J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract* 6, 379–386. [https://doi.org/10.1016/s1091-255x\(01\)00047-6](https://doi.org/10.1016/s1091-255x(01)00047-6).
81. Mackenzie, B., and Erickson, J.D. (2004). Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Arch.* 447, 784–795. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1117-9>.
82. Chaudhry, F.A., Reimer, R.J., Krizaj, D., Barber, D., Storm-Mathisen, J., Copenhagen, D.R., and Edwards, R.H. (1999). Molecular Analysis of System N Suggests Novel Physiological Roles in Nitrogen Metabolism and Synaptic Transmission. *Cell* 99, 769–780. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81674-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81674-8).
83. Verrey, F. (2003). System L: heteromeric exchangers of large, neutral amino acids involved in directional transport. *Pflüg. Arch.* 445, 529–533. <https://doi.org/10.1007/s00424-002-0973-z>.
84. Bröer, S. (2008). Amino Acid Transport Across Mammalian Intestinal and Renal Epithelia. *Physiol. Rev.* 88, 249–286. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2006>.
85. Bjørn-Yoshimoto, W.E., and Underhill, S.M. (2016). The importance of the excitatory amino acid transporter 3 (EAAT3). *Neurochem. Int.* 98, 4–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.05.007>.
86. Vandenberg, R.J., and Ryan, R.M. (2013). Mechanisms of glutamate transport. *Physiol. Rev.* 93, 1621–1657. <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2013>.
87. Scalise, M., Console, L., Cosco, J., Pochini, L., Galluccio, M., and Indiveri, C. (2021). ASCT1 and ASCT2: Brother and Sister? *SLAS Discov. Adv. Life Sci. R D* 26, 1148–1163. <https://doi.org/10.1177/24725552211030288>.
88. Kanai, Y., Clémentçon, B., Simonin, A., Leuenberger, M., Lochner, M., Weisstanner, M., and Hediger, M.A. (2013). The SLC1 high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family. *Mol. Aspects Med.* 34, 108–120. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2013.01.001>.
89. Fotiadis, D., Kanai, Y., and Palacín, M. (2013). The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol. Aspects Med.* 34, 139–158. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.10.007>.
90. Zhou, Y., and Danbolt, N.C. (2013). GABA and Glutamate Transporters in Brain. *Front. Endocrinol.* 4, 165. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00165>.
91. Marques, B.L., Oliveira-Lima, O.C., Carvalho, G.A., de Almeida Chiarelli, R., Ribeiro, R.I., Parreira, R.C., da Madeira Freitas, E.M., Resende, R.R., Klempin, F., Ulrich, H., et al. (2020). Neurobiology of glycine transporters: From molecules to behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 118, 97–110. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.07.025>.
92. Baliou, S., Kyriakopoulos, A.M., Goulielmaki, M., Panayiotidis, M.I., Spandidos, D.A., and Zoumpourlis, V. (2020). Significance of taurine transporter (TauT) in homeostasis and its layers of regulation. *Mol. Med. Rep.* 22, 2163–2173. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11321>.

93. Bröer, S., and Gether, U. (2012). The solute carrier 6 family of transporters. *Br. J. Pharmacol.* *167*, 256–278. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01975.x>.
94. Sikder, M.O.F., Yang, S., Ganapathy, V., and Bhutia, Y.D. (2017). The Na⁺/Cl⁻-Coupled, Broad-Specific, Amino Acid Transporter SLC6A14 (ATB0,+): Emerging Roles in Multiple Diseases and Therapeutic Potential for Treatment and Diagnosis. *AAPS J.* *20*, 12. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0164-7>.
95. Kukułowicz, J., Pietrzak-Lichwa, K., Klimończyk, K., Idlin, N., and Bajda, M. (2023). The SLC6A15-SLC6A20 Neutral Amino Acid Transporter Subfamily: Functions, Diseases, and Their Therapeutic Relevance. *Pharmacol. Rev.* *76*, 142–193. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.123.000886>.
96. Closs, E.I., Boissel, J.-P., Habermeier, A., and Rotmann, A. (2006). Structure and Function of Cationic Amino Acid Transporters (CATs). *J. Membr. Biol.* *213*, 67–77. <https://doi.org/10.1007/s00232-006-0875-7>.
97. Kahlhofer, J., and Teis, D. (2023). The human LAT1–4F2hc (SLC7A5–SLC3A2) transporter complex: Physiological and pathophysiological implications. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* *133*, 459–472. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13821>.
98. Rotoli, B.M., Barilli, A., Visigalli, R., Ferrari, F., and Dall’Asta, V. (2020). γ-LAT1 and γ-LAT2 contribution to arginine uptake in different human cell models: Implications in the pathophysiology of Lysinuric Protein Intolerance. *J. Cell. Mol. Med.* *24*, 921–929. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14801>.
99. Jersin, R.Å., Jonassen, L.R., and Dankel, S.N. (2022). The neutral amino acid transporter SLC7A10 in adipose tissue, obesity and insulin resistance. *Front. Cell Dev. Biol.* *10*, 974338. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.974338>.
100. Koppula, P., Zhuang, L., and Gan, B. (2021). Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy. *Protein Cell* *12*, 599–620. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00789-5>.
101. Jaenecke, I., Boissel, J.-P., Lemke, M., Rupp, J., Gasnier, B., and Closs, E.I. (2012). A Chimera Carrying the Functional Domain of the Orphan Protein SLC7A14 in the Backbone of SLC7A2 Mediates Trans-stimulated Arginine Transport. *J. Biol. Chem.* *287*, 30853–30860. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.350322>.
102. Jiang, X., Liu, K., Jiang, H., Yin, H., Wang, E.-D., Cheng, H., Yuan, F., Xiao, F., Wang, F., Lu, W., et al. (2023). SLC7A14 imports GABA to lysosomes and impairs hepatic insulin sensitivity via inhibiting mTORC2. *Cell Rep.* *42*, 111984. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111984>.
103. Higuchi, K., Sugiyama, K., Tomabechei, R., Kishimoto, H., and Inoue, K. (2022). Mammalian monocarboxylate transporter 7 (MCT7/Slc16a6) is a novel facilitative taurine transporter. *J. Biol. Chem.* *298*, 101800. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101800>.
104. Halestrap, A.P. (2013). The SLC16 gene family – Structure, role and regulation in health and disease. *Mol. Aspects Med.* *34*, 337–349. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.003>.
105. Reimer, R.J. (2013). SLC17: A functionally diverse family of organic anion transporters. *Mol. Aspects Med.* *34*, 350–359. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.004>.

106. Kunji, E.R.S., King, M.S., Ruprecht, J.J., and Thangaratnarajah, C. (2020). The SLC25 Carrier Family: Important Transport Proteins in Mitochondrial Physiology and Pathology. *Physiol. Bethesda Md* 35, 302–327. <https://doi.org/10.1152/physiol.00009.2020>.
107. Porcelli, V., Longo, A., Palmieri, L., Closs, E.I., and Palmieri, F. (2016). Asymmetric dimethylarginine is transported by the mitochondrial carrier SLC25A2. *Amino Acids* 48, 427–436. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2096-9>.
108. Amoedo, N.D., Punzi, G., Obre, E., Lacombe, D., De Grassi, A., Pierri, C.L., and Rossignol, R. (2016). AGC1/2, the mitochondrial aspartate-glutamate carriers. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 2394–2412. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.04.011>.
109. Palmieri, F. (2008). Diseases caused by defects of mitochondrial carriers: a review. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 564–578. <https://doi.org/10.1016/j.bbambio.2008.03.008>.
110. Xu, Y., Hong, Z., Yu, S., Huang, R., Li, K., Li, M., Xie, S., and Zhu, L. (2024). Fresh Insights Into SLC25A26: Potential New Therapeutic Target for Cancers: A Review. *Oncol. Rev.* 18. <https://doi.org/10.3389/or.2024.1379323>.
111. Porcelli, V., Fiermonte, G., Longo, A., and Palmieri, F. (2014). The Human Gene SLC25A29, of Solute Carrier Family 25, Encodes a Mitochondrial Transporter of Basic Amino Acids. *J. Biol. Chem.* 289, 13374–13384. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.547448>.
112. Yoneshiro, T., Wang, Q., Tajima, K., Matsushita, M., Maki, H., Igarashi, K., Dai, Z., White, P.J., McGarrah, R.W., Ilkayeva, O.R., et al. (2019). BCAA catabolism in brown fat controls energy homeostasis through SLC25A44. *Nature* 572, 614–619. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1503-x>.
113. Sakaew, W., Tachow, A., Thongseabyoun, W., Khrongyut, S., Rawangwong, A., Polsan, Y., Masahiko, W., Kondo, H., and Hipkaeo, W. (2019). Expression and localization of VIAAT in distal uriniferous tubular epithelium of mouse. *Ann. Anat.* 222, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2018.11.002>.
114. Schiöth, H.B., Roshanbin, S., Häggglund, M.G.A., and Fredriksson, R. (2013). Evolutionary origin of amino acid transporter families SLC32, SLC36 and SLC38 and physiological, pathological and therapeutic aspects. *Mol. Aspects Med.* 34, 571–585. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.012>.
115. Bröer, S. (2014). The SLC38 family of sodium–amino acid co-transporters. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 466, 155–172. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1393-y>.
116. Verdon, Q., Boonen, M., Ribes, C., Jadot, M., Gasnier, B., and Sagné, C. (2017). SNAT7 is the primary lysosomal glutamine exporter required for extracellular protein-dependent growth of cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, E3602–E3611. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617066114>.
117. Häggglund, M.G.A., Hellsten, S.V., Bagchi, S., Philippot, G., Löfqvist, E., Nilsson, V.C.O., Almkvist, I., Karlsson, E., Sreedharan, S., Tafreshiha, A., et al. (2015). Transport of L-glutamine, L-alanine, L-arginine and L-histidine by the neuron-specific Slc38a8 (SNAT8) in CNS. *J. Mol. Biol.* 427, 1495–1512. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.10.016>.

118. Rebsamen, M., Pochini, L., Stasyk, T., de Araújo, M.E.G., Galluccio, M., Kandasamy, R.K., Snijder, B., Fauster, A., Rudashevskaya, E.L., Bruckner, M., et al. (2015). SLC38A9 is a component of the lysosomal amino acid sensing machinery that controls mTORC1. *Nature* 519, 477–481. <https://doi.org/10.1038/nature14107>.
119. Tripathi, R., Aggarwal, T., Lindberg, F.A., Klemm, A.H., and Fredriksson, R. (2022). SLC38A10 Regulate Glutamate Homeostasis and Modulate the AKT/TSC2/mTOR Pathway in Mouse Primary Cortex Cells. *Front. Cell Dev. Biol.* 10, 854397. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.854397>.
120. Bodoy, S., Fotiadis, D., Stoeger, C., Kanai, Y., and Palacín, M. (2013). The small SLC43 family: Facilitator system I amino acid transporters and the orphan EEG1. *Mol. Aspects Med.* 34, 638–645. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.12.006>.
121. Kory, N., Wyant, G.A., Prakash, G., Uit de Bos, J., Bottanelli, F., Pacold, M.E., Chan, S.H., Lewis, C.A., Wang, T., Keys, H.R., et al. (2018). SFXN1 is a mitochondrial serine transporter required for one-carbon metabolism. *Science* 362, eaat9528. <https://doi.org/10.1126/science.aat9528>.
122. Jézégou, A., Llinares, E., Anne, C., Kieffer-Jaquinod, S., O'Regan, S., Aupetit, J., Chabli, A., Sagné, C., Debacker, C., Chadefaux-Vekemans, B., et al. (2012). Heptahelical protein PQLC2 is a lysosomal cationic amino acid exporter underlying the action of cysteamine in cystinosis therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E3434-3443. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211198109>.
123. Berquez, M., Chen, Z., Festa, B.P., Krohn, P., Keller, S.A., Parolo, S., Korzinkin, M., Gaponova, A., Laczko, E., Domenici, E., et al. (2023). Lysosomal cystine export regulates mTORC1 signaling to guide kidney epithelial cell fate specialization. *Nat. Commun.* 14, 3994. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39261-3>.
124. Kandasamy, P., Gyimesi, G., Kanai, Y., and Hediger, M.A. (2018). Amino acid transporters revisited: New views in health and disease. *Trends Biochem. Sci.* 43, 752–789. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.05.003>.
125. Bröer, S. (2023). Intestinal Amino Acid Transport and Metabolic Health. *Annu. Rev. Nutr.* 43, 73–99. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-061121-094344>.
126. Bröer, S., and Gauthier-Coles, G. (2022). Amino Acid Homeostasis in Mammalian Cells with a Focus on Amino Acid Transport. *J. Nutr.* 152, 16–28. <https://doi.org/10.1093/jn/nxab342>.
127. Angelina, R., Laura C, B., Francisco, Z., Cecilio, G., and Guadalupe, G.-A.M. (2011). Expression of the SNAT2 amino acid transporter during the development of rat cerebral cortex. *Int. J. Dev. Neurosci.* 29, 743–748. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.05.010>.
128. Gauthier-Coles, G., Vennitti, J., Zhang, Z., Comb, W.C., Xing, S., Javed, K., Bröer, A., and Bröer, S. (2021). Quantitative modelling of amino acid transport and homeostasis in mammalian cells. *Nat. Commun.* 12, 5282. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25563-x>.
129. Kiela, P.R., and Ghishan, F.K. (2016). Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 30, 145–159. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2016.02.007>.

130. Malik, A.R., and Willnow, T.E. (2019). Excitatory Amino Acid Transporters in Physiology and Disorders of the Central Nervous System. *Int. J. Mol. Sci.* *20*, 5671. <https://doi.org/10.3390/ijms20225671>.
131. Li, Y., Guo, Y., Bröer, A., Dai, L., Bröer, S., and Yan, R. (2024). Cryo-EM structure of the human Asc-1 transporter complex. *Nat. Commun.* *15*, 3036. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-47468-1>.
132. Cramer, S., Beveridge, M., Kilberg, M., and Novak, D. (2002). Physiological importance of system A-mediated amino acid transport to rat fetal development. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* *282*, C153–C160. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2002.282.1.C153>.
133. Guetg, A., Mariotta, L., Bock, L., Herzog, B., Fingerhut, R., Camargo, S.M.R., and Verrey, F. (2015). Essential amino acid transporter Lat4 (Slc43a2) is required for mouse development. *J. Physiol.* *593*, 1273–1289. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.283960>.
134. Kanai, Y. (2022). Amino acid transporter LAT1 (SLC7A5) as a molecular target for cancer diagnosis and therapeutics. *Pharmacol. Ther.* *230*, 107964. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107964>.
135. Functional role of arginine during the peri-implantation period of pregnancy. I. Consequences of loss of function of arginine transporter SLC7A1 mRNA in ovine conceptus trophoctoderm <https://doi.org/10.1096/fj.13-248757>.
136. Winkle, V., and J, L. (2021). Amino Acid Transport and Metabolism Regulate Early Embryo Development: Species Differences, Clinical Significance, and Evolutionary Implications. *Cells* *10*, 3154. <https://doi.org/10.3390/cells10113154>.
137. Yeramian, A., Martin, L., Serrat, N., Arpa, L., Soler, C., Bertran, J., McLeod, C., Palacín, M., Modolell, M., Lloberas, J., et al. (2006). Arginine Transport via Cationic Amino Acid Transporter 2 Plays a Critical Regulatory Role in Classical or Alternative Activation of Macrophages1. *J. Immunol.* *176*, 5918–5924. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.10.5918>.
138. Sheng, L., Luo, Q., and Chen, L. (2022). Amino Acid Solute Carrier Transporters in Inflammation and Autoimmunity. *Drug Metab. Dispos.* *50*, 1228–1237. <https://doi.org/10.1124/dmd.121.000705>.
139. Ren, W., Liu, G., Yin, J., Tan, B., Wu, G., Bazer, F.W., Peng, Y., and Yin, Y. (2017). Amino-acid transporters in T-cell activation and differentiation. *Cell Death Dis.* *8*, e2655. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.222>.
140. Gan, Z., Guo, Y., Zhao, M., Ye, Y., Liao, Y., Liu, B., Yin, J., Zhou, X., Yan, Y., Yin, Y., et al. (2024). Excitatory amino acid transporter supports inflammatory macrophage responses. *Sci. Bull.* <https://doi.org/10.1016/j.scib.2024.03.055>.
141. Guo, X., Schmiege, P., Assafa, T.E., Wang, R., Xu, Y., Donnelly, L., Fine, M., Ni, X., Jiang, J., Millhauser, G., et al. (2022). Structure and mechanism of human cystine exporter cystinosin. *Cell* *185*, 3739–3752.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.08.020>.
142. Heublein, S., Kazi, S., Ogmundsdóttir, M.H., Attwood, E.V., Kala, S., Boyd, C. a. R., Wilson, C., and Goberdhan, D.C.I. (2010). Proton-assisted amino-acid transporters are conserved regulators of

- proliferation and amino-acid-dependent mTORC1 activation. *Oncogene* 29, 4068–4079. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.177>.
143. Beaumatin, F., O'Prey, J., Barthet, V.J.A., Zunino, B., Parvy, J.-P., Bachmann, A.M., O'Prey, M., Kania, E., Gonzalez, P.S., Macintosh, R., et al. (2019). mTORC1 Activation Requires DRAM-1 by Facilitating Lysosomal Amino Acid Efflux. *Mol. Cell* 76, 163-176.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.021>.
 144. Chapel, A., Kieffer-Jaquinod, S., Sagné, C., Verdon, Q., Ivaldi, C., Mellal, M., Thirion, J., Jadot, M., Bruley, C., Garin, J., et al. (2013). An extended proteome map of the lysosomal membrane reveals novel potential transporters. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 12, 1572–1588. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.021980>.
 145. Lei, H.-T., Mu, X., Hattne, J., and Gonen, T. (2021). A conformational change in the N terminus of SLC38A9 signals mTORC1 activation. *Structure* 29, 426-432.e8. <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.11.014>.
 146. Higuchi-Sanabria, R., Shen, K., Kelet, N., Frankino, P.A., Durieux, J., Bar-Ziv, R., Sing, C.N., Garcia, E.J., Homentcovschi, S., Sanchez, M., et al. (2020). Lysosomal recycling of amino acids affects ER quality control. *Sci. Adv.* 6. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz9805>.
 147. Ögmundsdóttir, M.H., Heublein, S., Kazi, S., Reynolds, B., Visvalingam, S.M., Shaw, M.K., and Goberdhan, D.C.I. (2012). Proton-Assisted Amino Acid Transporter PAT1 Complexes with Rag GTPases and Activates TORC1 on Late Endosomal and Lysosomal Membranes. *PLoS ONE* 7, e36616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036616>.
 148. Amick, J., Tharkeshwar, A.K., Talaia, G., and Ferguson, S.M. (2019). PQLC2 recruits the C9orf72 complex to lysosomes in response to cationic amino acid starvation. *J. Cell Biol.* 219, e201906076. <https://doi.org/10.1083/jcb.201906076>.
 149. Wyant, G.A., Abu-Remaileh, M., Wolfson, R.L., Chen, W.W., Freinkman, E., Danai, L.V., Vander Heiden, M.G., and Sabatini, D.M. (2017). mTORC1 Activator SLC38A9 Is Required to Efflux Essential Amino Acids from Lysosomes and Use Protein as a Nutrient. *Cell* 171, 642-654.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.046>.
 150. Hundal, H.S., and Taylor, P.M. (2009). Amino acid transceptors: gate keepers of nutrient exchange and regulators of nutrient signaling. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E603-613. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.91002.2008>.
 151. Sagné, C., Agulhon, C., Ravassard, P., Darmon, M., Hamon, M., El Mestikawy, S., Gasnier, B., and Giros, B. (2001). Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 7206–7211. <https://doi.org/10.1073/pnas.121183498>.
 152. Wang, D., Wan, X., Du, X., Zhong, Z., Peng, J., Xiong, Q., Chai, J., and Jiang, S. (2021). Insights into the Interaction of Lysosomal Amino Acid Transporters SLC38A9 and SLC36A1 Involved in mTORC1 Signaling in C2C12 Cells. *Biomolecules* 11, 1314. <https://doi.org/10.3390/biom11091314>.
 153. Colombini, M. (2012). VDAC structure, selectivity, and dynamics. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1818, 1457–1465. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.12.026>.

154. Ruprecht, J.J., and Kunji, E.R.S. (2020). The SLC25 Mitochondrial Carrier Family: Structure and Mechanism. *Trends Biochem. Sci.* *45*, 244–258. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.11.001>.
155. Palmieri, F. (2013). The mitochondrial transporter family SLC25: Identification, properties and physiopathology. *Mol. Aspects Med.* *34*, 465–484. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.005>.
156. Gyimesi, G., and Hediger, M.A. (2020). Sequence Features of Mitochondrial Transporter Protein Families. *Biomolecules* *10*, 1611. <https://doi.org/10.3390/biom10121611>.
157. Yoo, H.C., Park, S.J., Nam, M., Kang, J., Kim, K., Yeo, J.H., Kim, J.-K., Heo, Y., Lee, H.S., Lee, M.Y., et al. (2020). A Variant of SLC1A5 Is a Mitochondrial Glutamine Transporter for Metabolic Reprogramming in Cancer Cells. *Cell Metab.* *31*, 267–283.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.11.020>.
158. Bröer, S. (2020). Amino Acid Transporters as Targets for Cancer Therapy: Why, Where, When, and How. *Int. J. Mol. Sci.* *21*, 6156. <https://doi.org/10.3390/ijms21176156>.
159. Kahya, U., Köseer, A.S., and Dubrovskaja, A. (2021). Amino Acid Transporters on the Guard of Cell Genome and Epigenome. *Cancers* *13*, 125. <https://doi.org/10.3390/cancers13010125>.
160. Fan, S.-J., Snell, C., Turley, H., Li, J.-L., McCormick, R., Perera, S.M.W., Heublein, S., Kazi, S., Azad, A., Wilson, C., et al. (2016). PAT4 levels control amino-acid sensitivity of rapamycin-resistant mTORC1 from the Golgi and affect clinical outcome in colorectal cancer. *Oncogene* *35*, 3004–3015. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.363>.
161. Tripathi, R., Hosseini, K., Arapi, V., Fredriksson, R., and Bagchi, S. (2019). SLC38A10 (SNAT10) is Located in ER and Golgi Compartments and Has a Role in Regulating Nascent Protein Synthesis. *Int. J. Mol. Sci.* *20*, 6265. <https://doi.org/10.3390/ijms20246265>.
162. Bröer, S., and Palacín, M. (2011). The role of amino acid transporters in inherited and acquired diseases. *Biochem. J.* *436*, 193–211. <https://doi.org/10.1042/BJ20101912>.
163. Bröer, A., Klingel, K., Kowalczyk, S., Rasko, J.E.J., Cavanaugh, J., and Bröer, S. (2004). Molecular Cloning of Mouse Amino Acid Transport System BO, a Neutral Amino Acid Transporter Related to Hartnup Disorder. *J. Biol. Chem.* *279*, 24467–24476. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400904200>.
164. Leray, X. (2024). Étude mécanistique et physiologique du transporteur lysosomal d'acides aminés PQLC2.
165. Butler, M., van der Meer, L.T., and van Leeuwen, F.N. (2021). Amino Acid Depletion Therapies: Starving Cancer Cells to Death. *Trends Endocrinol. Metab.* *TEM* *32*, 367–381. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2021.03.003>.
166. Wang, Q., and Holst, J. (2015). L-type amino acid transport and cancer: targeting the mTORC1 pathway to inhibit neoplasia. *Am. J. Cancer Res.* *5*, 1281–1294. <https://doi.org/PMID: 26101697>.
167. Cormerais, Y., Vučetić, M., Parks, S.K., and Pouyssegur, J. (2020). Amino Acid Transporters Are a Vital Focal Point in the Control of mTORC1 Signaling and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* *22*, 23. <https://doi.org/10.3390/ijms22010023>.

168. Fuchs, B.C., and Bode, B.P. (2005). Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: partners in crime? *Semin. Cancer Biol.* 15, 254–266. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.04.005>.
169. Bröer, A., Rahimi, F., and Bröer, S. (2016). Deletion of Amino Acid Transporter ASCT2 (SLC1A5) Reveals an Essential Role for Transporters SNAT1 (SLC38A1) and SNAT2 (SLC38A2) to Sustain Glutaminolysis in Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* 291, 13194–13205. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.700534>.
170. White, P.J., McGarrah, R.W., Herman, M.A., Bain, J.R., Shah, S.H., and Newgard, C.B. (2021). Insulin action, type 2 diabetes, and branched-chain amino acids: A two-way street. *Mol. Metab.* 52, 101261. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101261>.
171. Bröer, S. (2022). Amino acid transporters as modulators of glucose homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.* 33, 120–135. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2021.11.004>.
172. Gammelsaeter, R., Jenstad, M., Bredahl, M.K.L., Gundersen, V., and Chaudhry, F.A. (2009). Complementary expression of SN1 and SAT2 in the islets of Langerhans suggests concerted action of glutamine transport in the regulation of insulin secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381, 378–382. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.02.062>.
173. Hediger, M.A., Coady, M.J., Ikeda, T.S., and Wright, E.M. (1987). Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. *Nature* 330, 379–381. <https://doi.org/10.1038/330379a0>.
174. Dascal, N. (1987). The Use of *Xenopus* Oocytes for the Study of Ion Channel. *Crit. Rev. Biochem.* <https://doi.org/10.3109/10409238709086960>.
175. Palmieri, F., Indiveri, C., Bisaccia, F., and Iacobazzi, V. (1995). [25] Mitochondrial metabolite carrier proteins: Purification, reconstitution, and transport studies. In *Methods in Enzymology Mitochondrial Biogenesis and Genetics Part A.* (Academic Press), pp. 349–369. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)60150-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)60150-3).
176. Agrimi, G., Di Noia, M.A., Marobbio, C.M.T., Fiermonte, G., Lasorsa, F.M., and Palmieri, F. (2004). Identification of the human mitochondrial S-adenosylmethionine transporter: bacterial expression, reconstitution, functional characterization and tissue distribution. *Biochem. J.* 379, 183–190. <https://doi.org/10.1042/BJ20031664>.
177. Hägglund, M.G.A., Sreedharan, S., Nilsson, V.C.O., Shaik, J.H.A., Almkvist, I.M., Bäcklin, S., Wrangé, O., and Fredriksson, R. (2011). Identification of SLC38A7 (SNAT7) protein as a glutamine transporter expressed in neurons. *J. Biol. Chem.* 286, 20500–20511. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.162404>.
178. Hatanaka, T., Huang, W., Ling, R., Prasad, P.D., Sugawara, M., Leibach, F.H., and Ganapathy, V. (2001). Evidence for the transport of neutral as well as cationic amino acids by ATA3, a novel and liver-specific subtype of amino acid transport system A. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1510, 10–17. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00390-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00390-4).
179. Sugawara, M., Nakanishi, T., Fei, Y.-J., Martindale, R.G., Ganapathy, M.E., Leibach, F.H., and Ganapathy, V. (2000). Structure and function of ATA3, a new subtype of amino acid transport system

A, primarily expressed in the liver and skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1509, 7–13. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00349-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00349-7).

180. Gu, S., Adan-Rice, D., Leach, R.J., and Jiang, J.X. (2001). A novel human amino acid transporter, hNAT3: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic structure, expression, and functional characterization. *Genomics* 74, 262–272. <https://doi.org/10.1006/geno.2001.6567>.
181. Bröer, A., Gauthier-Coles, G., Rahimi, F., van Geldermalsen, M., Dorsch, D., Wegener, A., Holst, J., and Bröer, S. (2019). Ablation of the ASCT2 (SLC1A5) gene encoding a neutral amino acid transporter reveals transporter plasticity and redundancy in cancer cells. *J. Biol. Chem.* 294, 4012–4026. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006378>.
182. Cormerais, Y., Giuliano, S., LeFloch, R., Front, B., Durivault, J., Tambutté, E., Massard, P.-A., de la Ballina, L.R., Endou, H., Wempe, M.F., et al. (2016). Genetic Disruption of the Multifunctional CD98/LAT1 Complex Demonstrates the Key Role of Essential Amino Acid Transport in the Control of mTORC1 and Tumor Growth. *Cancer Res.* 76, 4481–4492. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3376>.
183. Narlikar, L., and Ovcharenko, I. (2009). Identifying regulatory elements in eukaryotic genomes. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 8, 215–230. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elp014>.
184. Hajheidari, M., and Huang, S.C. (2022). Elucidating the biology of transcription factor–DNA interaction for accurate identification of cis-regulatory elements. *Curr. Opin. Plant Biol.* 68, 102232. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2022.102232>.
185. Wang, D., Guo, C., Wan, X., Guo, K., Niu, H., Zheng, R., Chai, J., and Jiang, S. (2021). Identification of amino acid response element of SLC38A9 as an ATF4-binding site in porcine skeletal muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 569, 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.06.083>.
186. Ebert, S.M., Rasmussen, B.B., Judge, A.R., Judge, S.M., Larsson, L., Wek, R.C., Anthony, T.G., Marcotte, G.R., Miller, M.J., Yorek, M.A., et al. (2021). Biology of Activating Transcription Factor 4 (ATF4) and Its Role in Skeletal Muscle Atrophy. *J. Nutr.* 152, 926–938. <https://doi.org/10.1093/jn/nxab440>.
187. Gong, S.S., Guerrini, L., and Basilico, C. (1991). Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. *Mol. Cell. Biol.* 11, 6059–6066. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.12.6059-6066.1991>.
188. Han, J., Back, S.H., Hur, J., Lin, Y.-H., Gildersleeve, R., Shan, J., Yuan, C.L., Krokowski, D., Wang, S., Hatzoglou, M., et al. (2013). ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat. Cell Biol.* 15, 481–490. <https://doi.org/10.1038/ncb2738>.
189. Rebsamen, M., Girardi, E., Sedlyarov, V., Scorzoni, S., Papakostas, K., Vollert, M., Konecka, J., Guertl, B., Klavins, K., Wiedmer, T., et al. (2022). Gain-of-function genetic screens in human cells identify SLC transporters overcoming environmental nutrient restrictions. *Life Sci. Alliance* 5, e202201404. <https://doi.org/10.26508/lsa.202201404>.
190. Sies, H., Berndt, C., and Jones, D.P. (2017). Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* 86, 715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>.

191. Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* *4*, 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>.
192. Chorley, B.N., Campbell, M.R., Wang, X., Karaca, M., Sambandan, D., Bangura, F., Xue, P., Pi, J., Kleeberger, S.R., and Bell, D.A. (2012). Identification of novel NRF2-regulated genes by ChIP-Seq: influence on retinoid X receptor alpha. *Nucleic Acids Res.* *40*, 7416–7429. <https://doi.org/10.1093/nar/gks409>.
193. Velázquez-Villegas, L., Noriega, L.G., López-Barradas, A.M., Tobon-Cornejo, S., Méndez-García, A.L., Tovar, A.R., Torres, N., and Ortiz-Ortega, V.M. (2021). ChREBP downregulates SNAT2 amino acid transporter expression through interactions with SMRT in response to a high-carbohydrate diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *320*, E102–E112. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00326.2020>.
194. Sargsyan, A., Doridot, L., Hannou, S.A., Tong, W., Srinivasan, H., Ivison, R., Monn, R., Kou, H.H., Haldeman, J.M., Arlotto, M., et al. (2023). HGFAC is a ChREBP-regulated hepatokine that enhances glucose and lipid homeostasis. *JCI Insight* *8*. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.153740>.
195. Palmieri, M., Impey, S., Kang, H., di Ronza, A., Pelz, C., Sardiello, M., and Ballabio, A. (2011). Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 3852–3866. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr306>.
196. Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D.L., Valenza, M., Gennarino, V.A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R.S., et al. (2009). A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* *325*, 473–477. <https://doi.org/10.1126/science.1174447>.
197. Franco-Juárez, B., Coronel-Cruz, C., Hernández-Ochoa, B., Gómez-Manzo, S., Cárdenas-Rodríguez, N., Arreguin-Espinosa, R., Bandala, C., Canseco-Ávila, L.M., and Ortega-Cuellar, D. (2022). TFEB; Beyond Its Role as an Autophagy and Lysosomes Regulator. *Cells* *11*, 3153. <https://doi.org/10.3390/cells11193153>.
198. Rojo de la Vega, M., Chapman, E., and Zhang, D.D. (2018). NRF2 and the Hallmarks of Cancer. *Cancer Cell* *34*, 21–43. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.022>.
199. Zhang, B., Chen, Y., Shi, X., Zhou, M., Bao, L., Hatanpaa, K.J., Patel, T., DeBerardinis, R.J., Wang, Y., and Luo, W. (2021). Regulation of branched-chain amino acid metabolism by hypoxia-inducible factor in glioblastoma. *Cell. Mol. Life Sci.* *78*, 195–206. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03483-1>.
200. Elorza, A., Soro-Arnáiz, I., Meléndez-Rodríguez, F., Rodríguez-Vaello, V., Marsboom, G., de Cárcer, G., Acosta-Iborra, B., Albacete-Albacete, L., Ordóñez, A., Serrano-Oviedo, L., et al. (2012). HIF2 α acts as an mTORC1 activator through the amino acid carrier SLC7A5. *Mol. Cell* *48*, 681–691. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.017>.
201. Czuba, L.C., Hillgren, K.M., and Swaan, P.W. (2018). Post-translational Modifications of Transporters. *Pharmacol. Ther.* *192*, 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.06.013>.
202. Pedersen, N.B., Carlsson, M.C., and Pedersen, S.F. (2016). Glycosylation of solute carriers: mechanisms and functional consequences. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* *468*, 159–176. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1730-4>.

203. Martínez-Maza, R., Poyatos, I., López-Corcuera, B., Núñez, E., Giménez, C., Zafra, F., and Aragón, C. (2001). The Role of *N*-Glycosylation in Transport to the Plasma Membrane and Sorting of the Neuronal Glycine Transporter GLYT2. *J. Biol. Chem.* 276, 2168–2173. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006774200>.
204. Olivares, L., Aragón, C., Giménez, C., and Zafra, F. (1995). The Role of *N*-Glycosylation in the Targeting and Activity of the GLYT1 Glycine Transporter. *J. Biol. Chem.* 270, 9437–9442. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.16.9437>.
205. Bennett, E.R., and Kanner, B.I. (1997). The Membrane Topology of GAT-1, a (Na⁺⁺ Cl⁻)-coupled γ -Aminobutyric Acid Transporter from Rat Brain. *J. Biol. Chem.* 272, 1203–1210. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.2.1203>.
206. Bodoy, S., Martín, L., Zorzano, A., Palacín, M., Estévez, R., and Bertran, J. (2005). Identification of LAT4, a novel amino acid transporter with system L activity. *J. Biol. Chem.* 280, 12002–12011. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408638200>.
207. Shi, Q., Padmanabhan, R., Villegas, C.J., Gu, S., and Jiang, J.X. (2011). Membrane Topological Structure of Neutral System N/A Amino Acid Transporter 4 (SNAT4) Protein. *J. Biol. Chem.* 286, 38086–38094. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.220277>.
208. Wollscheid, B., Bausch-Fluck, D., Henderson, C., O'Brien, R., Bibel, M., Schiess, R., Aebbersold, R., and Watts, J.D. (2009). Mass-spectrometric identification and relative quantification of N-linked cell surface glycoproteins. *Nat. Biotechnol.* 27, 378–386. <https://doi.org/10.1038/nbt.1532>.
209. Zhang, C., Shafaq-Zadah, M., Pawling, J., Hesketh, G.G., Dransart, E., Pacholczyk, K., Longo, J., Gingras, A.-C., Penn, L.Z., Johannes, L., et al. (2023). SLC3A2 N-glycosylation and Golgi remodeling regulate SLC7A amino acid exchangers and stress mitigation. *J. Biol. Chem.* 299, 105416. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105416>.
210. Juan-Sanz, J. de, Núñez, E., López-Corcuera, B., and Aragón, C. (2013). Constitutive Endocytosis and Turnover of the Neuronal Glycine Transporter GlyT2 Is Dependent on Ubiquitination of a C-Terminal Lysine Cluster. *PLOS ONE* 8, e58863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058863>.
211. Chen, Q., Zheng, W., Guan, J., Liu, H., Dan, Y., Zhu, L., Song, Y., Zhou, Y., Zhao, X., Zhang, Y., et al. (2023). SOCS2-enhanced ubiquitination of SLC7A11 promotes ferroptosis and radiosensitization in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Differ.* 30, 137–151. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-01051-7>.
212. Barthelemy, C., and André, B. (2019). Ubiquitylation and endocytosis of the human LAT1/SLC7A5 amino acid transporter. *Sci. Rep.* 9, 16760. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53065-w>.
213. Zhang, Y., He, X., Meng, X., Wu, X., Tong, H., Zhang, X., and Qu, S. (2017). Regulation of glutamate transporter trafficking by Nedd4-2 in a Parkinson's disease model. *Cell Death Dis.* 8, e2574–e2574. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.454>.
214. Vina-Vilaseca, A., Bender-Sigel, J., Sorkina, T., Closs, E.I., and Sorkin, A. (2011). Protein Kinase C-dependent Ubiquitination and Clathrin-mediated Endocytosis of the Cationic Amino Acid Transporter CAT-1. *J. Biol. Chem.* 286, 8697–8706. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.186858>.

215. Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Lee, E., Mingwei, N., and Aschner, M. (2011). Disruption of astrocytic glutamine turnover by manganese is mediated by the protein kinase C pathway. *Glia* 59, 1732–1743. <https://doi.org/10.1002/glia.21219>.
216. Rosario, F.J., Dimasuay, K.G., Kanai, Y., Powell, T.L., and Jansson, T. (2016). Regulation of Amino Acid Transporter Trafficking by mTORC1 in Primary Human Trophoblast cells is Mediated by the Ubiquitin Ligase Nedd4-2. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 130, 499–512. <https://doi.org/10.1042/CS20150554>.
217. Ivashov, V., Zimmer, J., Schwabl, S., Kahlhofer, J., Weys, S., Gstir, R., Jakschitz, T., Kremser, L., Bonn, G.K., Lindner, H., et al. (2020). Complementary α -arrestin-ubiquitin ligase complexes control nutrient transporter endocytosis in response to amino acids. *eLife* 9, e58246. <https://doi.org/10.7554/eLife.58246>.
218. Kovalchuk, V., and Nałęcz, K.A. (2021). Trafficking to the Cell Surface of Amino Acid Transporter SLC6A14 Upregulated in Cancer Is Controlled by Phosphorylation of SEC24C Protein by AKT Kinase. *Cells* 10, 1800. <https://doi.org/10.3390/cells10071800>.
219. Samluk, Ł., Czeredys, M., Skowronek, K., and Nałęcz, K.A. (2012). Protein kinase C regulates amino acid transporter ATB0,+ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 422, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.106>.
220. González, M.I., Kazanietz, M.G., and Robinson, M.B. (2002). Regulation of the neuronal glutamate transporter excitatory amino acid carrier-1 (EAAC1) by different protein kinase C subtypes. *Mol. Pharmacol.* 62, 901–910. <https://doi.org/10.1124/mol.62.4.901>.
221. Oparija, L., Rajendran, A., Poncet, N., and Verrey, F. (2019). Anticipation of food intake induces phosphorylation switch to regulate basolateral amino acid transporter LAT4 (SLC43A2) function. *J. Physiol.* 597, 521–542. <https://doi.org/10.1113/JP276714>.
222. Mizoguchi, K., Cha, S.H., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Shigeta, Y., Matsuo, H., Fukushima, J.-I., Awa, Y., Akakura, K., Goya, T., et al. (2001). Human cystinuria-related transporter: Localization and functional characterization. *Kidney Int.* 59, 1821–1833. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.0590051821.x>.
223. Bedet, C., Isambert, M.-F., Henry, J.-P., and Gasnier, B. (2000). Constitutive Phosphorylation of the Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter in Rat Central Nervous System. *J. Neurochem.* 75, 1654–1663. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0751654.x>.
224. de Juan-Sanz, J., Zafra, F., López-Corcuera, B., and Aragón, C. (2011). Endocytosis of the Neuronal Glycine Transporter GLYT2: Role of Membrane Rafts and Protein Kinase C-Dependent Ubiquitination. *Traffic* 12, 1850–1867. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01278.x>.
225. Mukhopadhyay, S., Biancur, D.E., Parker, S.J., Yamamoto, K., Banh, R.S., Paulo, J.A., Mancias, J.D., and Kimmelman, A.C. (2021). Autophagy is required for proper cysteine homeostasis in pancreatic cancer through regulation of SLC7A11. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 118, e2021475118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2021475118>.

226. Baffi, T.R., and Newton, A.C. (2022). Protein kinase C: release from quarantine by mTORC2. *Trends Biochem. Sci.* *47*, 518–530. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.03.003>.
227. Enns, L.C., and Ladiges, W. (2010). Protein kinase A signaling as an anti-aging target. *Ageing Res. Rev.* *9*, 269–272. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2010.02.004>.
228. Hyde, R., Peyrollier, K., and Hundal, H.S. (2002). Insulin promotes the cell surface recruitment of the SAT2/ATA2 system A amino acid transporter from an endosomal compartment in skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* *277*, 13628–13634. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108609200>.
229. Hatanaka, T., Hatanaka, Y., Tsuchida, J., Ganapathy, V., and Setou, M. (2006). Amino Acid Transporter ATA2 Is Stored at the trans-Golgi Network and Released by Insulin Stimulus in Adipocytes. *J. Biol. Chem.* *281*, 39273–39284. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604534200>.
230. Rosario, F.J., Kanai, Y., Powell, T.L., and Jansson, T. (2013). Mammalian target of rapamycin signalling modulates amino acid uptake by regulating transporter cell surface abundance in primary human trophoblast cells. *J. Physiol.* *591*, 609–625. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.238014>.
231. Hornbeck, P., Zhang, B., Murray, B., Kornhauseur, J., Latham, V., and Skrzypek, P. (2014). PhosphoSitePlus. *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/nkt100>.
232. Koe, J.C., and Parker, S.J. (2024). The posttranslational regulation of amino acid transporters is critical for their function in the tumor microenvironment. *Curr. Opin. Biotechnol.* *85*, 103022. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2023.103022>.
233. FAO (2024). The State of World Fisheries and Aquaculture 2024 (FAO).
234. Nations, U. Population | Nations Unies. U. N. <https://www.un.org/fr/global-issues/population>.
235. European Commission, Directorate-General for Maritime Affairs and Fisheries (2021). A new strategic vision for sustainable aquaculture production and consumption in the European Union – Blue farming in the European Green Deal. Publ. Off. Eur. Union. <https://data.europa.eu/doi/10.2771/961425>.
236. Saudubray, F., and Falcone, P. (2022). Développement de la filière piscicole - Inspection générale de l'Environnement et du Développement durable (IGEDD).
237. FAO (2024). *Oncorhynchus mykiss*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Fish. Aquac. https://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/oncorhynchus_mykiss/en.
238. Kaushik, S.J., and Seiliez, I. (2010). Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: current knowledge and future needs. *Aquac. Res.* *41*, 322–332. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02174.x>.
239. Gaylord, G., Barrows, F.T., Overtuf, K.E., Liu, K., and Hu, G. (2010). An overview of progress toward developing an all plant-based diet for rainbow trout. *Bull Fish Res Agen* *31*, 9–14.

240. Aas, T.S., Ytrestøyl, T., and Åsgård, T. (2019). Utilization of feed resources in the production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway: An update for 2016. *Aquac. Rep.* *15*, 100216. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100216>.
241. Fishmeal - Monthly Price - Commodity Prices - Price Charts, Data, and News - IndexMundi (2024). <https://www.indexmundi.com/Commodities/?commodity=fish-meal&months=120>.
242. Naylor, R.L., Hardy, R.W., Buschmann, A.H., Bush, S.R., Cao, L., Klinger, D.H., Little, D.C., Lubchenco, J., Shumway, S.E., and Troell, M. (2021). A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature* *591*, 551–563. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03308-6>.
243. Collins, S.A., Øverland, M., Skrede, A., and Drew, M.D. (2013). Effect of plant protein sources on growth rate in salmonids: Meta-analysis of dietary inclusion of soybean, pea and canola/rapeseed meals and protein concentrates. *Aquaculture* *400–401*, 85–100. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.03.006>.
244. Chakraborty, P., Mallik, A., Sarang, N., and Lingam, S. (2019). A review on alternative plant protein sources available for future sustainable aqua feed production. 1399–1404.
245. Krogdahl, Å., and Bakke, A.M. (2015). Antinutrients. In *Dietary Nutrients, Additives, and Fish Health* (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 211–235. <https://doi.org/10.1002/9781119005568.ch10>.
246. Hemre, G.-I., and Deng, D.-F. (2015). Carbohydrates. In *Dietary Nutrients, Additives, and Fish Health* (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 95–110. <https://doi.org/10.1002/9781119005568.ch4>.
247. Hussain, S.M., Bano, A.A., Ali, S., Rizwan, M., Adrees, M., Zahoor, A.F., Sarker, P.K., Hussain, M., Arsalan, M.Z.-H., Yong, J.W.H., et al. (2024). Substitution of fishmeal: Highlights of potential plant protein sources for aquaculture sustainability. *Heliyon* *10*, e26573. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e26573>.
248. Kaiser, F., Harbach, H., and Schulz, C. (2022). Rapeseed proteins as fishmeal alternatives: A review. *Rev. Aquac.* *14*, 1887–1911. <https://doi.org/10.1111/raq.12678>.
249. Heuzé V, Tran G., and Kaushik S (2015). Fish meal. Feedipedia, a programme by INRAE, CIRAD, AFZ and FAO. Last updated on May 11, 2015, 14:32.
250. Heuzé V, Tran G, Hassoun P, Lessire M., and Lebas F (2019). Sunflower meal. Feedipedia, a programme by INRAE, CIRAD, AFZ and FAO.
251. Heuzé V., Tran G, Hassoun P, Bastianelli D., and Lebas F (2019). Cottonseed meal. Feedipedia, a programme by INRAE, CIRAD, AFZ and FAO.
252. Heuzé V., Tran G, Sauvant D, Renaudeau D., Lessire M, and Lebas F (2018). Corn gluten meal. Feedipedia, a programme by INRAE, CIRAD, AFZ and FAO.
253. Heuzé V., Tran G., and Kaushik S (2020). Soybean meal. Feedipedia, a programme by INRAE, CIRAD, AFZ and FAO. <https://feedipedia.org/node/674>.

254. Heuzé V, Sauvant D, Lessire M, and Lebas F., (2020). Rapeseed meal. Feedipedia, a programme by INRAE, CIRAD, AFZ and FAO.
255. Deborde, C., Hounoum, B.M., Moing, A., Maucourt, M., Jacob, D., Corraze, G., Médale, F., and Fauconneau, B. (2021). Putative imbalanced amino acid metabolism in rainbow trout long term fed a plant-based diet as revealed by 1H-NMR metabolomics. *J. Nutr. Sci.* *10*, e13. <https://doi.org/10.1017/jns.2021.3>.
256. de Francesco, M., Parisi, G., Médale, F., Lupi, P., Kaushik, S.J., and Poli, B.M. (2004). Effect of long-term feeding with a plant protein mixture based diet on growth and body/fillet quality traits of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* *236*, 413–429. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.01.006>.
257. Glencross, B., Fracalossi, D.M., Hua, K., Izquierdo, M., Mai, K., Øverland, M., Robb, D., Roubach, R., Schrama, J., Small, B., et al. (2023). Harvesting the benefits of nutritional research to address global challenges in the 21st century. *J. World Aquac. Soc.* *54*, 343–363. <https://doi.org/10.1111/jwas.12948>.
258. Schuhmacher, A., Wax, C., and Gropp, J.M. (1997). Plasma amino acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed intact protein or a crystalline amino acid diet. *Aquaculture* *151*, 15–28. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01502-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01502-5).
259. Cowey, C.B., and Walton, M.J. (1988). Studies on the uptake of (14C) amino acids derived from both dietary (14C) protein and dietary (14C) amino acids by rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* *33*, 293–305. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1988.tb05472.x>.
260. Larsen, B.K., Dalsgaard, J., and Pedersen, P.B. (2012). Effects of plant proteins on postprandial, free plasma amino acid concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* *326–329*, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.11.028>.
261. Green, J.A., and Hardy, R.W. (2008). The effects of dietary protein: energy ratio and amino acid pattern on nitrogen utilization and excretion of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Biol.* *73*, 663–682. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.01965.x>.
262. Rolland, M., Larsen, B.K., Holm, J., Dalsgaard, J., and Skov, P.V. (2015). Effect of plant proteins and crystalline amino acid supplementation on postprandial plasma amino acid profiles and metabolic response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac. Int.* *23*, 1071–1087. <https://doi.org/10.1007/s10499-014-9865-4>.
263. Glencross, B., Ling, X., Gatlin, D., Kaushik, S., Øverland, M., Newton, R., and Valente, L.M.P. (2024). A SWOT Analysis of the Use of Marine, Grain, Terrestrial-Animal and Novel Protein Ingredients in Aquaculture Feeds. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* *32*, 396–434. <https://doi.org/10.1080/23308249.2024.2315049>.
264. Seilliez, I., Gabillard, J.-C., Skiba-Cassy, S., Garcia-Serrana, D., Gutiérrez, J., Kaushik, S., Panserat, S., and Tesseraud, S. (2008). An in vivo and in vitro assessment of TOR signaling cascade in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* *295*, R329–R335. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00146.2008>.

265. Belghit, I., Skiba-Cassy, S., Geurden, I., Dias, K., Surget, A., Kaushik, S., Panserat, S., and Seiliez, I. (2014). Dietary methionine availability affects the main factors involved in muscle protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nutr.* *112*, 493–503. <https://doi.org/10.1017/S0007114514001226>.
266. Dai, W., Panserat, S., Kaushik, S., Terrier, F., Plagnes-Juan, E., Seiliez, I., and Skiba-Cassy, S. (2016). Hepatic fatty acid biosynthesis is more responsive to protein than carbohydrate in rainbow trout during acute stimulations. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* *310*, R74–R86. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00281.2015>.
267. Seiliez, I., Panserat, S., Lansard, M., Polakof, S., Plagnes-Juan, E., Surget, A., Dias, K., Larquier, M., Kaushik, S., and Skiba-Cassy, S. (2011). Dietary carbohydrate-to-protein ratio affects TOR signaling and metabolism-related gene expression in the liver and muscle of rainbow trout after a single meal. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* *300*, R733–R743. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00579.2010>.
268. Morin, G., Pinel, K., Dias, K., Seiliez, I., and Beaumatin, F. (2020). RTH-149 Cell Line, a Useful Tool to Decipher Molecular Mechanisms Related to Fish Nutrition. *Cells* *9*, 1754. <https://doi.org/10.3390/cells9081754>.
269. Belghit, I., Panserat, S., Sadoul, B., Dias, K., Skiba-Cassy, S., and Seiliez, I. (2013). Macronutrient Composition of the Diet Affects the Feeding-Mediated Down Regulation of Autophagy in Muscle of Rainbow Trout (*O. mykiss*). *PLoS ONE* *8*, e74308. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074308>.
270. Lansard, M., Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Dias, K., Seiliez, I., and Skiba-Cassy, S. (2011). L-Leucine, L-Methionine, and L-Lysine Are Involved in the Regulation of Intermediary Metabolism-Related Gene Expression in Rainbow Trout Hepatocytes. *J. Nutr.* *141*, 75–80. <https://doi.org/10.3945/jn.110.124511>.
271. Pinel, K., Heraud, C., Morin, G., Dias, K., Marcé, A., Beauclair, L., Fontagné-Dicharry, S., Masagounder, K., Klünemann, M., Seiliez, I., et al. (2022). Are the Main Methionine Sources Equivalent? A Focus on DL-Methionine and DL-Methionine Hydroxy Analog Reveals Differences on Rainbow Trout Hepatic Cell Lines Functions. *Int. J. Mol. Sci.* *23*, 2935. <https://doi.org/10.3390/ijms23062935>.
272. Morin, G., Pinel, K., Heraud, C., Le-Garrec, S., Wayman, C., Dias, K., Terrier, F., Lanuque, A., Fontagné-Dicharry, S., Seiliez, I., et al. (2024). Precision formulation, a new concept to improve dietary amino acid absorption based on the study of cationic amino acid transporters. *iScience* *27*, 108894. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.108894>.
273. Lansard, M., Panserat, S., Seiliez, I., Polakof, S., Plagnes-Juan, E., Geurden, I., Médale, F., Kaushik, S., Corraze, G., and Skiba-Cassy, S. (2009). Hepatic protein kinase B (Akt)–target of rapamycin (TOR)–signalling pathways and intermediary metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) are not significantly affected by feeding plant-based diets. *Br. J. Nutr.* *102*, 1564–1573. <https://doi.org/10.1017/S000711450999095X>.
274. Skiba-Cassy, S., Geurden, I., Panserat, S., and Seiliez, I. (2016). Dietary methionine imbalance alters the transcriptional regulation of genes involved in glucose, lipid and amino acid metabolism in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* *454*, 56–65.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.12.015>.

275. Lansard, M., Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Seiliez, I., and Skiba-Cassy, S. (2010). Integration of insulin and amino acid signals that regulate hepatic metabolism-related gene expression in rainbow trout: role of TOR. *Amino Acids* 39, 801–810. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0533-3>.
276. Skiba-Cassy, S., Lansard, M., Panserat, S., and Médale, F. (2009). Rainbow trout genetically selected for greater muscle fat content display increased activation of liver TOR signaling and lipogenic gene expression. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297, R1421–R1429. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00312.2009>.
277. Comesaña, S., Chivite, M., Blanco, A.M., Alborja-Valado, M., Calo, J., Conde-Sieira, M., and Soengas, J.L. (2022). Involvement of Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) in Valine Orexigenic Effects in Rainbow Trout. *Aquac. Nutr.* 2022, 7509382. <https://doi.org/10.1155/2022/7509382>.
278. Comesaña, S., Velasco, C., Ceinos, R.M., López-Patiño, M.A., Míguez, J.M., Morais, S., and Soengas, J.L. (2018). Evidence for the presence in rainbow trout brain of amino acid-sensing systems involved in the control of food intake. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 314, R201–R215. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00283.2017>.
279. Chen, K., Zhang, Z., Li, J., Xie, S., Shi, L.-J., He, Y.-H., Liang, X.-F., Zhu, Q.-S., and He, S. (2021). Different regulation of branched-chain amino acid on food intake by TOR signaling in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*). *Aquaculture* 530, 735792. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735792>.
280. Cota, D., Proulx, K., Smith, K.A.B., Kozma, S.C., Thomas, G., Woods, S.C., and Seeley, R.J. (2006). Hypothalamic mTOR Signaling Regulates Food Intake. *Science* 312, 927–930. <https://doi.org/10.1126/science.1124147>.
281. Wang, Q., He, G., Mai, K., Xu, W., Zhou, H., Wang, X., and Mei, L. (2016). Chronic rapamycin treatment on the nutrient utilization and metabolism of juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Sci. Rep.* 6, 28068. <https://doi.org/10.1038/srep28068>.
282. Zou, J.-M., Zhu, Q.-S., Liang, H., Lu, H.-L., Liang, X.-F., and He, S. (2022). Lysine Deprivation Regulates Npy Expression via GCN2 Signaling Pathway in Mandarin Fish (*Siniperca chuatsi*). *Int. J. Mol. Sci.* 23, 6727. <https://doi.org/10.3390/ijms23126727>.
283. Maurin, A.-C., Benani, A., Lorsignol, A., Brenachot, X., Parry, L., Carraro, V., Guissard, C., Averous, J., Jousse, C., Bruhat, A., et al. (2014). Hypothalamic eIF2 α Signaling Regulates Food Intake. *Cell Rep.* 6, 438–444. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.01.006>.
284. Balasubramanian, M.N., Panserat, S., Dupont-Nivet, M., Quillet, E., Montfort, J., Le Cam, A., Médale, F., Kaushik, S.J., and Geurden, I. (2016). Molecular pathways associated with the nutritional programming of plant-based diet acceptance in rainbow trout following an early feeding exposure. *BMC Genomics* 17, 449. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2804-1>.
285. Callet, T., Dupont-Nivet, M., Cluzeaud, M., Jaffrezic, F., Laloë, D., Kerneis, T., Labbé, L., Quillet, E., Geurden, I., Mazurais, D., et al. (2018). Detection of new pathways involved in the acceptance and the utilisation of a plant-based diet in isogenic lines of rainbow trout fry. *PLOS ONE* 13, e0201462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201462>.

286. Glasauer, S.M.K., and Neuhauss, S.C.F. (2014). Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Mol. Genet. Genomics* 289, 1045–1060. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0889-2>.
287. Campbell, M.A., Hale, M.C., McKinney, G.J., Nichols, K.M., and Pearse, D.E. (2019). Long-Term Conservation of Ohnologs Through Partial Tetrasomy Following Whole-Genome Duplication in Salmonidae. *G3 GenesGenomesGenetics* 9, 2017–2028. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400070>.
288. Rico, E.P., de Oliveira, D.L., Rosemberg, D.B., Mussulini, B.H., Bonan, C.D., Dias, R.D., Wofchuk, S., Souza, D.O., and Bogo, M.R. (2010). Expression and functional analysis of Na(+)-dependent glutamate transporters from zebrafish brain. *Brain Res. Bull.* 81, 517–523. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.11.011>.
289. Cui, W.W., Low, S.E., Hirata, H., Saint-Amant, L., Geisler, R., Hume, R.I., and Kuwada, J.Y. (2005). The Zebrafish shocked Gene Encodes a Glycine Transporter and Is Essential for the Function of Early Neural Circuits in the CNS. *J. Neurosci.* 25, 6610–6620. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5009-04.2005>.
290. Mongeon, R., Gleason, M.R., Masino, M.A., Fetcho, J.R., Mandel, G., Brehm, P., and Dallman, J.E. (2008). Synaptic Homeostasis in a Zebrafish Glial Glycine Transporter Mutant. *J. Neurophysiol.* 100, 1716–1723. <https://doi.org/10.1152/jn.90596.2008>.
291. Kimura, Y., Okamura, Y., and Higashijima, S. (2006). *alx*, a Zebrafish Homolog of Chx10, Marks Ipsilateral Descending Excitatory Interneurons That Participate in the Regulation of Spinal Locomotor Circuits. *J. Neurosci.* 26, 5684–5697. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4993-05.2006>.
292. Gesemann, M., Lesslauer, A., Maurer, C.M., Schönthaler, H.B., and Neuhauss, S.C. (2010). Phylogenetic analysis of the vertebrate Excitatory/Neutral Amino Acid Transporter (SLC1/EAAT) family reveals lineage specific subfamilies. *BMC Evol. Biol.* 10, 117. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-117>.
293. Cheng, W., Guo, L., Zhang, Z., Soo, H.M., Wen, C., Wu, W., and Peng, J. (2006). HNF factors form a network to regulate liver-enriched genes in zebrafish. *Dev. Biol.* 294, 482–496. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.03.018>.
294. Ellingsen, S., Narawane, S., Fjose, A., Verri, T., and Rønnestad, I. (2020). Sequence analysis and spatiotemporal developmental distribution of the Cat-1-type transporter *slc7a1a* in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Physiol. Biochem.* 46, 2281–2298. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00873-x>.
295. Kozłowski, D.J., Chen, Z., Zhuang, L., Fei, Y.-J., Navarre, S., and Ganapathy, V. (2008). Molecular characterization and expression pattern of taurine transporter in zebrafish during embryogenesis. *Life Sci.* 82, 1004–1011. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2008.02.015>.
296. Ellingsen, S., Narawane, S., Fjose, A., Verri, T., and Rønnestad, I. (2021). The zebrafish cationic amino acid transporter/glycoprotein-associated family: sequence and spatiotemporal distribution during development of the transport system b0,+ (*slc3a1/slc7a9*). *Fish Physiol. Biochem.* 47, 1507–1525. <https://doi.org/10.1007/s10695-021-00984-z>.

297. Demy, D.L., Carrère, M., Noche, R., Tauzin, M., Le Bris, M., Baek, C., Leshchiner, I., Goessling, W., and Herbomel, P. (2020). The cationic amino acid exporter Slc7a7 is induced and vital in zebrafish tissue macrophages with sustained efferocytic activity. *J. Cell Sci.* *133*, jcs249037. <https://doi.org/10.1242/jcs.249037>.
298. Sekine, Y., Nishibori, Y., Akimoto, Y., Kudo, A., Ito, N., Fukuhara, D., Kurayama, R., Higashihara, E., Babu, E., Kanai, Y., et al. (2009). Amino Acid Transporter LAT3 Is Required for Podocyte Development and Function. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *20*, 1586–1596. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008070809>.
299. Asaoka, Y., Nagai, Y., Namae, M., Furutani-Seiki, M., and Nishina, H. (2016). SLC7 family transporters control the establishment of left-right asymmetry during organogenesis in medaka by activating mTOR signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *474*, 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.04.087>.
300. Guernsey, D.L., Jiang, H., Campagna, D.R., Evans, S.C., Ferguson, M., Kellogg, M.D., Lachance, M., Matsuoka, M., Nightingale, M., Rideout, A., et al. (2009). Mutations in mitochondrial carrier family gene SLC25A38 cause nonsyndromic autosomal recessive congenital sideroblastic anemia. *Nat. Genet.* *41*, 651–653. <https://doi.org/10.1038/ng.359>.
301. Tian, J., He, G., Mai, K., and Liu, C. (2015). Effects of postprandial starvation on mRNA expression of endocrine-, amino acid and peptide transporter-, and metabolic enzyme-related genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Physiol. Biochem.* *41*, 773–787. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0045-x>.
302. To, V.P.T.H., Masagounder, K., and Loewen, M.E. (2019). SLC transporters ASCT2, B0 AT1-like, y+LAT1, and LAT4-like associate with methionine electrogenic and radio-isotope flux kinetics in rainbow trout intestine. *Physiol. Rep.* *7*, e14274. <https://doi.org/10.14814/phy2.14274>.
303. Rimoldi, S., Bossi, E., Harpaz, S., Cattaneo, A.G., Bernardini, G., Saroglia, M., and Terova, G. (2015). Intestinal BOAT1 (SLC6A19) and PEPT1 (SLC15A1) mRNA levels in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) reared in fresh water and fed fish and plant protein sources. *J. Nutr. Sci.* *4*, e21. <https://doi.org/10.1017/jns.2015.9>.
304. Orozco, Z.G.A., Soma, S., Kaneko, T., and Watanabe, S. (2018). Spatial mRNA Expression and Response to Fasting and Refeeding of Neutral Amino Acid Transporters slc6a18 and slc6a19a in the Intestinal Epithelium of Mozambique tilapia. *Front. Physiol.* *9*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00212>.
305. Nitzan, T., Rozenberg, P., and Cnaani, A. (2017). Differential expression of amino-acid transporters along the intestine of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and the effect of water salinity and time after feeding. *Aquaculture* *472*, 71–75. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.01.020>.
306. Takeuchi, K., Toyohara, H., Kinoshita, M., and Sakaguchi, M. (2000). Ubiquitous increase in taurine transporter mRNA in tissues of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during high-salinity adaptation. *Fish Physiol. Biochem.* *23*, 173–182. <https://doi.org/10.1023/A:1007889725718>.
307. Xu, D., He, G., Mai, K., Zhou, H., Xu, W., and Song, F. (2016). Expression pattern of peptide and amino acid genes in digestive tract of transporter juvenile turbot (*Scophthalmus maximus L.*). *J. Ocean Univ. China* *15*, 334–340. <https://doi.org/10.1007/s11802-016-2768-4>.

308. Yang, J., Tan, Q., Zhu, W., Chen, C., Liang, X., and Pan, L. (2014). Cloning and molecular characterization of cationic amino acid transporter γ -LAT1 in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Fish Physiol. Biochem.* *40*, 93–104. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9827-1>.
309. Wu, P., Li, Y., Cheng, J., Chen, L., Zeng, M., Wu, Y., Wang, J., Zhang, J., and Chu, W. (2016). Transcriptome Analysis and Postprandial Expression of Amino Acid Transporter Genes in the Fast Muscles and Gut of Chinese Perch (*Siniperca chuatsi*). *PLOS ONE* *11*, e0159533. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159533>.
310. Brezas, A., Kumar, V., Overturf, K., and Hardy, R.W. (2021). Dietary amino acid supplementation affects temporal expression of amino acid transporters and metabolic genes in selected and commercial strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* *255*, 110589. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2021.110589>.
311. Zhang, Y.-L., Duan, X.-D., Jiang, W.-D., Feng, L., Wu, P., Liu, Y., Jiang, J., Kuang, S.-Y., Tang, L., Tang, W.-N., et al. (2019). Soybean glycinin decreased growth performance, impaired intestinal health, and amino acid absorption capacity of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish Physiol. Biochem.* *45*, 1589–1602. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00648-z>.
312. Wei, Y., Liang, M., and Xu, H. (2020). Fish protein hydrolysate affected amino acid absorption and related gene expressions of IGF-1/AKT pathways in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquac. Nutr.* *26*, 145–155. <https://doi.org/10.1111/anu.12976>.
313. Comesaña, S., Lai, F., Olderbakk Jordal, A.-E., Verri, T., Espe, M., Soengas, J.L., and Rønnestad, I. (2021). Amino Acid Carriers of the Solute Carrier Families 7 (SLC7) and 38 (SLC38) Are Involved in Leucine Sensing in the Brain of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Front. Mar. Sci.* *8*. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.711508>.
314. Verri, T., Terova, G., Romano, A., Barca, A., Pisani, P., Storelli, C., and Saroglia, M. (2012). The SoLute Carrier (SLC) Family Series in Teleost Fish. In *Functional Genomics in Aquaculture*, M. Saroglia and Z. J. Liu, eds. (Wiley-Blackwell), pp. 219–320. <https://doi.org/10.1002/9781118350041.ch10>.
315. Margheritis, E., Imperiali, F.G., Cinquetti, R., Vollero, A., Terova, G., Rimoldi, S., Girardello, R., and Bossi, E. (2016). Amino acid transporter B0AT1 (slc6a19) and ancillary protein: impact on function. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* *468*, 1363–1374. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1842-5>.
316. McKeown, K.A., Moreno, R., Hall, V.L., Ribera, A.B., and Downes, G.B. (2012). Disruption of Eaat2b, a glutamate transporter, results in abnormal motor behaviors in developing zebrafish. *Dev. Biol.* *362*, 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.11.001>.
317. Cellosaurus query rainbow trout <https://www.cellosaurus.org/search?query=rainbow+trout>.
318. Deval, C., Chaveroux, C., Maurin, A.-C., Cherasse, Y., Parry, L., Carraro, V., Milenkovic, D., Ferrara, M., Bruhat, A., Jousse, C., et al. (2009). Amino acid limitation regulates the expression of genes involved in several specific biological processes through GCN2-dependent and GCN2-independent pathways. *FEBS J.* *276*, 707–718. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06818.x>.

319. Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., et al. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* *11*, 619–633. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00105-9](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00105-9).
320. Yerbes, R., Mora-Molina, R., Fernández-Farrán, F.J., Hiraldo, L., López-Rivas, A., and Palacios, C. (2022). Limiting glutamine utilization activates a GCN2/TRAIL-R2/Caspase-8 apoptotic pathway in glutamine-addicted tumor cells. *Cell Death Dis.* *13*, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05346-y>.
321. Bols, N.C., Ganassin, R.C., Tom, D.J., and Lee, L.E. (1994). Growth of fish cell lines in glutamine-free media. *Cytotechnology* *16*, 159–166. <https://doi.org/10.1007/BF00749903>.
322. Jin, H.-O., Hong, S.-E., Kim, J.-Y., Jang, S.-K., and Park, I.-C. (2021). Amino acid deprivation induces AKT activation by inducing GCN2/ATF4/REDD1 axis. *Cell Death Dis.* *12*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04417-w>.
323. Chen, R., Zou, Y., Mao, D., Sun, D., Gao, G., Shi, J., Liu, X., Zhu, C., Yang, M., Ye, W., et al. (2014). The general amino acid control pathway regulates mTOR and autophagy during serum/glutamine starvation. *J. Cell Biol.* *206*, 173–182. <https://doi.org/10.1083/jcb.201403009>.
324. Hyatt, S.L., Aulak, K.S., Malandro, M., Kilberg, M.S., and Hatzoglou, M. (1997). Adaptive regulation of the cationic amino acid transporter-1 (Cat-1) in Fao cells. *J. Biol. Chem.* *272*, 19951–19957. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.32.19951>.
325. Lee, D.Y., Yun, S.H., Lee, S.Y., Lee, J., Jr Mariano, E., Joo, S.-T., Choi, I., Choi, J.S., Kim, G.-D., Lee, J., et al. (2023). Analysis of commercial fetal bovine serum (FBS) and its substitutes in the development of cultured meat. *Food Res. Int. Ott. Ont* *174*, 113617. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113617>.
326. Zheng, X., Baker, H., Hancock, W.S., Fawaz, F., McCaman, M., and Pungor Jr., E. (2006). Proteomic Analysis for the Assessment of Different Lots of Fetal Bovine Serum as a Raw Material for Cell Culture. Part IV. Application of Proteomics to the Manufacture of Biological Drugs. *Biotechnol. Prog.* *22*, 1294–1300. <https://doi.org/10.1021/bp060121o>.
327. GU, S., LANGLAIS, P., LIU, F., and JIANG, J.X. (2003). Mouse system-N amino acid transporter, mNAT3, expressed in hepatocytes and regulated by insulin-activated and phosphoinositide 3-kinase-dependent signalling. *Biochem. J.* *371*, 721–731. <https://doi.org/10.1042/bj20030049>.
328. Iroegbu, J.D., Ijomone, O.K., Femi-Akinlosotu, O.M., and Ijomone, O.M. (2021). ERK/MAPK signalling in the developing brain: Perturbations and consequences. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *131*, 792–805. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.10.009>.
329. Kurtzeborn, K., Kwon, H.N., and Kuure, S. (2019). MAPK/ERK Signaling in Regulation of Renal Differentiation. *Int. J. Mol. Sci.* *20*, 1779. <https://doi.org/10.3390/ijms20071779>.
330. Eblen, S.T. (2018). Extracellular-Regulated Kinases: Signaling From Ras to ERK Substrates to Control Biological Outcomes. *Adv. Cancer Res.* *138*, 99–142. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2018.02.004>.

331. Guo, Y.-J., Pan, W.-W., Liu, S.-B., Shen, Z.-F., Xu, Y., and Hu, L.-L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp. Ther. Med.* *19*, 1997–2007. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>.
332. Franchi-Gazzola, R., Visigalli, R., Bussolati, O., Dall'Asta, V., and Gazzola, G.C. (1999). Adaptive increase of amino acid transport system A requires ERK1/2 activation. *J. Biol. Chem.* *274*, 28922–28928. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.41.28922>.
333. Han, X., and Chesney, R.W. (2003). Regulation of taurine transporter gene (TauT) by WT1. *FEBS Lett.* *540*, 71–76. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00227-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00227-8).
334. Corallini, S., Taranta, A., Bellomo, F., Palma, A., Pastore, A., and Emma, F. (2011). Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of the CTNS Gene. *Pediatr. Res.* *70*, 130–135. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3182200187>.
335. Bruhat, A., Chérasse, Y., Chaveroux, C., Maurin, A.-C., Jousse, C., and Fafournoux, P. (2009). Amino acids as regulators of gene expression in mammals: molecular mechanisms. *BioFactors Oxf. Engl.* *35*, 249–257. <https://doi.org/10.1002/biof.40>.
336. Gu, S., Villegas, C.J., and Jiang, J.X. (2005). Differential regulation of amino acid transporter SNAT3 by insulin in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* *280*, 26055–26062. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504401200>.
337. Jeung, Y.-J., Lee, K., Lee, H.J., Kim, E., Son, M.J., Ahn, J., Kim, H.-G., Kim, W., Lee, H.-J., Kim, J.M., et al. (2019). Cationic amino acid transporter PQLC2 is a potential therapeutic target in gastric cancer. *Cancer Sci.* *110*, 1453–1463. <https://doi.org/10.1111/cas.13966>.
338. You, S., Han, X., Xu, Y., Sui, L., Song, K., and Yao, Q. (2024). High expression of SLC7A1 in high-grade serous ovarian cancer promotes tumor progression and is involved in MAPK/ERK pathway and EMT. *Cancer Med.* *13*, e7217. <https://doi.org/10.1002/cam4.7217>.
339. Roos, S., Lagerlöf, O., Wennergren, M., Powell, T.L., and Jansson, T. (2009). Regulation of amino acid transporters by glucose and growth factors in cultured primary human trophoblast cells is mediated by mTOR signaling. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* *297*, C723–C731. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00191.2009>.
340. Casimir, M., Lasorsa, F.M., Rubi, B., Caille, D., Palmieri, F., Meda, P., and Maechler, P. (2009). Mitochondrial Glutamate Carrier GC1 as a Newly Identified Player in the Control of Glucose-stimulated Insulin Secretion. *J. Biol. Chem.* *284*, 25004–25014. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.015495>.
341. Li, Q., Li, Z., Luo, T., and Shi, H. (2022). Targeting the PI3K/AKT/mTOR and RAF/MEK/ERK pathways for cancer therapy. *Mol. Biomed.* *3*, 47. <https://doi.org/10.1186/s43556-022-00110-2>.
342. Magnuson, M.A., Andreone, T.L., Printz, R.L., Koch, S., and Granner, D.K. (1989). Rat glucokinase gene: structure and regulation by insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 4838–4842. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.13.4838>.
343. Castillo, J., Codina, M., Martínez, M.L., Navarro, I., and Gutiérrez, J. (2004). Metabolic and mitogenic effects of IGF-I and insulin on muscle cells of rainbow trout. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* *286*, R935–R941. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00459.2003>.

344. Peng, T., Golub, T.R., and Sabatini, D.M. (2002). The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 5575–5584. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.15.5575-5584.2002>.
345. Karpinski, B.A., Morle, G.D., Huggenvik, J., Uhler, M.D., and Leiden, J.M. (1992). Molecular cloning of human CREB-2: an ATF/CREB transcription factor that can negatively regulate transcription from the cAMP response element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 4820–4824.
346. Gachon, F., Gaudray, G., Thébault, S., Basbous, J., Koffi, J.A., Devaux, C., and Mesnard, J. (2001). The cAMP response element binding protein-2 (CREB-2) can interact with the C/EBP-homologous protein (CHOP). *FEBS Lett.* *502*, 57–62. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02646-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02646-1).
347. Su, N., and Kilberg, M.S. (2008). C/EBP Homology Protein (CHOP) Interacts with Activating Transcription Factor 4 (ATF4) and Negatively Regulates the Stress-dependent Induction of the Asparagine Synthetase Gene. *J. Biol. Chem.* *283*, 35106–35117. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806874200>.
348. Torrence, M.E., MacArthur, M.R., Hosios, A.M., Valvezan, A.J., Asara, J.M., Mitchell, J.R., and Manning, B.D. (2021). The mTORC1-mediated activation of ATF4 promotes protein and glutathione synthesis downstream of growth signals. *eLife* *10*, e63326. <https://doi.org/10.7554/eLife.63326>.
349. Marandel, L., Seiliez, I., Véron, V., Skiba-Cassy, S., and Panserat, S. (2015). New insights into the nutritional regulation of gluconeogenesis in carnivorous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a gene duplication trail. *Physiol. Genomics* *47*, 253–263. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00026.2015>.
350. Vélez, E.J., Schnebert, S., Goguet, M., Balbuena-Pecino, S., Dias, K., Beauclair, L., Fontagné-Dicharry, S., Véron, V., Depincé, A., Beaumatin, F., et al. (2024). Chaperone-mediated autophagy protects against hyperglycemic stress. *Autophagy* *20*, 752–768. <https://doi.org/10.1080/15548627.2023.2267415>.
351. Rizwan, H., Pal, S., Sabnam, S., and Pal, A. (2020). High glucose augments ROS generation regulates mitochondrial dysfunction and apoptosis via stress signalling cascades in keratinocytes. *Life Sci.* *241*, 117148. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117148>.
352. Wang, J., Onogi, Y., Krueger, M., Oeckl, J., Karlina, R., Singh, I., Hauck, S.M., Feederle, R., Li, Y., and Ussar, S. (2022). PAT2 regulates vATPase assembly and lysosomal acidification in brown adipocytes. *Mol. Metab.* *61*, 101508. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101508>.
353. Cubelos, B., González-González, I.M., Giménez, C., and Zafra, F. (2005). Amino acid transporter SNAT5 localizes to glial cells in the rat brain. *Glia* *49*, 230–244. <https://doi.org/10.1002/glia.20106>.
354. Alfaqih, M.A., Steele, C.A., Morris, R.T., and Thorgaard, G.H. (2009). Comparative genome mapping reveals evidence of gene conversion between *Sox9* paralogs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* *4*, 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2009.01.003>.

355. Parey, E., Louis, A., Cabau, C., Guiguen, Y., Roest Crolius, H., and Berthelot, C. (2020). Synteny-Guided Resolution of Gene Trees Clarifies the Functional Impact of Whole-Genome Duplications. *Mol. Biol. Evol.* *37*, 3324–3337. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa149>.
356. Appuhamy, J.A.D.R.N., Knoebel, N.A., Nayananjalie, W.A.D., Escobar, J., and Hanigan, M.D. (2012). Isoleucine and Leucine Independently Regulate mTOR Signaling and Protein Synthesis in MAC-T Cells and Bovine Mammary Tissue Slices^{1,2}. *J. Nutr.* *142*, 484–491. <https://doi.org/10.3945/jn.111.152595>.
357. Hao, Q., Wang, Z., Wang, L., Han, M., Zhang, M., and Gao, X. (2023). Isoleucine stimulates mTOR and SREBP-1c gene expression for milk synthesis in mammary epithelial cells through BRG1-mediated chromatin remodelling. *Br. J. Nutr.* *129*, 553–563. <https://doi.org/10.1017/S0007114522001544>.
358. Dyachok, J., Earnest, S., Iturraran, E.N., Cobb, M.H., and Ross, E.M. (2016). Amino Acids Regulate mTORC1 by an Obligate Two-step Mechanism. *J. Biol. Chem.* *291*, 22414–22426. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.732511>.
359. Saxton, R.A., Knockenhauer, K.E., Wolfson, R.L., Chantranupong, L., Pacold, M.E., Wang, T., Schwartz, T.U., and Sabatini, D.M. (2016). Structural basis for leucine sensing by the Sestrin2-mTORC1 pathway. *Science* *351*, 53–58. <https://doi.org/10.1126/science.aad2087>.
360. DeMarco, A.G., and Hall, M.C. (2023). Phosphoproteomic Approaches for Identifying Phosphatase and Kinase Substrates. *Mol. Basel Switz.* *28*, 3675. <https://doi.org/10.3390/molecules28093675>.
361. Bagdonaite, I., Malaker, S.A., Polasky, D.A., Riley, N.M., Schjoldager, K., Vakhrushev, S.Y., Halim, A., Aoki-Kinoshita, K.F., Nesvizhskii, A.I., Bertozzi, C.R., et al. (2022). Glycoproteomics. *Nat. Rev. Methods Primer* *2*, 1–29. <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00128-4>.
362. Trulsson, F., and Vertegaal, A.C.O. (2022). Site-specific proteomic strategies to identify ubiquitin and SUMO modifications: Challenges and opportunities. *Semin. Cell Dev. Biol.* *132*, 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.11.006>.

COMMUNICATIONS

Métaboday

« Nutritional-induced Amino Acid Transporters dysregulations in rainbow trout: The butterfly effect on global amino acid homeostasis »

09/05/2023 – Bordeaux – FRANCE

Soizig LE GARREC, Iban SEILIEZ, Florian BEAUMATIN

European Aquaculture Society

«Nutritional-induced Amino Acid Transporters dysregulations in rainbow trout: The butterfly effect on global amino acid homeostasis»

21/09/2023 – Vienne – AUTRICHE

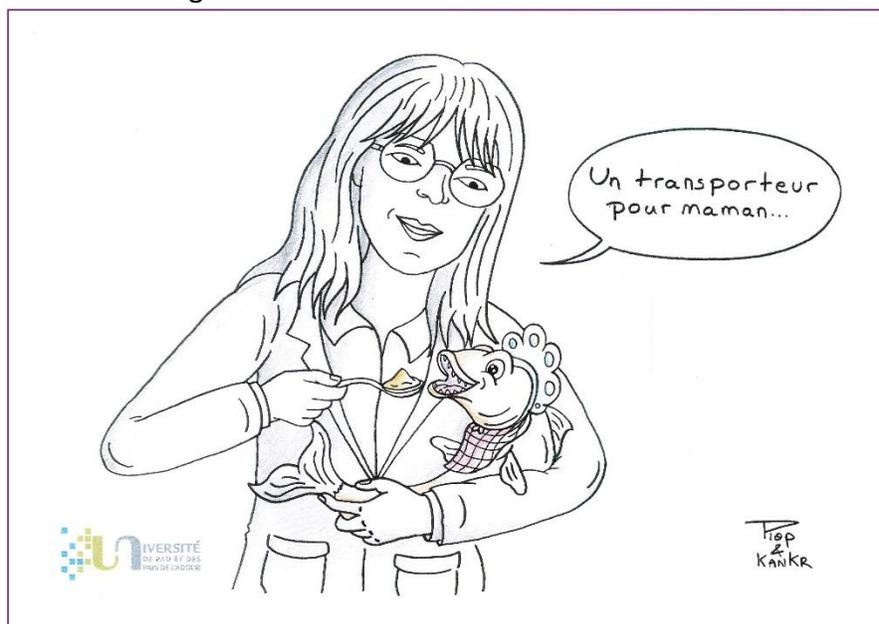
Soizig Le Garrec, Karine Pinel, Guillaume Morin, Cécile Heraud, Akintha Ganot, Iban Seiliez & Florian Beaumatin

Ma Thèse en 180 secondes

« Etude des Transporteurs d'Acides Aminés chez la Truite arc-en-ciel »

03/2023

Sélection locale et régionale



RESUME

Les **Acides Aminés (AA)** sont des nutriments essentiels au fonctionnement cellulaire par leur participation à la synthèse des protéines et leur implication dans de nombreuses voies métaboliques. Les AA constituent également des **molécules signales** qui, selon leur disponibilité, participeront au contrôle de l'homéostasie cellulaire. Pour entrer dans la cellule et accomplir ces fonctions, les AA sont dépendants de **Transporteurs d'Acides Aminés (TAA)**, au nombre de 75 chez les mammifères. Ces protéines transmembranaires constituent l'une des familles de protéines les moins caractérisées, notamment en raison de son apparente complexité : diversité des propriétés de transport, de substrats, de localisations cellulaires, etc. Cependant, la recherche médicale démontre que les dérégulations des TAA sont associées à de nombreuses pathologies, illustrant leurs rôles fondamentaux pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. Bien que l'étude des fonctions des TAA dans le domaine médical soit bien établi, la complexité entourant ces protéines induit de plus faibles caractérisations chez d'autres modèles d'études et pour d'autres problématiques, par exemple dans le cadre de la nutrition des animaux d'élevage. Cette thèse s'inscrit dans un **contexte aquacole**, où la filière nécessite aujourd'hui de nouveaux niveaux de compréhension de l'alimentation des espèces élevées pour la formulation de régimes alimentaires durables. La **Truite Arc-en-Ciel (TAC)**, première espèce de poisson produite en France est, elle aussi, concernée. De manière à mieux comprendre chez cette espèce les mécanismes régissant l'homéostasie des AA, nutriments essentiels à son métabolisme, **l'objectif de cette thèse était de caractériser tous les TAA chez la TAC : de leur identification *in silico* à l'étude de leurs régulations transcriptionnelles par les conditions nutritives**. En s'appuyant sur un modèle *in vitro*, les lignées cellulaires, nous avons démontré que l'expression des TAA était fortement dépendante de la disponibilité en nutriments ; leurs dérégulations impactant directement le pool intracellulaire d'AA et les voies signalétiques associées comme **mTORC1**, régulateur majeur de l'anabolisme cellulaire. L'intégration des régulations des TAA par les conditions nutritives a permis l'identification de trois grands groupes de régulation, dont un fortement dépendant de la présence d'AA par des régulations dépendantes de **GCN2**, voie signalétique répondant à la carence en AA et surexprimant plusieurs TAA. L'existence de tels groupes de régulation a également été validée *in vivo*. En associant la régulation des TAA et leurs effets sur le pool intracellulaire d'AA à de la modélisation mathématique, nous avons également proposé un modèle général des flux d'AA à travers trois grands groupes de TAA aux activités de transport potentiellement distinctes. **Cette étude a permis de proposer une nouvelle méthode d'analyse des TAA**, globale, relativement aisée à mettre en œuvre et transposable à de nombreuses espèces pour divers contextes scientifiques. Enfin, cette étude démontre également des **spécificités de régulation de l'homéostasie cellulaire par les AA chez la TAC**, pointant sur de potentiels AA non conventionnels à l'activation de ces voies signalétiques, ce qui questionne sur l'apport en AA fonctionnellement essentiels idéal à la physiologie de la TAC et à sa croissance.

ABSTRACT

Amino Acids (AA) are essential nutrients for cell function, participating in protein synthesis and many metabolic pathways. They are also important **signalling molecules**, which, depending on their availability, contribute to the control of cellular homeostasis. To enter into the cell and perform these functions, AA are dependent on **Amino Acid Transporters (AAT)**, numbering 75 in mammals. These transmembrane proteins are one of the least characterized protein families, notably due to its apparent complexity: multiple transport properties, substrates, cellular localizations, etc. However, medical research demonstrates that AAT dysregulations are associated with numerous pathologies, illustrating their fundamental role in maintaining cellular homeostasis. While the study of AAT functions in the medical field seems well established, AAT complexity tends to lead to weaker characterizations in other study models and other research areas, notably in the context of farm animal nutrition. This thesis is part of an **aquaculture context**, where the industry is now demanding new insights into the feeding of farmed species to formulate sustainable diets. The **Rainbow Trout (RT)**, first fish species produced in France, is also concerned. In order to better understand the mechanisms governing AA homeostasis, key nutrients in RT metabolism, **the aim of this thesis was to characterize all AAT in this species: from their *in silico* identification in RT genome to the study of their transcriptional regulation by nutritional conditions**. By using an *in vitro* model, RT cell lines, we demonstrated that AAT expression was highly dependent on nutrient availability, their dysregulations directly affecting the intracellular AA pool and associated signalling pathways such as **mTORC1**, a major regulator of cellular anabolism. Integrating AAT regulations by nutritional conditions led to the identification of three major regulatory clusters, one of which being highly dependent on AA availability through **GCN2**-dependent regulations, a signalling pathway responding to AA deficiency and overexpressing several AAT. Evidences of such regulatory groups was also brought *in vivo*. By combining AAT regulations and their effects on the intracellular AA pools with mathematical modelling, we have also proposed a general model of AA flux through three major groups of AAT with potentially distinct transport activities. **This study has enabled us to propose a new method for AAT analysis**, that is global, relatively easy to implement and transposable to numerous species for various scientific contexts. Finally, this study also demonstrates the **distinctive regulation of cellular homeostasis by specific AA in RT**, pointing to potential unconventional AA for activation of these signalling pathways. This raises questions about the ideal supply of functionally essential AA for RT physiology and growth.

