



**HAL**  
open science

**MECANISMES D'ABSORPTION DES ACIDES  
AMINES CATIONIQUES ET LEURS  
CONSEQUENCES METABOLIQUES CHEZ LA  
TRUITE ARC-EN-CIEL (Oncorhynchus mykiss**

Guillaume Morin

► **To cite this version:**

Guillaume Morin. MECANISMES D'ABSORPTION DES ACIDES AMINES CATIONIQUES ET LEURS CONSEQUENCES METABOLIQUES CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL (Oncorhynchus mykiss. Biologie moléculaire. Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2021. Français. NNT : 2021PAUU3044 . tel-04868246

**HAL Id: tel-04868246**

**<https://theses.hal.science/tel-04868246v1>**

Submitted on 6 Jan 2025

**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

UNIVERSITE DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR

Ecole doctorale 211 - Sciences exactes et leurs applications

Présentée et soutenue le 2 décembre 2021

pour obtenir le grade de docteur de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour

Spécialité : Aspects cellulaires et moléculaires de la biologie

## MECANISMES D'ABSORPTION DES ACIDES AMINES CATIONIQUES ET LEURS CONSEQUENCES METABOLIQUES CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL (*Oncorhynchus mykiss*)

### MEMBRES DU JURY

#### RAPPORTEURS

Sophie Tesseraud  
Alain Bruhat

Directeur de Recherche INRAE  
Directeur de Recherche INRAE

#### EXAMINATEURS

Sandrine Skiba-Cassy  
Bertrand Collet

Directeur de Recherche INRAE  
Directeur de Recherche INRAE

#### DIRECTEURS

Florian Beaumatin  
Iban Seilliez

Enseignant chercheur contractuel E2S/UPPA  
Directeur de Recherche INRAE



# Remerciements

Je voudrais en premier lieu remercier les membres de mon jury de thèse Alain Bruhat, Sophie Tesseraud, Bertrand Collet et Sandrine Skiba-Cassy d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à mon directeur de thèse Florian Beaumatin pour sa bienveillance, sa patience, son optimisme et son exigence pendant ces 3 années de thèse qui m'ont permis de grandir scientifiquement. J'ai vraiment apprécié de travailler avec toi pendant ces 3 années de thèse qui ont été très enrichissantes et formatrices.

Je voudrais également remercier Iban Seilliez, mon autre directeur de thèse qui a toujours répondu présent pour discuter de mon projet de thèse et m'apporter des éclaircissements. Je garderai un bon souvenir de nos réunions avec Florian dont les débats m'ont souvent fait sourire.

Ces 3 années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans Karine Pinel qui a non seulement énormément contribué à ma formation technique et scientifique mais qui a également été d'un grand soutien moral tout au long de la thèse.

Je voudrais également remercier Sergio Polakof et encore Sandrine pour leur conseils et remarques lors de mes deux comités de thèse.

Je voudrais également remercier l'ensemble des membres de NuMÉA et plus largement de l'aquapôle de Saint-Pée-sur-Nivelle avec qui j'ai passées 3 excellentes années.

Quelles auraient été ces 3 années sans les rencontres avec les autres étudiants, post-docs et autres avec qui j'ai passé de très bon moments, Lokesh, Pauline, Espoir, Karine, Alex, Emilio, Yhou, Jing-Wei, Sarah et bien sûr les coquins, Jay-Z, Lucien et Michaël.

Michaël avec qui j'ai énormément ri et partagé pendant mes deux dernières années de thèse et qui arrive à me supporter tant bien que mal malgré mes suggestions musicales très spéciales.

Un grand merci également à mes amis de Brest (n'est-ce pas ?!), Yann, Jérémy, Tanguy et Anne dont l'humour me fait toujours rire malgré la distance.

Finalement, je voudrais remercier ma famille, les bigorneaux, Alexandre, Eloïse et surtout mes parents pour leur soutien et leur investissement durant toutes ces années sans qui je n'écrirais pas ces mots aujourd'hui.



## Table des matières

INTRODUCTION .....	10
Partie I : L'aquaculture des salmonidés .....	12
A- L'aquaculture dans le monde et son histoire .....	12
a. Origines et histoire de l'aquaculture .....	12
b. L'aquaculture dans le monde .....	16
c. La truite arc-en-ciel : une espèce modèle en nutrition .....	18
B- Le remplacement des farines et huiles de poisson .....	23
a. Une production durable ?.....	23
b. Les différentes alternatives .....	24
c. Effet des aliments végétaux sur la physiologie des truites .....	26
d. Les inconvénients des aliments végétaux .....	27
Partie II : Le transport d'acides aminés cationiques .....	32
A- Les transporteurs d'acides aminés .....	32
a. La famille des SLC.....	32
b. Les différents systèmes de transport .....	33
c. Les transporteurs d'acides aminés .....	37
B- Les transporteurs d'acides aminés cationiques (TAACs) .....	41
a. Les CATs .....	42
b. Les échangeurs hétérodimériques d'acides aminés cationiques ( $\gamma^+$ LATs).....	45
c. Les autres transporteurs d'acides aminés cationiques .....	48
C- Rôles physiologiques et régulations des TAACs .....	54
a. Rôles physiologiques .....	54
b. Régulation de l'expression des TAAC .....	59
D- Données chez les poissons .....	63
Partie III : Les voies de signalisation cellulaire régulées par les acides aminés .....	66
A- La voie GCN2.....	66
a. Activation de la voie GCN2 et arrêt de la traduction .....	66
b. Régulation de la transcription par ATF4 .....	71
c. Rôle physiologiques de GCN2.....	78
d. La voie GCN2 chez les poissons .....	79

B-	La voie mTOR .....	80
a.	Les deux complexes de mTOR .....	80
b.	Rôles cellulaires .....	82
c.	Régulations de la voie mTOR .....	85
d.	Régulations de mTOR chez la truite .....	93
C-	La macro-autophagie .....	96
a.	Mécanismes de la macro-autophagie .....	96
b.	Rôles physiologiques de l'autophagie .....	101
c.	Régulations de l'autophagie par les acides aminés.....	101
d.	La macro-autophagie chez la truite.....	105
	Hypothèses et objectifs de la thèse .....	106
	Hypothèses de travail.....	106
	Approche du projet .....	108
	Principaux objectifs .....	109
	Enjeux de l'étude.....	110
	Résultats.....	112
	Premier article : La lignée cellulaire RTH-149, un outil pertinent pour décrypter les mécanismes moléculaires relatifs à la nutrition des poissons.....	116
	Second article : Les lignées cellulaires de truite, un modèle pertinent pour l'étude des régulations nutritionnelles : Focus sur les transporteurs d'acides aminés cationiques, les voies mTOR et GCN2 .....	136
	Discussion.....	168
A-	Les lignées cellulaires de truites un nouveau modèle d'étude pour la nutrition des poissons.....	170
a.	Conservation de la signalisation des acides aminés dans les lignées cellulaires de truite.....	170
b.	Activation de mTOR par les acides aminés différente des modèles mammifères..	172
B-	Expression des TAACs chez la truite .....	176
a.	De nombreux paralogues des TAACS exprimés chez la truite.....	176
b.	Expressions dans les lignées cellulaires de truite.....	177
C-	La carence en AA induit la surexpression de TAACs.....	179
a.	Expression des TAACs par la carence en acides aminés.....	179
b.	Surexpression par la voie GCN2 .....	180
D-	L'arginine, un acide aminé essentiel ?.....	182

a. Effets étonnants sur la prolifération cellulaire.....	182
Conclusion générale.....	184
La supplémentation d'acides aminés cationiques libres .....	184
Utilisation du modèle lignées cellulaires .....	188
Bibliographie .....	190



## Liste des tableaux

Tableau 1. Espèces de poissons les plus produites en aquaculture dans le monde .....	17
Tableau 2. Besoins nutritionnels en protéines brutes et acides aminés essentiels de la truite arc-en-ciel en phase de grossissement .....	22
Tableau 3. Niveaux d'acides aminés essentiels dans les farines de poissons et matières premières végétales .....	29
Tableau 4. Les différents systèmes et transporteurs correspondant .....	38
Tableau 5. Caractéristiques des transporteurs de la sous-famille des CATs .....	42
Tableau 6. Caractéristiques des transporteurs hétérodimériques d'AAC .....	45
Tableau 7. Caractéristiques des autres transporteurs d'acides aminés cationiques.....	49

## Liste des figures

Figure 1. Faits marquants de l'Histoire de l'aquaculture .....	13
Figure 2. Production halieutique et aquacole mondiale (FAO, 2020).....	14
Figure 3. Evolutions de la population et de la consommation de poisson mondiales .....	15
Figure 4. Les différents types de transporteurs transmembranaires appartenant à la superfamille des SLC (SoLute Carrier) .....	32
Figure 5. Mécanisme de transport théorique des uniporteurs .....	34
Figure 6. Mécanismes de transport actif primaire, secondaire et tertiaire.....	35
Figure 7. Affinité et capacité des transporteurs membranaires répondent à l'équation de Michaelis-Menten .....	36
Figure 8. Transporteurs d'acides aminés impliqués dans l'absorption intestinale.....	40
Figure 9. Echange des acides aminés cationiques contre les acides aminés neutres par les $\gamma$ -LATs.....	47
Figure 10. Mécanisme de transport de rBAT/ b <sup>0,+</sup> AT .....	48
Figure 11. Absorption Na <sup>+</sup> et Cl <sup>-</sup> dépendante d'AA neutres et cationiques par ATB <sub>0,+</sub> .....	50
Figure 12. Absorption Na <sup>+</sup> indépendante des AA cationiques (A) et Na <sup>+</sup> dépendante des AA neutres (B) par SNAT4 .....	51
Figure 13. Transport mitochondrial des acides aminés cationiques par ORNT1, ORNT2 et ORNT3.....	52
Figure 14. Réduction de la croissance chez la souris induite par la délétion de CAT1 et SLC7A7 .....	54
Figure 15. Rôle du transporteur CAT2-B dans l'activation des macrophages M1 et M2.....	55
Figure 16. Transport des acides aminés à travers les entérocytes .....	57
Figure 17. Transport des acides aminés cationiques à travers les entérocytes. ....	58
Figure 18. Initiations de la traduction coiffe dépendante (A) et par l'IRES (B) .....	61
Figure 19. La réponse intégrée au stress dans son ensemble .....	67
Figure 20. Activation de GCN2 par la carence en acides aminés .....	68
Figure 21. Activation de la voie GCN2 par l'halofuginone .....	69
Figure 22. Inhibition de la traduction coiffe-dépendante par la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ .....	70

Figure 23. Traduction d'ATF4 en condition de stress.....	72
Figure 24. Fixation d'ATF4 sur les sites CARE dans les promoteurs de ses gènes cibles .....	73
Figure 25. Mécanismes de rétrocontrôle de la voie eIF2 $\alpha$ /ATF4.....	76
Figure 26. Structure des complexes mTORC1 et mTORC2.....	80
Figure 27. Rôles principaux de mTORC1 .....	82
Figure 28. Régulation de la synthèse protéique par mTORC1 .....	83
Figure 29. Activation de mTORC1 par l'insuline et les facteurs de croissance .....	85
Figure 30. Régulations de l'ancrage de mTORC1 à la membrane lysosomale par les acides aminés .....	87
Figure 31. Potentiel rôle de PQLC2 dans la régulation de mTOR.....	89
Figure 32. Effet de l'échange de glutamine et leucine par ASCT2 et LAT1 sur l'activation de la voie mTOR .....	90
Figure 33. Régulation de mTORC1 par le niveau énergétique .....	92
Figure 34 Les différentes étapes de la macro-autophagie.....	97
Figure 35. Phases d'initiation et de nucléation du phagophore .....	98
Figure 36. Mécanismes d'élongation du phagophore .....	99
Figure 37. Maturation des autophagosomes .....	100
Figure 38. Régulation de l'autophagie par GCN2 et PERK .....	103
Figure 39. Inhibition des différentes étapes de l'autophagie par mTORC1.....	104
Figure 40. Surexpression de CHOP et de transporteurs d'acides aminés chez des truites nourries avec des aliments végétaux supplémentés en acides aminés cationiques.....	107
Figure 41. Hypothèse d'un défaut d'absorption des AA libres impactant le métabolisme et la croissance des truites.....	108
Figure 42. Perspectives concernant l'étude de l'activation de la voie mTOR.....	173
Figure 43. Perspectives d'étude du rôle de la voie GCN2 dans l'expression des TAACs.....	182
Figure 44. Comparaison des résultats obtenus avec notre hypothèse de travail .....	184
Figure 45. Différence de cinétique d'absorption entre acides aminés libres et inclus aux protéines .....	185
Figure 46. Hypothèse sur le défaut d'absorption des AAC libres .....	186
Figure 47. Hypothèse de l'ajout d'acides aminés neutres aux aliments végétaux pour améliorer l'absorption des acides aminés cationiques libres.....	187



# INTRODUCTION



# Partie I : L'aquaculture des salmonidés

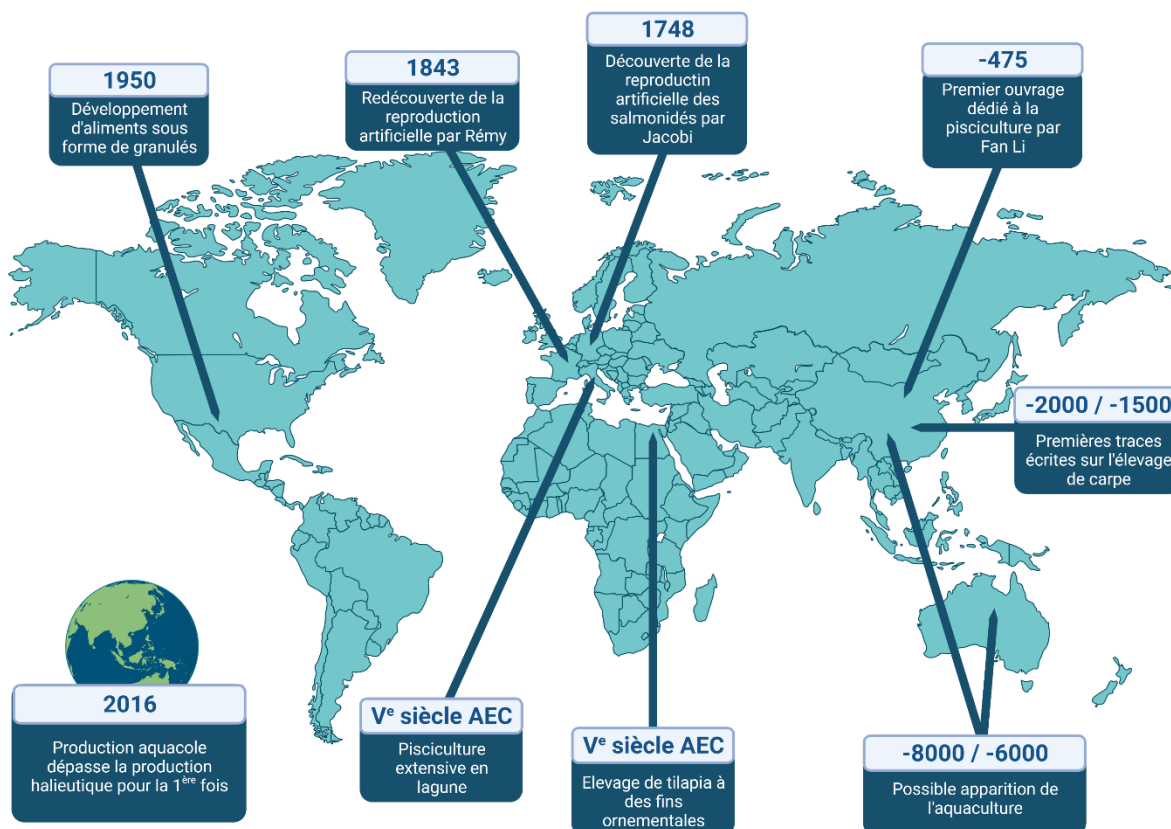
## A- L'aquaculture dans le monde et son histoire

L'aquaculture désigne toute activité de production d'organismes aquatiques végétaux avec l'algoculture ainsi qu'animaux avec les poissons (pisciculture), les mollusques marins (conchyliculture), les crustacés (carcinoculture) et d'autres encore comme les crocodiliens. L'aquaculture est à différencier des pêches et implique l'action de l'Homme par le travail et l'énergie dans le but d'améliorer la production des organismes aquatiques en influant sur leur croissance, leur mortalité, ainsi que leur reproduction. Elle se différencie également de la pêche en amenant une notion de propriété individuelle ou juridique du stock en élevage, d'après l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO). Dans la suite de ce rapport le terme aquaculture sera utilisé pour désigner la pisciculture sauf indications contraires.

### a. Origines et histoire de l'aquaculture

#### *Les premières formes d'aquaculture*

Il était communément admis que les premières formes d'aquaculture seraient apparues bien après l'apparition de l'agriculture au néolithique aux environs de -10 000 ans avant l'ère commune (AEC) <sup>1</sup>. Cependant, les origines de l'aquaculture sont assez floues et il est admis que l'élevage d'organismes aquatiques par les différents peuples a pu arriver à différentes époques. D'anciennes traces de systèmes d'aquaculture datant d'environ 10 000 ans ont été révélées en Australie par les incendies de 2019, sur le site de Budj Bim, dans la région de Melbourne. Les aborigènes y auraient construit un réseau de canaux et de pièges afin de faciliter la capture et élever des anguilles (*Anguilla australis*). De plus, de récentes études de zooarchéologie de restes de carpe commune (*Cyprinus carpio*) suggèrent que l'élevage de cette espèce en Chine daterait de -6000 ans AEC <sup>2</sup>. De nombreux documents et œuvres montrent que l'aquaculture était bien pratiquée en Chine vers -2000/-1500 AEC. Des carpes auraient été piégées dans des bassins formés par le retrait des eaux après des crues, créant des viviers dans lesquels elles auraient été nourries par les populations. Ensuite les carpes auraient été maintenues et reproduites dans ces bassins puis élevées en culture intégrée dans les rizières <sup>2</sup>. Des fresques retrouvées dans des tombes égyptiennes de la même époque suggèrent que le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) aurait été élevé à des fins ornementales. Par la suite, au V<sup>e</sup> siècle AEC, les romains et les étrusques pratiquaient la pisciculture extensive en lagune, piégeant les poissons pendant leur migration et les nourrissant pour les maintenir en vie jusqu'à leur consommation. A la même époque, en Chine, Fan Li publiait le premier ouvrage connu sur l'élevage de poissons (Figure 1).



**Figure 1. Faits marquants de l'Histoire de l'aquaculture**

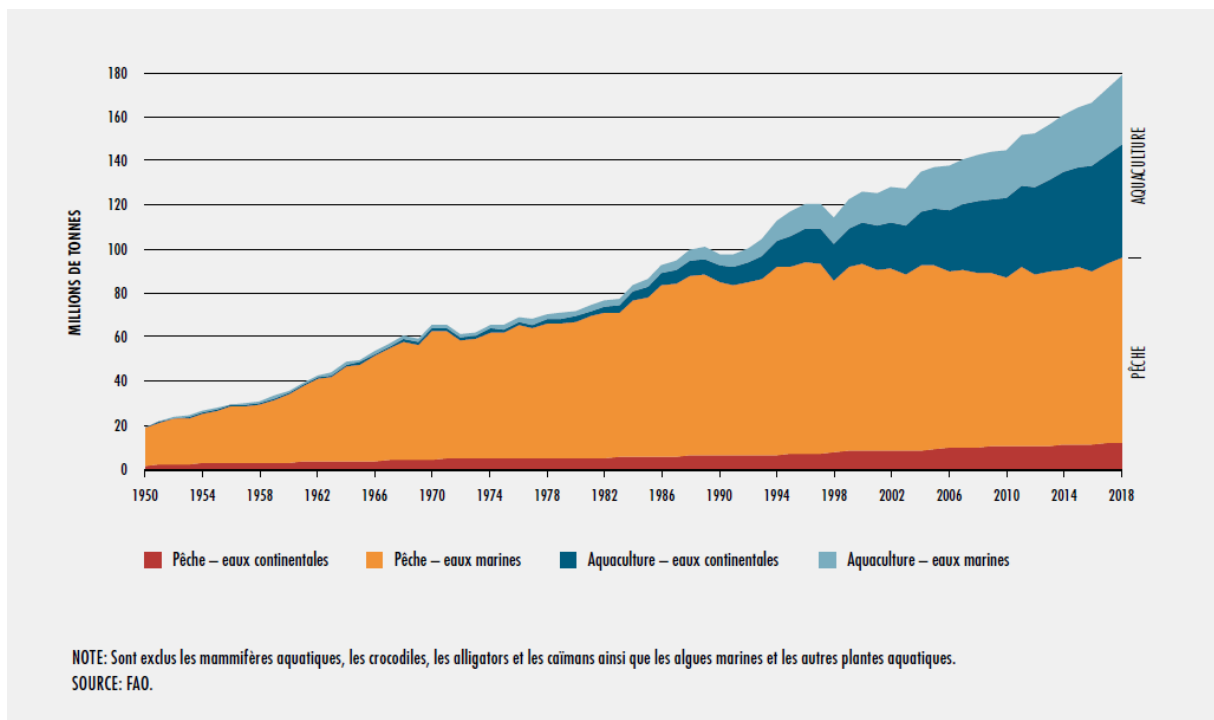
Ensuite, l'aquaculture évolue peu jusqu'à la découverte de la fécondation artificielle des salmonidés au XVIII<sup>e</sup> siècle en Europe. C'est en Allemagne, en 1748, que Stephan Ludwig Jacobi, un agriculteur allemand réussit les premières fécondations artificielles de truites et de saumons <sup>3</sup> (Figure 1). Il publiera ses premiers résultats dans un article intitulé « Message sur l'incubation du poisson » paru dans le magazine d'Hanovre en 1763 et ses conclusions dans un article intitulé « De la production artificielle de truites et de saumons » paru dans les Feuilles d'intelligence de Lippe. Par la suite, ses publications sont diffusées et leurs principes appliqués en Allemagne et en Angleterre. Malgré une traduction de ses travaux en français, ils tombent dans l'oubli en France.

Ce n'est que presque un siècle plus tard, en 1843, qu'un agriculteur français, Joseph Remy, n'ayant aucune connaissance de l'existence des expérimentations de Jacobi, réinvente la reproduction artificielle en observant la reproduction des truites dans les ruisseaux (Figure 1). De ces observations, il en arrive aux mêmes conclusions AEC que Jacobi avec quelques différences. Gehin, un aubergiste comprenant l'importance de cette découverte, contacta le docteur Haxo de la société savante des Vosges qui fit un rapport à l'Académie des Sciences (Comptes-rendus de l'Académie des Sciences, t. XXVIII, p. 351. 1849). Le ministre de l'agriculture de l'époque chargea alors le professeur Coste d'évaluer ces travaux afin d'utiliser cette méthode dans le but de repeupler les rivières de France. A partir de là, les techniques de reproduction des salmonidés ont été largement diffusées dans le monde, et ont peu évolué jusqu'à la fin de la

seconde guerre mondiale <sup>3</sup>. A notre connaissance, aucune source ne mentionne l'existence de piscicultures chez les populations natives d'Amérique, probablement car la transmission du savoir dans les civilisations américaines était orale. Une réelle activité piscicole serait apparue en Amérique du nord au milieu du XVIII<sup>e</sup> siècle, après un épuisement dans les rivières et fleuves des stocks d'espèces telles que le bar rayé (*Morone saxatilis*) ou l'esturgeon (*Acipenser sp.*), à des fins de repeuplement. En Amérique latine, il semble que l'aquaculture soit apparue bien plus tard, dans les années 1940, également à des fins de repeuplement et de pêche récréative <sup>4</sup>.

### Industrialisation de la pisciculture

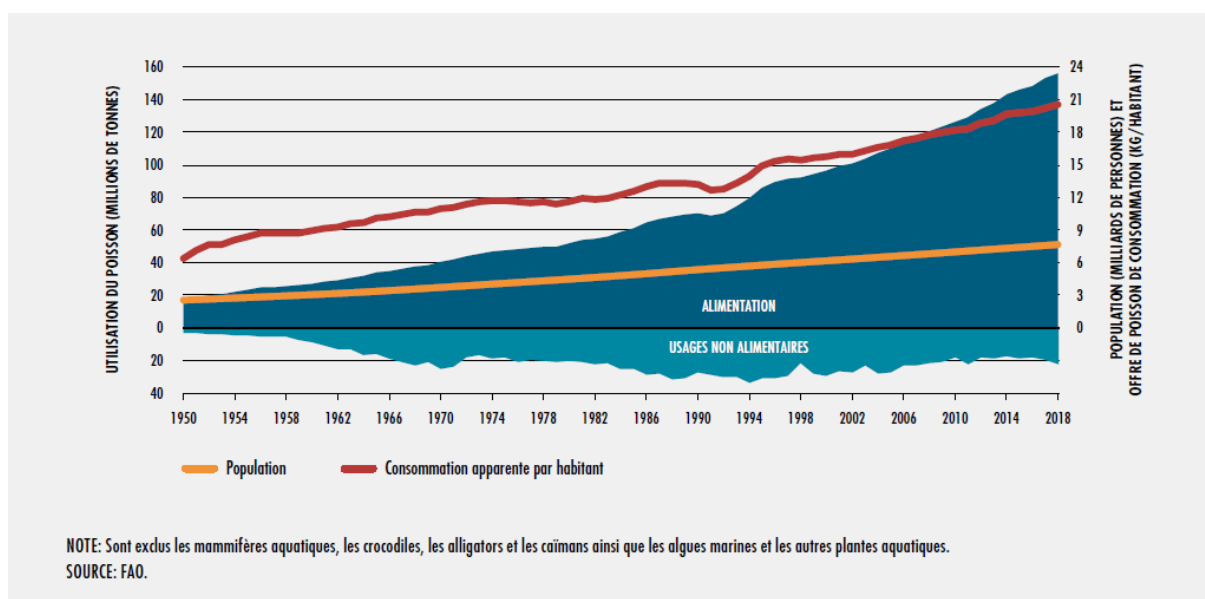
Au début des années 1950, John E. Hanson expérimenta l'utilisation de granulés secs pour nourrir des truites juvéniles et d'autres espèces d'eau douce dans les écloséries aux Etats-Unis, et obtint un meilleur rapport de poisson produit par quantité d'aliment distribué (Figure 1). Cette technique se répandit ensuite rapidement et devint la norme pour la pisciculture et permit son industrialisation <sup>5</sup>. Par la suite, à partir de 1961, la pisciculture connut un développement constant dans le monde mais contribuait alors peu à la production mondiale de poisson (Figure 2).



**Figure 2. Production halieutique et aquacole mondiale**

(FAO, 2020)





**Figure 3. Evolutions de la population et de la consommation de poisson mondiales**

(FAO, 2020)

La production de poisson a connu une forte augmentation, due, d'une part à une croissance de la population mondiale mais également à l'augmentation de la consommation de poisson par habitant qui est passée de 9,0 kg par an en 1950 à 20,7 kg par an en 2017. En effet, de 1961 jusqu'à aujourd'hui, la production de poissons est passée d'environ 40 millions de tonnes à 140 millions alors que la population humaine mondiale a augmenté d'environ 3 milliards de personnes correspondant à une augmentation annuelle moyenne de la production de poisson de 3,2 % contre 1,6 % pour l'accroissement de la population mondiale sur cette période (Figure 3). Jusque dans les années 1980, la production halieutique a pu supporter cette demande croissante de poisson en produisant 86,9 millions de tonnes de poissons contre 14,9 millions de tonnes pour l'aquaculture.

Toutefois, depuis le milieu des années 1980, la production halieutique, bien que toujours croissante s'est ralentie, passant d'une moyenne de 91,4 millions de tonnes entre 1996 et 2005 à seulement 96,4 millions de tonnes en 2018 (Figure 2). Ce ralentissement de la production halieutique est due à la mise en place de quotas de pêche dans le cadre de programmes internationaux visant à garantir la pérennité des stocks de poissons sauvages à partir de 1982 avec la signature par 157 états des accords de la Convention des Nations unies sur le droit de la mer (CNUDM) devant être appliqués à partir de 2001. Cette limitation de la pêche, a poussé au développement de l'aquaculture mondiale qui a, de son côté, vu sa production de poisson croître drastiquement durant cette période. Ceci a permis de répondre à la demande mondiale de poisson croissante malgré la limitation de la pêche et contribuer fortement aux 179 millions de tonnes de poissons produites en 2018 (Figure 2). Ainsi, avec un taux de croissance annuel d'environ 2,3 %, l'aquaculture est l'industrie agroalimentaire connaissant le plus fort taux de croissance <sup>6</sup>. La production de poisson par l'aquaculture est

alors passée d'une moyenne de 34,2 millions de tonnes entre 1996 et 2005 à 82,1 millions de tonnes d'animaux aquatiques en 2018, et a dépassé pour la première fois en 2016, la production halieutique, en atteignant 52,1 % de la production de poisson destinée à la consommation humaine (Figure 2).

### *Rôle croissant de l'aquaculture pour l'alimentation humaine*

La consommation mondiale de poisson devrait continuer à augmenter sur le long terme, poussée par une hausse de la production, une hausse moyenne des revenus des ménages et également une sensibilisation aux bienfaits de la consommation de poisson <sup>6</sup>. En effet, le poisson est une source importante de protéines de haute valeur biologique, d'acides gras polyinsaturés et de micronutriments <sup>7 8</sup>. En 2017, 20 % des apports en protéines animales de 3,3 milliards d'individus étaient apportées par le poisson. Afin de répondre à cette demande croissante de poisson, la production aquacole devrait continuer à augmenter et atteindre 109 millions de tonnes de poisson produites en 2030 soit une croissance de 32 % par rapport à 2018 et procurer 61 % de la production de poisson à destination de la consommation humaine. A l'avenir l'aquaculture devrait procurer une source de protéines animales accessibles à prix bas et ainsi être un acteur majeur de la sécurité alimentaire mondiale <sup>6</sup>.

### *b. L'aquaculture dans le monde*

#### *Aquaculture mondiale*

La diversité des conditions environnementales des piscicultures dans le monde a conduit à une diversité importante des espèces élevées en pisciculture. La plupart des espèces élevées en aquaculture sont des poissons et incluent 622 groupes d'espèces. Malgré l'importante diversité des espèces élevées, seulement 20 espèces, représentant 3 % des espèces aquacoles totales, comptabilisent à elles seules 83,6 % de la production mondiale et comprennent majoritairement des espèces continentales (ou d'eau douce) et peu d'espèces marines. En effet, en 2018, la production piscicole continentale représentait 62,5 % de la production de poissons mondiale, alors que la production d'espèces marines reste marginale malgré les progrès techniques et scientifiques réalisés au cours des dernières années dans l'élevage de poissons marins. Les espèces les plus élevées au monde sont majoritairement représentées par différentes espèces de carpes, de tilapias et de poissons chats (qui sont les espèces les plus élevées en Asie) et les salmonidés (représentant les principales espèces élevées en Europe) (Tableau 1).

**Tableau 1. Espèces de poissons les plus produites en aquaculture dans le monde**

(FAO, 2020)

	2010	2012	2014	2016	2018	2018 share
	(thousand tonnes)					(percentage)
<b>Finfish</b>						
Grass carp, <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	4 213.1	4 590.9	5 039.8	5 444.5	5 704.0	10.5
Silver carp, <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	3 972.0	3 863.8	4 575.4	4 717.0	4 788.5	8.8
Nile tilapia, <i>Oreochromis niloticus</i>	2 657.7	3 342.2	3 758.4	4 165.0	4 525.4	8.3
Common carp, <i>Cyprinus carpio</i>	3 331.0	3 493.9	3 866.3	4 054.7	4 189.5	7.7
Bighead carp, <i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	2 496.9	2 646.4	2 957.6	3 161.5	3 143.7	5.8
Catla, <i>Catla catla</i>	2 526.4	2 260.6	2 269.4	2 509.4	3 041.3	5.6
<i>Carassius</i> spp.	2 137.8	2 232.6	2 511.9	2 726.7	2 772.3	5.1
Freshwater fishes nei, <sup>1</sup> Osteichthyes	1 355.9	1 857.4	1 983.5	2 582.0	2 545.1	4.7
Atlantic salmon, <i>Salmo salar</i>	1 437.1	2 074.4	2 348.1	2 247.3	2 435.9	4.5
Striped catfish, <i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	1 749.4	1 985.4	2 036.8	2 191.7	2 359.5	4.3
Roho labeo, <i>Labeo rohita</i>	1 133.2	1 566.0	1 670.2	1 842.7	2 016.8	3.7
Milkfish, <i>Chanos chanos</i>	808.6	943.3	1 041.4	1 194.8	1 327.2	2.4
Torpedo-shaped catfishes nei, <i>Clarias</i> spp.	343.3	540.8	867.0	961.7	1 245.3	2.3
Tilapias nei, <i>Oreochromis</i> (=Tilapia) spp.	472.5	693.4	960.8	972.6	1 030.0	1.9
Rainbow trout, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	752.4	882.1	794.9	832.1	848.1	1.6
Wuchang bream, <i>Megalobrama amblycephala</i>	629.2	642.8	710.3	858.4	783.5	1.4
Marine fishes nei, Osteichthyes	467.7	567.2	661.0	688.3	767.5	1.4
Black carp, <i>Mylopharyngodon piceus</i>	409.5	450.9	505.7	680.0	691.5	1.3
Cyprinids nei, Cyprinidae	639.8	601.1	628.0	596.1	654.1	1.2
Yellow catfish, <i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	177.8	233.7	302.7	434.4	509.6	0.9
Other finfishes	6 033.9	6 869.3	7 730.0	8 217.1	8 900.2	16.4
<b>Finfish total</b>	<b>37 745.1</b>	<b>42 338.2</b>	<b>47 219.1</b>	<b>51 078.0</b>	<b>54 279.0</b>	<b>100</b>

Les principales espèces de poissons produites sont herbivores et leur élevage est dit extensif, l'intervention de l'Homme se concentre essentiellement sur la capture et la reproduction des poissons qui se nourrissent des végétaux disponibles dans des étangs, des rizières et des mangroves. Dans les prochaines années, l'aquaculture en Asie, et particulièrement en Chine, devraient s'intensifier en passant d'une aquaculture extensive à intensive en nourrissant les poissons avec des aliments complets et ainsi jouer fortement sur l'augmentation de la production mondiale.

En Afrique, l'aquaculture s'est peu développée au cours des dernières années (notamment par manque de politiques de soutien à l'aquaculture), et présente une production limitée d'un peu plus de 2 millions de tonnes, soit 2,67 % de la production mondiale. Cependant d'après les estimations de la FAO, le continent africain pourrait connaître le plus important développement d'ici à 2030 avec une hausse de 42 % de la production. Le premier producteur piscicole africain est l'Égypte qui représente à elle seule plus de 70 % de la production africaine et sa production est dominée par l'élevage de tilapia du Nil en étang (75 %).

La production de poisson sur le continent américain est, comme en Europe, largement dominée par la pêche. La production d'animaux aquatiques issue de l'aquaculture américaine

atteint les 3,8 millions de tonnes soit 4,63 % de la production mondiale. La production aquacole est dominée par l'Amérique latine et notamment le Chili qui compte à lui seul un tiers de la production aquacole américaine et est le premier producteur mondial de truite arc-en-ciel. L'aquaculture en Amérique du nord, quant à elle, produit beaucoup moins de poisson et est dominée par le barbu de rivière (*Ictalurus punctatus*), un poisson-chat, aux Etats-Unis et le saumon atlantique (*Salmo salar*) au Canada.

### *Aquaculture en Europe*

La consommation de poisson en Europe, comme en Amérique du nord, est dominée par des espèces de hauts niveaux trophiques carnivores, et majoritairement par les salmonidés. Le saumon atlantique, en Europe, est l'espèce de poisson la plus élevée et constitue la grande majorité de la production du plus grand producteur européen : la Norvège. En 2018, la production piscicole norvégienne représentait 13,5 millions de tonnes soit 43 % de la production de poisson européenne totale.

Dans l'union européenne (UE), les deux premiers producteurs de poissons sont l'Espagne et la France qui représentent respectivement 21 et 15 % de la production aquacole de l'UE suivis de l'Italie et la Grèce. L'élevage d'une autre espèce de salmonidés, la truite-arc-en-ciel, représente la grande majorité de la production piscicole (environ trois quarts) dans ces pays.

### *L'élevage de truite en France*

En France, la production aquacole dominante est la conchyliculture dont 50 % de la production est représentée par l'activité ostréicole. En tant que pionnière de la reproduction et de l'alimentation des espèces marine, la France est, avec l'Italie, l'un des principaux pays producteurs de poissons marins au monde après la Chine. Les espèces marines d'élevage en France comprennent le bar, la daurade, le turbot et d'autres espèces dont le saumon atlantique. Cependant les quantités produites sont minimales comparées à la production continentale. La pisciculture continentale, quant à elle, permet la production d'espèces comprenant l'omble fontaine (*Salvelinus fontinalis*), la truite fario (*Salmo trutta*) et l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*) et est fortement dominée par la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), qui représente aujourd'hui à elle seule 96 % de la production piscicole continentale nationale. Les exploitations piscicoles sont dispersées sur tout le territoire national. Cependant environ 50 % des exploitations sont concentrées en Bretagne et en Nouvelle Aquitaine.

### *c. La truite arc-en-ciel : une espèce modèle en nutrition*

#### *Origine et introduction*

La truite arc-en-ciel est originaire de la côte pacifique de l'Amérique du Nord, son aire de répartition s'étendait alors de l'Alaska au Mexique. Etant un poisson anadrome, vivant en mer mais se reproduisant en eau douce dans les rivières, elle s'adapte facilement à différentes conditions environnementales dont une large gamme de températures (0 à 27 °C) et peut vivre de façon permanente en lac. Grâce à ses capacités d'adaptation, elle a pu, à la fin du XIX<sup>e</sup>

siècle, être introduite sur les différents continents, excepté l'Antarctique, pour la pêche sportive mais également pour la pisciculture. Elle offre, en effet, des caractéristiques intéressantes à cette fin dont une production d'œufs par femelle importante (jusqu'à 2000 par kg), une période de frai modulable en modifiant la photopériode et une croissance rapide<sup>9</sup>. Toutes ces caractéristiques font aujourd'hui de la truite arc-en-ciel l'une des espèces de poissons les plus produites au monde.

### *Un génome complexe*

La truite arc-en-ciel fait partie de la famille des salmonidés qui fait elle-même partie des téléostéens qui regroupent la grande majorité des espèces de poissons connues à ce jour (environ 99,8 %). Au cours de l'évolution, les ancêtres communs aux vertébrés ont subi deux duplications complètes du génome (2R). Ces événements sont très rares dans l'histoire du vivant et l'on considère qu'ils ont fortement façonné l'histoire évolutive des vertébrés. Cette notion de duplication complète du génome a été proposée pour la première fois par Ohno en 1970<sup>10</sup> pour expliquer la complexité des génomes des vertébrés par rapport aux invertébrés. L'étude des gènes Hox a permis de soutenir cette hypothèse en montrant que chez les invertébrés il n'existe qu'un seul gène contre 4 chez les vertébrés<sup>11</sup>.

Par la suite, 7 gènes Hox ont été identifiés chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) suggérant une duplication complète du génome supplémentaire chez l'ancêtre commun aux téléostéens (3R) suivie de la perte de l'un d'eux<sup>12</sup> qui serait survenue il y a environ 300 millions d'années<sup>13 14</sup>. Puis en 2005, une analyse comparative des génomes du saumon atlantique et de la truite arc-en-ciel a mis en évidence l'existence de 14 complexes Hox sous-entendant l'existence d'une 4<sup>ème</sup> duplication complète du génome spécifique à la famille des salmonidés<sup>15</sup>. Cette infraclasse a en effet subi une quatrième duplication complète du génome (4R) qui serait survenue il y a environ 100 000 ans<sup>16</sup>. L'étude de Berthelot et ses collaborateurs démontre que le génome de la truite serait en phase de rediploïdisation et que 52 % des gènes dupliqués codant pour des protéines lors de la 4<sup>ème</sup> duplication auraient été perdus par fractionnement. L'étude de l'expression des gènes ohnologues restants dans les tissus de truite, suggèrent qu'une partie d'entre eux aurait subi des néofonctionnalisations leur procurant des profils et niveaux d'expression différents. Ainsi pour chaque gène existant chez les mammifères, il existe potentiellement 4 gènes orthologues dans le génome de la truite arc-en-ciel pouvant être exprimés différemment selon les tissus et ayant éventuellement des fonctions différentes. Cette duplication complète du génome spécifique aux salmonidés fait de la truite un modèle intéressant pour étudier les mécanismes précoces de réorganisation du génome après une duplication.

### *Un poisson carnivore*

La truite arc-en-ciel est une espèce de haut niveau trophique se nourrissant de zooplancton au stade de l'alevin, puis de divers invertébrés incluant crustacés, mollusques et insectes en grandissant<sup>17</sup>. C'est d'ailleurs la consommation de crevettes d'eau douce, contenant des pigments caroténoïdes, qui est responsable de la couleur rose/orangée de sa chair. Elle est également une espèce piscivore occasionnelle s'alimentant plus rarement de petits poissons et de leurs œufs.

Grâce à l'étude précoce de l'alimentation de la truite arc-en-ciel dès la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle<sup>18</sup> et à l'effort de recherche effectué lors des dernières décennies, les besoins nutritionnels en macro et micronutriments ont été finement établis<sup>19 17</sup>. Ceci fait de la truite l'un des poissons dont les besoins nutritionnels sont les mieux définis aujourd'hui, permettant ainsi d'adapter les formulations des aliments plus facilement que pour d'autres espèces d'intérêt agronomique.

La truite, en tant que poisson et espèce carnivore, présentent, en comparaison aux mammifères, des particularités concernant l'utilisation des différents macronutriments (glucides, lipides et acides aminés) pour la production d'énergie, ce qui en fait un modèle intéressant pour l'étude de la nutrition.

### *Faible utilisation des glucides*

Les glucides, et plus particulièrement le glucose, ont une importance majeure dans la production énergétique chez les mammifères alors qu'ils ne constituent qu'une faible source d'énergie chez la truite arc-en-ciel. Elle ne présente même aucun besoin en glucides alimentaires<sup>19</sup>. Les poissons carnivores tels que la truite sont considérés comme intolérant au glucose car si la proportion de glucides alimentaires dépasse les 20 %, une hyperglycémie postprandiale persistante est observée, affectant la croissance des truites<sup>20 21 22</sup>. Contrairement aux poissons carnivores, des poissons herbivores ou omnivores tels que la carpe prussienne (*Carassius gibelio*) et le tilapia peuvent utiliser plus efficacement les glucides et être nourris avec des aliments contenant jusqu'à 50 % de glucides sans affecter leur croissance<sup>23 20</sup>. Ainsi, d'un point de vue évolutif, il est possible que l'alimentation naturelle des poissons carnivores, ne contenant que très peu de glucides, aurait conduit à une perte de la capacité à métaboliser efficacement le glucose. Les raisons de l'intolérance au glucose de la truite restent floues et plusieurs hypothèses existent. Cette utilisation limitée du glucose pourrait être due à la faible action sécrétagogue du glucose sur l'insuline comparé aux acides aminés tels que l'arginine ou la lysine<sup>24 25</sup>. En plus d'un faible effet du glucose sur la sécrétion d'insuline, certaines études ont montré que l'insuline induirait peu l'expression de GLUT4 (Glucose Transporter 4) dans les tissus périphériques de la truite tels que les muscles comme ce qui est connu chez les mammifères. Chez ces derniers, l'expression de GLUT4 est responsable de l'absorption du glucose par les muscles à la suite de la hausse de la glycémie chez les mammifères. En outre sa délétion, chez la souris induit une baisse de l'absorption de glucose par les muscles accompagnée d'une augmentation de la glycémie<sup>26</sup>. Ainsi, le manque de surexpression de GLUT4 chez la truite limiterait l'absorption du glucose par les muscles (environ 70 % du poids d'une truite) contribuant à l'hyperglycémie postprandiale observée<sup>27</sup>. Au-delà de l'utilisation du glucose par les muscles, il a également été démontré que le glucose était peu utilisé pour la synthèse lipidique chez la truite. Il a, en effet, été montré que l'augmentation de la glycémie chez la truite ne stimulait pas la synthèse lipidique<sup>28</sup> ne permettant pas de stocker de l'énergie comme ce qui est connu chez les mammifères. Non seulement la truite utilise peu le glucose suite à la hausse de la glycémie mais elle ne réduit également pas sa production par la néoglucogénèse. En effet, différentes études montrent que l'augmentation de la glycémie ne provoque pas de réduction ni de l'expression ni de l'activité de certaines enzymes de la néoglucogénèse telle que la glucose-6-phosphatase

(G6Pase)<sup>29</sup>. Ainsi, il y aurait toujours une production de glucose par la néoglucogénèse alors que celui-ci est présent en grande quantité.

### *Besoins en lipides*

Les lipides sont utilisés par les animaux comme source d'énergie sur le long terme pendant de longues périodes d'exercice soutenu ou de prise alimentaire réduite. Les poissons présentent une certaine capacité à métaboliser facilement les lipides, leur permettant de survivre en période de jeûne prolongé. Dans le cas des salmonidés, cela leur permet d'effectuer l'effort physique soutenu de nage sans aucune prise alimentaire durant des jours afin de remonter les cours d'eau les ayant vus naître afin de frayer. Les besoins en lipides de la truite constituent entre 16 et 24% de son alimentation<sup>17 19</sup>. Tout comme pour les mammifères, les acides gras poly-insaturés (PUFA) des séries oméga-3 et oméga-6 sont essentiels car ils ne peuvent être synthétisés par les poissons sans l'apport de précurseurs de ces séries dans leur alimentation<sup>17</sup>. De façon intéressante, chez les mammifères et d'autres espèces terrestres, il a été montré que les besoins essentiels en acides gras sont plus élevés pour la série des oméga-6 que pour la série oméga-3, contrairement aux poissons. En effet, Les différentes études de la composition et du métabolisme lipidique des poissons montrent que, contrairement aux mammifères, leurs besoins en oméga-3 sont plus importants que leurs besoins en oméga-6<sup>30 31</sup>. Il a été suggéré que cette différence entre mammifères et poissons pourrait être due à l'effet du degré d'insaturation des acides gras jouant sur leur point de fusion et ainsi permettant une meilleure flexibilité des membranes à basse température chez les poissons. Cette hypothèse est notamment appuyée par l'observation que les espèces de poissons d'eau froide, telle que la truite, contiendrait plus d'oméga-3 que les espèces tropicales.

Ainsi les aliments destinés à l'alimentation de la truite doivent contenir des acides gras de la série oméga-3 dont les acides eicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA) à hauteur d'environ 1% de l'aliment<sup>17</sup>. La truite ayant la capacité de convertir l'acide linoléique, un autre PUFA de la série oméga-3, en EPA et DHA, contrairement aux poissons marins, ses besoins en EPA et DHA peuvent en partie être comblés par des apports alimentaires en acide linoléique<sup>32</sup>.

### *Besoins élevés en acides aminés*

Les acides aminés issus des protéines alimentaires sont essentiels au développement des organismes vivants. Éléments constitutifs des protéines, ils permettent d'assurer la synthèse des protéines et donc la croissance des poissons par les processus anaboliques. Ils sont également des molécules de signalisation importante (voir

Partie III : Les voies de signalisation cellulaire régulées par les acides aminés) et peuvent également être utilisés comme substrat pour la production d'énergie. Contrairement au glucose et aux lipides, les acides aminés ne peuvent être stockés chez les organismes vivants mais peuvent être convertis en glucose ou lipides qui, eux, peuvent à leur tour, être accumulés ou être utilisés comme source d'énergie par le métabolisme intermédiaire<sup>33</sup>. A ces fins, les acides aminés doivent être déaminés produisant majoritairement de l'ammonium, et non de l'urée comme chez les vertébrés terrestres, qui est ensuite éliminé par les branchies et l'urine<sup>34</sup>.

Le métabolisme énergétique des poissons carnivores, dont la truite, repose en grande partie sur les acides aminés<sup>35</sup>. Les salmonidés présentent de hauts besoins en protéines alimentaires qui constituent entre 35 et 50 % de leur alimentation, selon le stade de développement<sup>36</sup>, contre 15 % pour l'Homme.

Au-delà de la quantité minimale de protéine incluse dans l'aliment, c'est surtout le profil en acides aminés qui influe sur la croissance des truites. Les protéines alimentaires doivent apporter 10 acides aminés essentiels (AAE) au métabolisme des poissons. Ceux-ci comprennent les 9 AAE chez les mammifères (le tryptophane, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, la valine, la leucine, l'isoleucine et l'histidine) ainsi que l'arginine qui est considérée comme un acide aminé semi-essentiel chez les mammifères (Tableau 2).

**Tableau 2. Besoins nutritionnels en protéines brutes et acides aminés essentiels de la truite arc-en-ciel en phase de grossissement**

(Hardy, 2002)

Nutriments	Pourcentage de la masse sèche
Protéines brutes	42
Arginine	2,0
Histidine	0,7
Isoleucine	0,8
Leucine	1,4
Lysine	1,8
Méthionine	1
Phénylalanine	1,2
Thréonine	0,8
Tryptophane	0,2
Valine	1,3

Comme pour les autres animaux, un certain ratio entre acides aminés essentiels (AAE) et non essentiels (AANE) permet une croissance optimale des poissons, celui-ci est en général de



50:50. La truite, en tant que poisson carnivore, a des besoins en AAE plus importants et présente une croissance optimale avec un ratio AAE:AANE d'environ 57:43<sup>37</sup>. Augmenter la proportion d'AAE, au-delà de ce ratio induit une diminution de la croissance<sup>37</sup>.

## B- Le remplacement des farines et huiles de poisson

### a. Une production durable ?

Le développement rapide de l'aquaculture depuis les années 1990 a vu émerger certains problèmes concernant l'alimentation des poissons d'élevage et l'impact environnemental des exploitations piscicoles, questionnant la durabilité de l'aquaculture sur le long terme.

#### *Impact environnemental de l'aquaculture*

L'augmentation de la production de poisson, a engendré une augmentation de la concentration des poissons au sein des élevages. Ces populations denses de poissons d'élevage provoquent un enrichissement des eaux en matière organique, majoritairement dû à la décomposition des aliments non consommés et donc à la suralimentation des animaux<sup>38</sup>. Il est, en effet, admis qu'une importante proportion de l'apport azoté n'est pas assimilée par les poissons d'élevage. Ces rejets organiques entraînent une eutrophisation des masses d'eau à la sortie des exploitations pouvant alors affecter les écosystèmes en aval de ces cours d'eau, notamment en favorisant la prolifération de phytoplancton parfois toxique ou de pathogènes<sup>39 40</sup>.

La concentration des poissons d'élevages entraîne également une hausse de la susceptibilité à différents pathogènes et leur dissémination, pouvant également infecter les populations sauvages de poissons<sup>41</sup>. Pour lutter contre ces infections, des pesticides et antibiotiques peuvent alors être utilisés impactant également la qualité de l'eau. La recherche en nutrition des poissons permet de trouver des solutions à ces problèmes en améliorant les formulations des aliments piscicoles, en augmentant, par exemple, l'efficacité alimentaire et la résistance aux pathogènes et en réduisant les rejets de matières organiques dans l'eau. Le fort développement de l'aquaculture a également vu émergé des problèmes concernant l'impact environnemental de la production d'aliment à destination des poissons d'élevage. En effet, les aliments piscicoles sont traditionnellement en partie constitués de farines et huiles de poissons issues de la pêche minotière<sup>1</sup> de poissons pélagiques tels que la sardine dont les stocks sont considérés comme pleinement exploités aujourd'hui.

#### *Limitation de la production d'huiles et farines de poisson*

Ces espèces sont aujourd'hui protégées par des quotas de pêche, réduisant ainsi la production de farines et huiles de poissons. Le développement rapide de l'aquaculture a alors contribué à l'augmentation de la demande en ces matières premières, ce qui, en plus de leur production limitée, a conduit à une forte hausse de leurs prix<sup>42</sup> menaçant la viabilité économique de l'aquaculture. De cela émerge un des enjeux principaux de l'aquaculture moderne : la

---

<sup>1</sup> Pêche industrielle intensive destinée à alimenter les filières industrielles

substitution des huiles et farines de poissons dans les aliments aquacoles par d'autres matières premières plus économiques et ayant un impact environnemental réduit <sup>43</sup>.

Comme mentionné précédemment, l'utilisation de farines de poisson dans les aliments piscicoles est une pratique écologiquement et économiquement non durable pour l'aquaculture. L'aliment représentant le plus gros coût dans la production aquacole<sup>2, 44 45</sup>, il est indispensable pour la pérennité économique de l'aquaculture de développer des formulations d'aliments dépourvues de farines et huiles de poissons et utilisant des matières premières abondantes répondant aux besoins nutritionnels des poissons carnivores d'intérêt agronomique telle que la truite arc-en-ciel et n'altérant pas leurs performances de croissance <sup>46</sup>. Différentes alternatives aux huiles et farines de poissons sont aujourd'hui envisagées avec leurs avantages et inconvénients.

## b. Les différentes alternatives

### *Les insectes*

Les insectes sont à la base de l'alimentation de nombreux poissons omnivores et carnivores et particulièrement des poissons continentaux incluant la truite arc-en-ciel <sup>47</sup>. Les insectes constituent une bonne source de protéines, lipides, vitamines et minéraux et représentent une alternative intéressante aux farines et huiles de poissons <sup>48 49</sup>. Les niveaux de protéines inclus dans les insectes sont compris entre 9,3 et 76 % <sup>50 51 52</sup>. Les teneurs protéiques dépendent des espèces et sont plus élevées chez les diptères qui présentent des niveaux équivalents à ceux des farines de poissons et un peu moins élevés chez les coléoptères et les orthoptères qui sont toutefois souvent déséquilibrés en lysine et méthionine.

De plus, les insectes contiennent relativement peu de glucides, généralement moins de 20% <sup>50</sup>. Néanmoins, une grande partie de ces glucides correspond à de la chitine, un polysaccharide azoté qui constitue majoritairement l'exosquelette des insectes et dont la digestibilité par les différentes espèces de poissons est controversée <sup>53</sup>.

Ils contiennent également une importante quantité de lipides, entre 7,9 et 40 % <sup>54</sup>. Cependant, ces lipides sont majoritairement des oméga-6 ou des acides gras mono-insaturés et comportent peu d'oméga-3 qui sont essentiels à la croissance des poissons. Les quantités de ces nutriments inclus dans les farines d'insectes varient également en fonction du stade de développement et de l'alimentation des insectes <sup>55</sup> entraînant une grande variabilité de la composition des farines d'insectes pour ces éléments.

La production de farines d'insectes ne nécessite que peu d'énergie, d'eau et de surface. De plus l'alimentation des insectes peut être assurée par l'utilisation de nombreux déchets permettant leur valorisation mais celle-ci est limitée par les réglementation européennes <sup>56</sup>. L'inclusion de farines d'insectes permet de réduire l'utilisation de farines de poissons de seulement 25 % et d'huiles de poissons de 38 % sans affecter la croissance de la truite arc-en-ciel (Saint-Hilaire et al., 2007). De plus, la production de farines d'insectes est aujourd'hui

---

<sup>2</sup> L'aliment représente à lui seul, 40 à 70 % du coût total de production <sup>44 45</sup>.

encore très limitée et ne peut répondre à la forte demande pour la production d'aliments piscicoles. L'utilisation des insectes dans les aliments aquacoles nécessite encore un effort de recherche important pour pallier aux déséquilibres en certains AAE, en oméga-3 et éclaircir les effets de certains composés comme la chitine sur la digestion des poissons.

### *Les levures*

Comme pour les insectes, les levures peuvent être produites à l'aide de matières premières à faible valeur. Les recherches sur les levures ont d'abord été menées sur leur intérêt en tant que complément alimentaire, ayant des effets bénéfiques sur la réponse immunitaire et l'intégrité intestinale par le biais des polysaccharides pariétaux dont le  $\beta$ -glucan<sup>58 59</sup> et les polysaccharides de mannane<sup>60 61</sup>.

La composition des levures en macronutriments et minéraux varie selon les espèces et les milieux de culture utilisés<sup>62</sup>. Elles contiennent peu d'oméga-3 et de glucides qui sont surtout les polysaccharides des parois<sup>63</sup>. Elles sont également limitées en vitamines et en minéraux<sup>62</sup>, bien que les niveaux en minéraux peuvent être modulés par enrichissement de leur milieu de culture<sup>64</sup>.

Néanmoins, les différentes espèces de levures contiennent des niveaux de protéines similaires aux farines de poisson<sup>65 63</sup>. Elles contiennent la plupart des AAE en quantité suffisante mais présentent souvent des déséquilibres en méthionine<sup>66</sup> et en arginine pour certaines espèces<sup>64</sup>.

Différentes études utilisant des levures montrent qu'elles peuvent être utilisées pour remplacer jusqu'à 35-40 % des farines de poisson dans les aliments sans affecter leurs digestibilités, l'intégrité intestinale et la croissance des salmonidés<sup>63 65 67</sup>. Cependant, une inclusion plus importante induit une inflammation du système digestif chez la truite et affecte sa croissance<sup>65</sup>.

### *Les algues*

Les algues sont également de possibles alternatives aux farines de poissons. Différentes analyses de composition des macroalgues (algues pluricellulaires visibles à l'œil nu) ont montré qu'elles contenaient tous les acides aminés essentiels<sup>68 69</sup>. Ce sont les algues rouges qui présentent les plus hautes teneurs en protéines (jusqu'à 50% de la masse sèche) alors que les algues brunes contiennent plus de lipides, environ 10% de la masse sèche dont 50% d'acides gras<sup>70</sup> et majoritairement des oméga-3<sup>71</sup>. Les macroalgues peuvent également représenter des sources importantes de minéraux car elles les accumulent aisément<sup>72</sup>. Comme les levures, les cellules algales possèdent une paroi cellulaire plus ou moins riche en glucides selon les espèces (1,8 à 66%)<sup>73</sup> qui peuvent également diminuer la digestibilité des aliments chez les poissons. Seules de faibles taux d'inclusions de macroalgues dans les aliments, en dessous de 10%, peuvent être supportées par la truite arc-en-ciel<sup>74</sup>. Les microalgues (non visibles à l'œil nu) étudiées sont également riches en AAE et peuvent contenir de hautes teneurs en protéines (jusqu'à 65%). Cependant, elles sont également entourées d'une paroi également constituée majoritairement de polysaccharides<sup>75</sup> pouvant impacter leur digestibilité par les poissons.

Les microalgues sont aujourd'hui plutôt considérées comme une alternative aux huiles de poissons plus qu'aux farines de poissons car elles sont des sources importantes d'EPA et DHA<sup>76 77</sup>. Ces huiles d'algues permettent de combler les besoins en oméga-3 des truites et peuvent complètement remplacer les huiles de poissons dans les aliments piscicoles sans altérer la croissance et la santé des truites<sup>77</sup>.

### *Les plantes*

Les matières premières issues des plantes terrestres ont été rapidement envisagées en tant qu'alternatives aux huiles et farines de poisson de par leur grande disponibilité et leur faible prix. Aujourd'hui, différentes plantes sont sélectionnées d'après leur composition et utilisées dans les formulations d'aliments piscicoles : des oléagineux (soja, colza, tournesol), des céréales (blé, maïs) et de protéagineux (lupin, pois)<sup>78 79 80 81</sup>. Ces différentes plantes présentent certaines caractéristiques inadaptées aux besoins nutritionnels des poissons carnivores et aucune d'elles ne peut répondre seule à leurs besoins. Afin de réduire les effets potentiellement néfastes des différents végétaux, des combinaisons de matières premières végétales sont utilisées dans les aliments<sup>82</sup>.

Aujourd'hui, les matières premières végétales sont utilisées dans les aliments piscicoles commerciaux et ont permis de réduire l'inclusion des farines de poissons de l'ordre de 75%<sup>83 43 84</sup>. Cependant, au-delà de ces niveaux d'inclusion, les aliments à base de plantes impactent négativement la physiologie de la truite.

#### *c. Effet des aliments végétaux sur la physiologie des truites*

##### *Impact sur la croissance*

Le remplacement total de farines de poissons par les matières premières végétales induit une baisse de la croissance des truites et ce, malgré la présence de tous les éléments nutritifs essentiels à leur croissance<sup>85 86, 87 88</sup>. Cette diminution de la croissance des poissons nourris avec des aliments à base de plantes peut être due à différents effets délétères sur la prise alimentaire, la digestion et le métabolisme causés par différentes caractéristiques de la composition des matières premières végétales.

##### *Réduction de la prise alimentaire*

L'une des premières explications à la diminution de la croissance est la baisse de la consommation d'aliment quand la proportion de matières premières végétales dans les aliments est trop importante. Les mécanismes sous-jacents à cette diminution de la prise alimentaire ne sont pas totalement connus. Ils semblent que les déséquilibres en certains nutriments attractants dans les aliments à base de plante, comme les oméga-3<sup>89 90 91</sup> ou les acides aminés<sup>92</sup> réduisent l'appétit des poissons mais également la présence de substances indésirables nommées facteurs antinutritionnels comme les alcaloïdes ou les glucosinolates, qui sont retrouvés respectivement dans la farine de lupin et tourteau de Colza (Francis et al., 2001).

### *Altération de l'intégrité intestinale*

D'autres facteurs antinutritionnels peuvent également impacter l'intestin et ainsi diminuer la digestibilité des aliments à base de végétaux. L'intégrité des entérocytes et des muqueuses intestinales peut être affectée par les fibres végétales difficilement digestibles par les poissons carnivores et présentes en grandes quantités dans certaines sources protéiques végétales <sup>94</sup>. Chez les salmonidés, les produits de soja entraînent une modification de la structure de l'intestin en réduisant la taille des villosités intestinales <sup>95 96</sup> et en augmentant la perméabilité de la barrière intestinale aux pathogènes et cellules immunitaires <sup>97</sup>. Les pathogènes et cellules immunitaires peuvent alors pénétrer la lamina propria et provoquer une inflammation de l'intestin comme en témoigne l'augmentation de l'activité des lysozymes et l'augmentation des niveaux d'immunoglobulines dans la muqueuse intestinale <sup>98</sup>. Les populations microbiennes intestinales peuvent aussi être modifiées par les régimes contenant des végétaux, et potentiellement altérer la digestion de l'hôte. Cependant, leurs rôles dans les perturbations sont soupçonnés mais pas encore précisés <sup>96 99 100 101 102</sup>.

#### *d. Les inconvénients des aliments végétaux*

### *Facteurs antinutritionnels*

Les plantes contiennent de nombreuses substances appelées facteurs antinutritionnels qui sont souvent essentiels à leur physiologie et qui peuvent altérer, directement ou par le biais de leur métabolites secondaires, l'absorption des nutriments et le métabolisme des poissons <sup>103</sup>. Ils représentent un des freins à l'utilisation de végétaux pour l'alimentation des poissons, cependant leurs mécanismes d'action sont aujourd'hui encore peu connus <sup>94</sup>. Les teneurs en facteurs antinutritionnels sont différents selon les végétaux utilisés dans les aliments aquacoles (Francis et al., 2001). Certains vont affecter la prise alimentaire des poissons comme les glucosinolates ou les alcaloïdes <sup>105</sup>. D'autres, comme les antiprotéases et les tannins vont inhiber la digestion enzymatique des lipides et protéines en se fixant aux enzymes digestives comme la trypsine et diminuer leurs activités <sup>106</sup>. La digestibilité des protéines et minéraux peut également être affectée par des facteurs antinutritionnels tels que les phytates et les saponines qui vont se fixer directement sur ces nutriments et diminuer leur biodisponibilité <sup>107 108</sup>.

Beaucoup d'entre eux peuvent également affecter structurellement l'intestin comme les saponines et lectines et induire des entérites importantes chez les salmonidés <sup>94</sup>. Au-delà de la digestibilité des aliments, les facteurs antinutritionnels peuvent également affecter d'autres fonctions biologiques telles que les régulations hormonales de la reproduction et du métabolisme, par les phytoestrogènes et les glucosinolates <sup>109 110</sup>.

Afin de limiter la présence de ces facteurs antinutritionnels dans les aliments piscicoles, différentes stratégies peuvent être utilisées comme la sélection de variétés de plantes contenant peu de facteurs antinutritionnels ou l'utilisation de concentrés protéiques, mais ces matières premières sont plus onéreuses. Différents traitements des matières premières végétales peuvent également réduire les apports en facteurs antinutritionnels. Des

traitements mécaniques peuvent être utilisés pour éliminer les parties des végétaux comme les enveloppes externes qui contiennent les tannins. Des traitements thermiques permettent de réduire les effets néfastes des inhibiteurs de protéases et lipases et des séparation chimiques permettent de réduire les niveaux des alcaloïdes, saponines et phyto-œstrogènes (Francis et al., 2001) <sup>94</sup>.

### *Déséquilibres en sels*

Alors que les farines de poissons sont des sources importantes de minéraux pour les poissons d'élevage <sup>111</sup>, leur remplacement total par des matières premières végétales peut induire des déséquilibres en sels minéraux. Ces déséquilibres peuvent être induits par une faible teneur en minéraux dans les plantes comme par exemple pour le fer, le zinc et le sélénium. La forme selon laquelle ces minéraux sont apportés dans l'alimentation des poissons jouent également un rôle sur leur absorption, en effet les formes organiques présentent généralement une meilleure biodisponibilité que les formes inorganiques et ainsi utilisables par les poissons. Cela a notamment pu être démontré avec différentes études montrant que les formes organiques du fer (lié à l'hème) et de la sélénine (incorporée à la méthionine pour former la sélénométhionine) sont plus facilement absorbées par les salmonidés que leurs formes inorganiques plus abondantes dans les végétaux.

De plus la présence de certains facteurs anti-nutritionnels présents dans les plantes interagirait avec l'absorption de certains minéraux, affectant également leurs biodisponibilités comme l'acide phytique qui est une source de phosphore non disponible pour les poissons carnivores ne possédant pas de phytase pour le digérer efficacement.

Toutes ces caractéristiques des plantes peuvent affecter l'absorption et la métabolisation des minéraux par les truites nourries avec des aliments à base de plantes. Ainsi les recommandations du NRC (National Research Council) concernant les niveaux requis de minéraux pour l'alimentation des truites, définies par des études utilisant des aliments purifiés contenant des farines de poissons (NRC, 2011), pourraient finalement être sous-estimées dans le cas où des aliments à base de végétaux sont utilisés. Par conséquent, un apport réduit en minéraux pourrait alors affecter les fonctions biologiques dont ils sont des régulateurs parmi lesquelles les équilibres osmotique, acido-basique et oxydant mais également l'immunité innée et l'absorption cellulaire des nutriments.

### *Haute teneur en glucides*

Les matières premières végétales présentent des taux en glucides dont la nature diffère selon les plantes. Les glucides contenus dans les aliments diffèrent selon les plantes qui y sont incorporées. Ainsi les tourteaux de soja, de colza et de lupin sont plus riches en fibres alors que les céréales contiennent plus d'amidon <sup>19</sup>.

Les poissons de haut niveau trophique ne possèdent pas d'activités enzymatiques pour digérer les fibres efficacement, ce qui conduirait, dans le cas de régimes riches en fibres, à affecter l'absorption des autres nutriments. En effet, les fibres non digestibles pourraient perturber la digestion enzymatique des lipides et protéines en bloquant l'accès des enzymes digestives à leurs substrats (Médale et al., 2013).

Les poissons carnivores présentent également des activités d'amylases très limitées, rendant la digestion de l'amidon cru difficile. Cependant, l'extrusion des aliments permet d'améliorer la digestibilité de l'amidon. Les apports en amidon dans l'aliment ne doivent cependant pas excéder 20 %. Au-delà, celui-ci induit une hyperglycémie persistante qui affecte les performances de croissance de la truite arc-en-ciel comme mentionné plus haut.

#### *Limitations en acides aminés essentiels*

Les taux protéiques des matières premières végétales utilisées dans les aliments piscicoles sont plus faibles que celles des farines de poissons qui en contiennent environ 70 %. En effet, la matière première végétale la plus riche en protéines est le tourteau de soja avec un taux protéique oscillant entre 48 et 55 %, viennent ensuite le tourteau de colza (environ 41 %) et le pois (26 %). Afin d'atteindre des teneurs protéiques comparables à celles des farines de poisson, différentes matières premières végétales peuvent subir des techniques d'enrichissements/purifications afin d'obtenir des concentrés protéiques notamment de soja (63-69 %), de gluten de blé (81-90 %) et de maïs (63-70 %). Cependant ces concentrés protéiques sont plus onéreux que les matières premières végétales brutes et ne sont donc inclus qu'en quantité limitée dans les aliments (Médale et al., 2013).

**Tableau 3. Niveaux d'acides aminés essentiels dans les farines de poissons et matières premières végétales**

Les données sont présentés en pourcentage de la masse sèche. Les déséquilibres en acides aminés par rapport aux besoins de la truite sont indiqués en rouge. (NRC, 2011)

	Farine d'Anchois	Tourteau de Soja	Tourteau de Colza	Farine de Lupin	Pois dépelliculé	Gluten de Blé	Gluten de Maïs
<b>Arginine</b>	4,0	4,0	2,5	3,6	2,1	4,3	2,1
<b>Histidine</b>	1,7	1,4	1,2	0,8	0,6	2,3	1,3
<b>Isoleucine</b>	3,3	2,9	1,6	1,5	0,9	4,2	2,5
<b>Leucine</b>	5,4	4,2	2,8	2,6	1,7	7,1	10,3
<b>Lysine</b>	5,5	2,5	2,2	1,7	1,6	5,5	1,2
<b>Méthionine</b>	2,1	0,8	0,8	0,3	0,2	1,8	2,1
<b>Phénylalanine</b>	2,9	3,0	1,6	1,3	1,1	5,0	4,2
<b>Thréonine</b>	2,3	2,2	1,6	1,3	0,9	1,8	2,2
<b>Tryptophane</b>	0,8	0,8	0,5	0,3	0,2	1,2	0,3
<b>Valine</b>	3,8	3,0	2,1	1,4	1,1	4,5	3,0

De plus, bien que les concentrés protéiques de plantes présentent des taux protéiques équivalents à ceux des farines de poisson, leurs compositions en acides aminés ne correspondent pas aux besoins nutritionnels de la truite arc-en-ciel. En effet, ils sont souvent déséquilibrés en certains AAE selon les sources végétales protéiques utilisées (Tableau 3) réduisant alors le ratio optimal AAE : AANE (de 57 : 43) pour la croissance des truites. Les deux

acides aminés essentiels les plus limitants dans les matières premières végétales sont la lysine et la méthionine. Des déficiences en arginine et tryptophane sont également souvent observées. Afin de pallier aux déficiences en acides aminés essentiels des matières premières végétales, ces dernières sont combinées afin de correspondre au mieux aux besoins en acides aminés de la truite mais cela s'avère souvent insuffisant pour obtenir des niveaux d'AAE équivalents à ceux des aliments contenant des farines de poisson.

Les aliments à base de végétaux étant souvent déficients en acides aminés essentiels malgré le mélange de plusieurs sources protéiques végétales, des acides aminés sous formes libres (crystalline) peuvent y être ajoutés afin de rééquilibrer les niveaux des acides aminés essentiels des aliments à base de plantes. Bien que l'addition d'acides aminés libres permette d'augmenter la croissance des truites nourries avec des aliments dépourvus de farines et huiles de poisson, celle-ci est toujours inférieure à celles observées chez les animaux nourris avec des aliments traditionnels <sup>87 88</sup>.

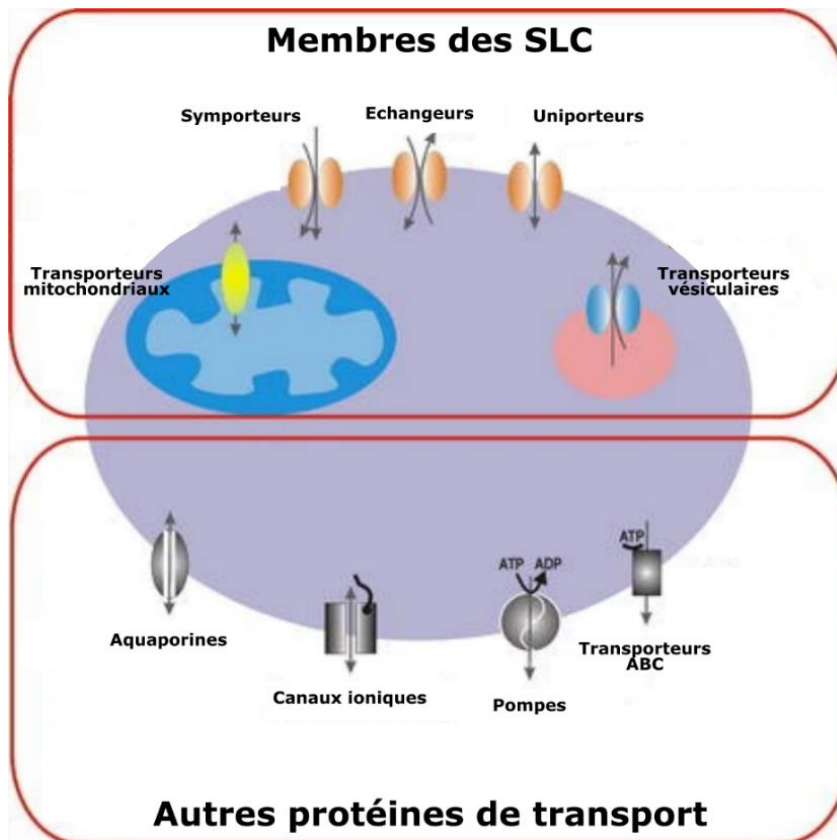




## Partie II : Le transport d'acides aminés cationiques

### A- Les transporteurs d'acides aminés

La superfamille des *SLC*, pour *SoLute Carrier*, regroupe des gènes codant pour des protéines de transport membranaires, excluant les canaux ioniques, les aquaporines et les transporteurs ABC (ATP binding cassette) <sup>114</sup> (Figure 4).



**Figure 4. Les différents types de transporteurs transmembranaires appartenant à la superfamille des SLC (SoLute Carrier)**

*Adapté de Hediger et al., 2004*

Les transporteurs d'acides aminés ont été principalement étudiés et caractérisés chez des espèces mammifères. La plupart de ces études s'intéressant aux transporteurs humains et murins, cette partie du manuscrit décrit les principales caractéristiques et rôles des transporteurs d'acides aminés cationiques connus chez ces deux espèces avant d'aborder le peu de données existantes concernant le transport des acides aminés chez les poissons.

#### a. La famille des SLC

Ces protéines permettent le transport de nombreux composés tels que les sucres, les nucléotides, les ions inorganiques, les drogues et les acides aminés à travers les membranes

biologiques. Ces transporteurs sont situés pour la plupart dans la membrane plasmique, permettant le contrôle d'influx et d'efflux de leurs substrats dans les cellules. Cependant, certains sont également localisés sur les membranes des vésicules et des organelles tels que les lysosomes, les mitochondries et le réticulum endoplasmique, permettant le transport de leurs substrats entre les différents compartiments cellulaires.

Chez l'Homme, les *SLC* incluent 458 gènes codant des transporteurs, répartis dans 66 familles différentes (<http://slc.bioparadigms.org/>). Leur nomenclature a été établie dans les années 1990 par Mathias Hediger en collaboration avec Phyllis Mc Alpine du comité de nomenclature des gènes HUGO (HGNC). Le nom des différents gènes est constitué de l'acronyme « SLC » suivi du numéro de famille (1 à 66), puis d'une lettre de A à G désignant la sous-famille (souvent A car peu de familles contiennent des sous-familles) et enfin du numéro du gène dans la sous-famille. L'appartenance des membres au sein d'une même famille a été établie sur la base d'homologies de séquences en acides aminés, les membres d'une même famille devant partager plus de 20 % d'homologie.

Cependant les différentes familles présentent peu d'homologie entre elles <sup>114</sup>. Bien que certaines familles de *SLC* soient phylogénétiquement proches, leur appartenance à la famille des *SLC* est plutôt déterminée par leurs caractéristiques fonctionnelles <sup>115</sup>. En effet, les différentes familles de *SLC* sont fonctionnellement apparentées par le fait qu'elles permettent le transport de leurs substrats respectifs à travers les membranes biologiques en utilisant les gradient ioniques mis à part quelques exceptions <sup>115</sup> comme certains transporteurs d'acides aminés cationiques, sur lesquels nous reviendrons plus tard et qui utilisent la diffusion facilitée.

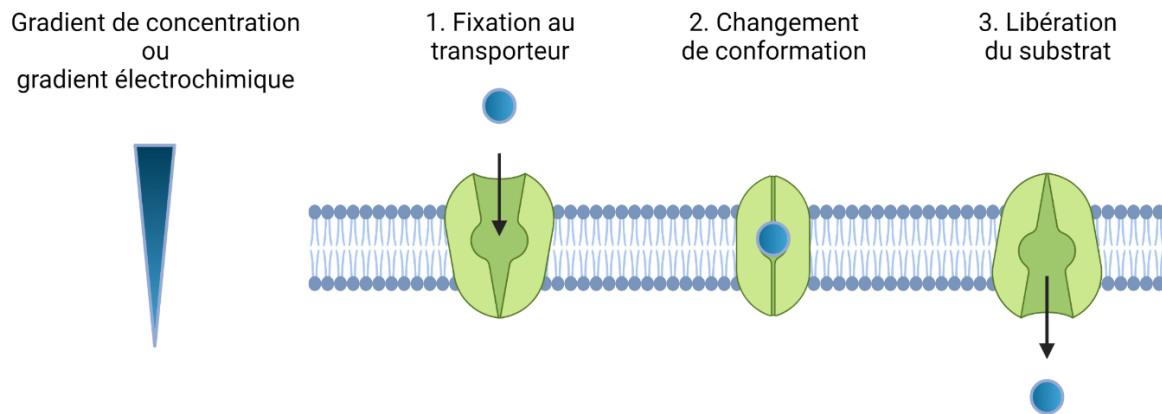
L'analyse phylogénétique des différentes familles de *SLC* de nombreuses espèces d'eucaryotes, mais aussi de procaryotes et archées, a démontré qu'au moins 13 familles de *SLC* seraient conservées chez les eucaryotes mais également qu'environ 50 % d'entre elles sont également présentes chez les procaryotes et les eucaryotes, révélant que certaines familles de *SLC* étaient déjà présentes chez l'ancêtre commun aux trois domaines du vivant <sup>115</sup>.

## b. Les différents systèmes de transport

### *Le transport passif*

Le transport passif repose sur la diffusion facilitée et ne nécessite pas d'énergie contrairement au transport actif. La diffusion facilitée suit les principes de la loi de diffusion de Fick qui consiste en un flux du compartiment où le soluté est le plus concentré vers celui où sa concentration est la moins élevée. Certaines petites molécules non polaires telles que le dioxygène ou le dioxyde de carbone peuvent diffuser librement à travers les membranes biologiques. Cependant, les molécules apolaires et celles de plus grandes tailles, telles que les acides aminés ou les sucres, qui sont hydrophiles ne peuvent diffuser à travers la bicouche lipidique constituant les membranes biologiques de nature hydrophobe. Des protéines membranaires sont alors nécessaires pour permettre leur déplacement à travers les membranes suivant le gradient électrochimique. Ces protéines membranaires appelées

uniporteurs ou perméases induirait le transport de leurs substrats après leur fixation d'un côté de la membrane qui changerait la conformation du transporteur et basculerait de l'autre côté de la membrane avant d'y relâcher le soluté (Figure 5). Les transporteurs passifs sont minoritaires dans la superfamille des SLC et représentent seulement 32 gènes répartis dans 11 familles, les autres étant des transporteurs actifs secondaires ou tertiaires.

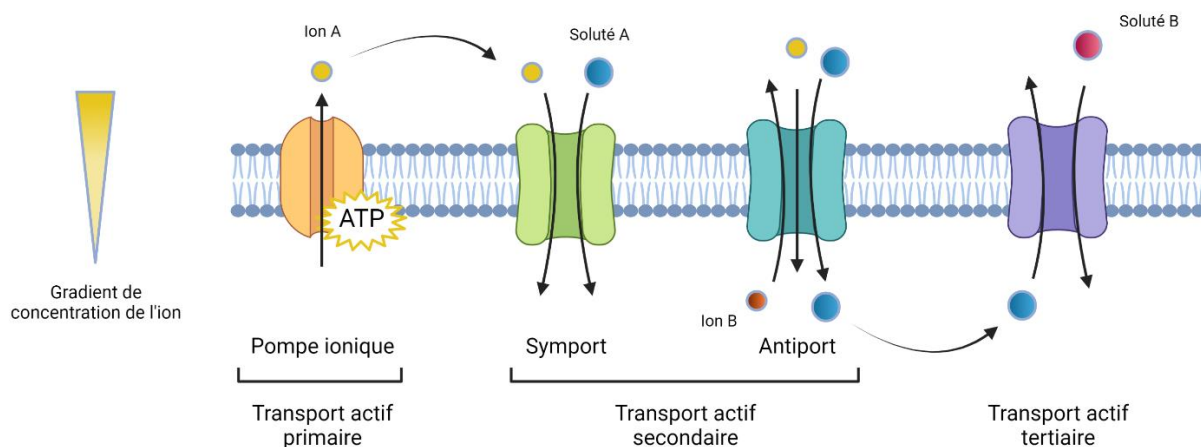


**Figure 5. Mécanisme de transport théorique des uniporteurs**

### *Les 3 types de transports actifs*

Certaines molécules ne peuvent être transportées par diffusion facilitée et doivent traverser les membranes contre le gradient de concentration ou électrochimique. Leurs flux sont alors assurés par des transporteurs requérant de l'énergie pour leur fonctionnement dits transporteurs actifs. Il existe trois types de transport actifs : le transport actif primaire, le transport actif secondaire et le transport actif tertiaire.

Le transport actif primaire nécessite de l'énergie sous forme d'ATP. Ces transporteurs ont une activité ATPasique qui va leur permettre d'utiliser l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP en ADP pour permettre le passage de leurs substrats à travers la membrane plasmique. Les transporteurs actifs primaires, ne font pas partie de la superfamille des SLC et regroupent les transporteurs ABC et les pompes à ions. Ces dernières permettent de générer un gradient électrochimique permettant le fonctionnement des transporteurs actifs secondaires. Ainsi, la pompe sodium/potassium permet, par transport actif de maintenir une concentration extracellulaire en sodium ( $\text{Na}^+$ ) plus importante que dans le cytoplasme, générant une force électromotrice utilisée par de nombreux transporteurs actifs secondaires (Figure 6).



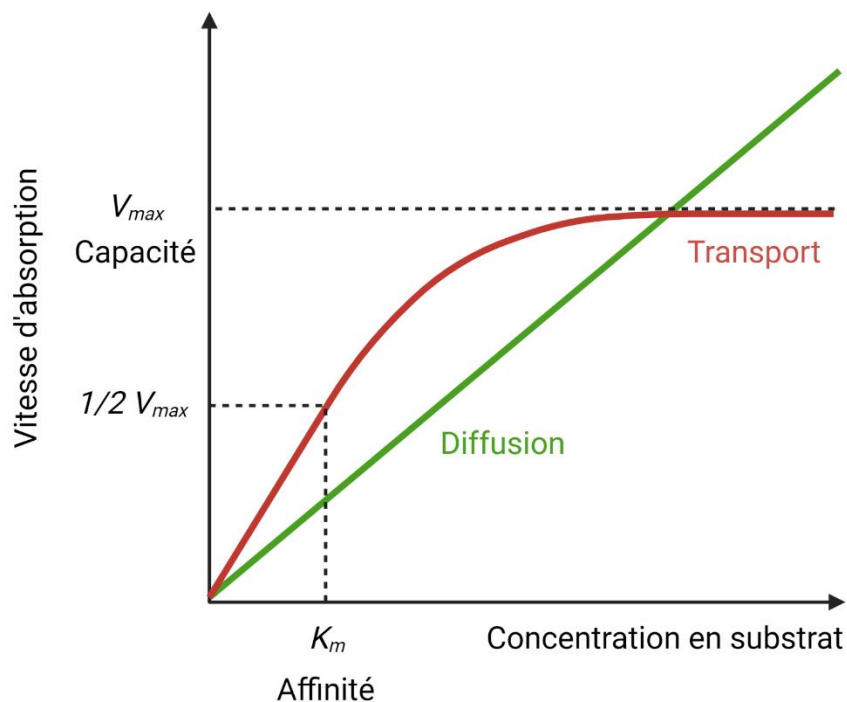
**Figure 6. Mécanismes de transport actif primaire, secondaire et tertiaire**

En effet, les transporteurs actifs secondaires sont appelés ainsi car ils ne puisent pas directement l'énergie nécessaire à leur fonctionnement dans l'hydrolyse de l'ATP mais indirectement en utilisant les gradients électrochimiques d'ions dits « moteurs » préalablement générés par les pompes à ions qui, elles, consomment de l'ATP. Après accumulation d'un ion moteur d'un côté de la membrane, le transporteur actif secondaire permet la diffusion facilitée de l'ion moteur dans le sens de son gradient électrochimique et ainsi le transport actif de ses substrats éventuellement contre son gradient de concentration. Le transport actif du soluté peut s'effectuer dans le même sens que la diffusion facilitée de l'ion moteur, on parle de symport ou co-transport, ou dans le sens opposé, on parle alors d'antiport ou échange (Figure 6).

Le transport actif peut également s'effectuer grâce à la force motrice engendrée par le gradient de concentration d'un soluté qui a été générée par un transporteur actif secondaire. On parle alors de transport actif tertiaire, celui-ci ne se servant pas directement de la force motrice générée par un transport actif primaire. Ces transporteurs permettent les échanges d'acides aminés indépendamment des ions (Figure 6).

## Affinité et capacité

Bien qu'une molécule ne soit pas modifiée par le transporteur permettant son passage à travers la bicouche lipidique, son transport peut être assimilé à une réaction entre une enzyme et son substrat et ainsi se caractériser selon l'équation de Michaelis-Menten. Contrairement aux canaux permettant la diffusion simple dont le flux est toujours proportionnel au gradient de concentration du soluté, les activités de transports sont saturées lorsque tous les sites de fixation aux substrats sont occupés, l'activité de transport peut alors être caractérisée selon l'équation de Michaelis-Menten avec une vitesse maximale d'absorption ( $V_{max}$ ) et une constante de Michaelis ( $K_m$ ) (Figure 7).



**Figure 7. Affinité et capacité des transporteurs membranaires répondent à l'équation de Michaelis-Menten**

Le cycle de transport d'une molécule est constitué de trois étapes, la fixation du substrat sur le transporteur d'un côté de la membrane, le changement de conformation du transporteur et finalement la libération du substrat de l'autre côté de la membrane. La  $V_{max}$  représente le nombre de cycles de transport maximal par unité de temps, elle est également appelée « capacité » des transporteurs. Plus la  $V_{max}$  d'un transporteur est élevée, plus sa capacité est dite grande. Le  $K_m$  correspond à la valeur de la concentration en substrat nécessaire pour atteindre la moitié de la  $V_{max}$  et représente l'aptitude du transporteur à fixer un substrat spécifique qui est nommé affinité. Ainsi, plus le  $K_m$  est faible, plus l'aptitude du transporteur à fixer son substrat à faible concentration et donc son affinité sont importantes. Si les activités de transport sont souvent décrites comme allant seulement d'un côté à l'autre de la membrane, les flux de substrats sont en fait réversibles. Les transporteurs présentent cependant des affinités et capacités différentes entre les 2 côtés de la membrane, ce qui influe sur le sens principal de transport du soluté.

### c. Les transporteurs d'acides aminés

Les membranes cellulaires ne sont pas perméables aux acides aminés, ainsi, l'influx et l'efflux d'acides aminés à travers la membrane plasmique nécessite des protéines de transport <sup>116</sup>. Les acides aminés sont les substrats pour lesquels le nombre de protéines de transport est le plus élevé. En effet, environ un quart des gènes *SLC* codent pour des transporteurs d'acides aminés <sup>117</sup>. Les transporteurs d'acides aminés permettent l'absorption intestinale des acides aminés alimentaires et leurs efflux dans la circulation sanguine mais également l'absorption et le transfert des acides aminés entre les organes, les cellules et entre les différents compartiments cellulaires.

#### *Transport contre le gradient électrochimique*

Les acides aminés sont généralement accumulés par les cellules et leurs concentrations intracellulaires sont supérieures à celles du milieu extracellulaire tel que le plasma <sup>118</sup>. Ils doivent donc, pour la grande majorité d'entre eux, être absorbés contre leurs gradients de concentration par le biais de transporteurs actifs, à l'exception des acides aminés cationiques, qui étant chargés positivement, peuvent être absorbés par des transporteurs passifs grâce à la différence de charge avec la charge négative des cellules. Les acides aminés sont alors absorbés soit par des uniporteurs, soit par des transporteurs actifs secondaires qui utilisent comme source d'énergie le gradient électrochimique d'ions tels que les ions hydronium ( $H_3O^+$ ) (simplifié en  $H^+$  dans la suite de ce manuscrit), le potassium ( $K^+$ ), les ions chlorure ( $Cl^-$ ), les ions hydroxyde ( $OH^-$ ) et principalement le sodium ( $Na^+$ ) en symport ou antiport <sup>119</sup>.

#### *Les différents transporteurs d'acides aminés*

L'étude des transporteurs d'acides aminés chez les mammifères a été initiée par Halvor Christensen dans les années 1960. Il avait établi que les transporteurs d'acides aminés permettent les flux entrant ou sortant de groupes d'acides aminés structurellement semblables tels que les acides aminés cationiques, anioniques, petits neutres et grands neutres plutôt que d'un acide aminé spécifique <sup>120</sup>. Ainsi un même acide aminé peut être le substrat de transporteurs différents. Les transporteurs impliqués dans le transport d'un acide aminé peuvent différer d'un type cellulaire à un autre. Cependant, un type cellulaire peut également exprimer différents transporteurs pour un même substrat.

Chez l'Homme, il existe 67 gènes codant pour des transporteurs d'acides aminés répartis dans 13 familles de *SLC* : les transporteurs à haute affinité de glutamate et acides aminés neutres (*SLC1*), les transporteurs de neurotransmetteurs  $Na^+$  et  $Cl^-$  dépendants (*SLC6*), les transporteurs de monocarboxylates (*SLC16*), les transporteurs vésiculaires de glutamate (*SLC17*), les transporteurs mitochondriaux (*SLC25*), le transporteur vésiculaire d'acides aminés inhibiteurs (*SLC32A1*), les transporteurs d'acides aminés couplés aux protons (*SLC36*), les transporteurs d'acides aminés couplés au  $Na^+$  des systèmes A et N (*SLC38*), les transporteurs d'acides aminés  $Na^+$ -indépendants du système L-like (*SLC43*), les transporteurs lysosomaux d'acides aminés (*SLC66*), les chaînes lourdes des transporteurs hétérodimériques d'acides aminés (*SLC3*) et les transporteurs passifs d'acides aminés cationiques et les chaînes légères des transporteurs hétérodimériques (constituant tout deux le groupe des *SLC7*)

(<http://slc.bioparadigms.org/>)<sup>121</sup>. Avant la caractérisation moléculaire des différents transporteurs d'acides aminés connus aujourd'hui, ceux-ci étaient classés en « systèmes » selon diverses caractéristiques dont leurs substrats, leur mode de transport (uniport, symport ou antiport), et leur dépendance au Na<sup>+</sup> (Tableau 4).

**Tableau 4. Les différents systèmes et transporteurs correspondant**

Système	Transporteur	Gène	Acides aminés substrats	Mécanisme de transport	Dépendance aux ions
A	SNAT1	SLC38A1	AA neutres à chaîne latérale courte	Symport	Na <sup>+</sup>
	SNAT2	SLC38A2			
	SNAT4	SLC38A4			
ASC	ASCT1	SLC1A4	A, S, C et Q	Antiport	Na <sup>+</sup>
	ASCT2	SLC1A5			
BETA	GAT1	SLC6A1	GABA, betaine et taurine	Symport	2 Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup>
	GAT2	SLC6A13			
	GAT3	SLC6A11			
	BGT1	SLC6A12			
	TauT	SLC6A6			
Gly	GLYT1	SLC6A9	G et sarcosine	Symport	2 Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup>
	GLYT2	SLC6A5			
B0	B <sup>(0)</sup> AT1	SLC6A19	AA neutres	Symport	Na <sup>+</sup>
IMINO	XTRP3	SLC6A20	P	Symport	Na <sup>+</sup>
asc	ASC1	SLC7A10/SLC3A2	Petits AA neutres	Antiport	
imino	PAT1	SLC36A1	Petits AA neutres	Symport	H <sup>+</sup>
	PAT2	SLC36A2			
	PAT 4	SLC36A4			
L	LAT1	SLC7A5/SLC3A2	AA neutres larges	Antiport	-
	LAT2	SLC7A8/SLC3A2			



Système	Transporteur	Gène	Acides aminés substrats	Mécanisme de transport	Dépendance aux ions
X <sup>-</sup> <sub>AG</sub>	EAAT1	SLC1A3	AA anioniques	Antiport	3 Na <sup>+</sup> et H <sup>+</sup> (symport) K <sup>+</sup> (antiport)
	EAAT2	SLC1A2			
	EAAT3	SLC1A1			
	EAAT4	SLC1A6			
	EAAT5	SLC1A7			
X <sup>-c</sup>	xCT	SLC7A11/SLC3A2	AA anioniques	Antiport	-
B <sup>0,+</sup>	ATB(0,+)	SLC6A14		Symport	2 Na <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup>
γ <sup>+</sup> L	γ <sup>+</sup> LAT1	SLC7A7/SLC3A2	AA cationiques contre AA neutres	Antiport	Na <sup>+</sup> pour les AA neutres
	γ <sup>+</sup> LAT2	SLC7A6/SLC3A2			
b <sup>0,+</sup>	B <sup>0,+</sup> AT	SLC7A9/SLC3A1	AA cationiques contre AA neutres	Antiport	-
γ <sup>+</sup>	CAT1	SLC7A1	Acides aminés cationiques	Uniport	-
	CAT2	SLC7A2			
	CAT3	SLC7A3			

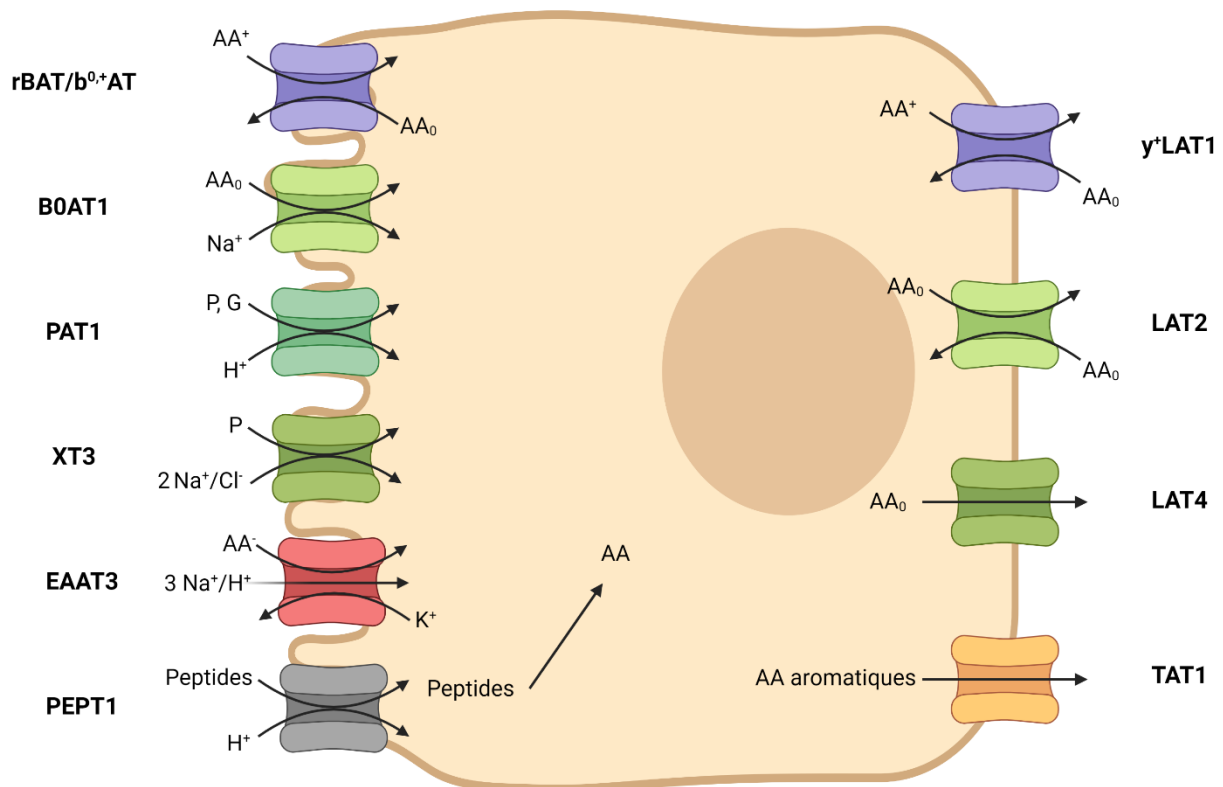
Suite et fin du tableau 4

Chaque système était considéré comme correspondant à un transporteur d'acides aminés unique. Par la suite, la caractérisation moléculaire des transporteurs d'acides aminés, dans les années 1990, a montré qu'il existait plusieurs transporteurs pour la plupart des systèmes définis (Tableau 4). Aujourd'hui, cette classification a été remplacée par la classification des SLC, basée sur l'homologie des séquences en acides aminés des différents transporteurs plutôt que par les caractéristiques de leur activité de transport. Ainsi, des transporteurs d'acides aminés classés dans différents systèmes à l'origine, sont aujourd'hui classés dans les mêmes familles de la classification des SLC et réciproquement. Les trois systèmes de transporteurs d'acides aminés cationiques γ<sup>+</sup>, γ<sup>+</sup>L, b<sup>0,+</sup>, qui seront abordés dans la suite de ce manuscrit, ont ainsi été regroupés avec des transporteurs appartenant aux systèmes de transport d'acides aminés neutres (asc, Xc et L) dans la famille des SLC7.

## Absorption intestinale des acides aminés

Les acides aminés essentiels ne peuvent être synthétisés, ou du moins en quantité suffisante, par l'organisme. Ils doivent donc être apportés par l'alimentation et absorbés par le système digestif. L'absorption intestinale des acides aminés essentiels issus de l'alimentation est donc primordiale pour assurer l'homéostasie des acides aminés dans l'organisme et alimenter les divers tissus. L'absorption post-prandiale des acides aminés est donc ainsi assurée, après digestion des protéines, par les transporteurs d'acides aminés. Les peptides également issus de la digestion des protéines sont, eux, absorbés par le transporteur de di/tripeptides PepT1 (SLC15A1)<sup>122</sup>. Une fois absorbés par les entérocytes, ces peptides sont hydrolysés en acides aminés et peuvent être transportés vers le plasma par des transporteurs d'acides aminés différents de ceux de la face apicale qui, eux, permettent leur efflux des entérocytes.

L'absorption au niveau de la membrane apicale des entérocytes est assurée par différents transporteurs selon les groupes d'acides aminés (Figure 8).



**Figure 8. Transporteurs d'acides aminés impliqués dans l'absorption intestinale**

AA<sup>+</sup> : acides aminés cationiques, AA<sup>-</sup> : acides aminés anioniques, AA<sub>0</sub> : acides aminés neutres, P : proline, G : glycine

Ainsi, les acides aminés neutres sont préférentiellement absorbés par le transporteur BOAT1 (SLC6A19)<sup>123</sup>, les acides aminés anioniques par le transporteur d'acides aminés excitateurs 3 (EAAT3) codé par SLC1A1<sup>124</sup>, la proline par XT3 (SLC6A20)<sup>125</sup>, tout cela en symport avec le Na<sup>+</sup>. La proline et la glycine peuvent également être absorbés par PAT1 en symport avec un

proton <sup>126</sup>. Les acides aminés cationiques ainsi que la cystine sont, eux, absorbés par le transporteur hétérodimérique rBAT/b<sup>0,+</sup>AT <sup>127</sup>, dont les deux sous-unités sont respectivement codées par les gènes SLC3A1 et SLC7A9, ce dernier étant abordé plus en détails dans la suite de ce manuscrit.

Par la suite, les acides aminés absorbés doivent traverser la membrane basolatérale des entérocytes afin d'atteindre la circulation sanguine et être redistribués dans les différents tissus de l'organisme. La plupart des acides aminés neutres semblent être transportés par diffusion facilitée, quand leurs concentrations dans les entérocytes sont supérieures à celles du plasma, par LAT4 codé par SLC43A2 ainsi que par TAT1 pour les acides aminés aromatiques (Figure 8). L'efflux de ces acides aminés neutres permet alors leur échange contre des acides aminés neutres larges comme la leucine et la glutamine par LAT2 et permettant l'efflux de ces derniers <sup>128</sup>. L'efflux des acides aminés cationiques est, lui, opéré principalement par l'échangeur  $\gamma^+$ LAT1 contre des acides aminés neutres <sup>129</sup>.

Le rôle de ces différents transporteurs dans l'absorption intestinale et la réabsorption rénale de leurs substrats est illustré par les différentes maladies causées par les mutations des gènes codant pour ces transporteurs. Ces maladies sont représentées par la cystinurie <sup>130</sup>, la maladie d'Hartnup <sup>131</sup>, l'intolérance lysinurique aux protéines <sup>132</sup>, l'aminocidurie dicarboxylique <sup>133</sup> et l'iminoglycinurie <sup>134</sup> et se caractérisent respectivement par l'altération de l'absorption intestinale et l'excrétion excessive dans les urines des substrats de ces transporteurs.

## B- Les transporteurs d'acides aminés cationiques (TAACs)

L'étude du transport des acides aminés cationiques a commencé à être caractérisée par Christensen et ses collaborateurs à la fin des années 1960. Ils avaient déterminé que le transport d'acides aminés cationiques était opéré par un transporteur indépendant au Na<sup>+</sup> et interagissant faiblement avec les acides aminés neutres en présence de Na<sup>+</sup> <sup>135</sup> <sup>136</sup>. Ce système fut nommé  $\gamma^+$  par White et ses collaborateurs. Il a été compris par la suite que ces caractéristiques de transport d'acides aminés cationiques étaient dues à différents systèmes de transport d'acides aminés cationiques.

Les systèmes B<sup>0,+</sup> et b<sup>0,+</sup> ont ensuite été identifiés, par Van Winkle et ses collaborateurs dans des blastocystes murins. Ceux-ci transportent les acides aminés neutres et cationiques avec des affinités similaires, différant seulement par leur dépendance au Na<sup>+</sup> <sup>137</sup> <sup>138</sup>. Les transports par B<sup>0,+</sup> et b<sup>0,+</sup> étant respectivement dépendant et indépendant au Na<sup>+</sup>.

Finalement, le système  $\gamma^+$ L a été caractérisé par Devès et ses collaborateurs dans des érythrocytes humains. Ils ont montré que ce système transporte une fraction des acides aminés cationiques de façon Na<sup>+</sup> indépendante et les acides aminés neutres de manière Na<sup>+</sup> dépendante <sup>139</sup> et suggéré qu'il permet préférentiellement l'efflux d'acides aminés cationiques et l'influx d'acides aminés neutres. Ils ont également attribué le transport de la fraction d'acides aminés cationiques non transportée par le système  $\gamma^+$ L, au système  $\gamma^+$ . En outre, des résultats obtenus après le clonage du premier transporteur d'acides aminés chez la souris ont montré qu'il ne transportait pas les acides aminés neutres, et cela même en

présence de Na<sup>+</sup> <sup>140</sup> <sup>141</sup>. Ils ont alors redéfini le système γ<sup>+</sup> comme un transporteur Na<sup>+</sup> indépendant spécifique des AAC <sup>139</sup> (Tableau 4).

Dans les paragraphes suivants, les descriptions des différents TAAC seront succinctement effectuées, à l'exception des deux sous-familles dites des CATs et des γ-LATs qui recevront une attention particulière pour des raisons en relations avec notre hypothèse de travail énoncée par la suite.

#### a. Les CATs

Chez la souris, CAT1 (Cationic Amino acid Transporter 1) a été le premier transporteur d'acides aminés cloné. Cette protéine avait d'abord été identifiée comme le récepteur du virus de la leucémie murine. L'analyse de sa séquence a permis de mettre en évidence des ressemblances avec les perméases à l'arginine et à l'histidine de *Saccharomyces cerevisiae* <sup>142</sup>. Le clonage et l'injection de l'ARN messager codant pour cette protéine dans des oocytes de xénope (*Xenopus laevis*) ont permis de déterminer qu'elle permettait l'absorption des acides aminés cationiques : arginine, lysine et ornithine de façon indépendante au Na<sup>+</sup> correspondant aux caractéristiques du système γ<sup>+</sup> <sup>140</sup> <sup>141</sup>. Les autres CATs ont ensuite pu être plus facilement identifiés par homologie de séquence avec CAT1.

**Tableau 5. Caractéristiques des transporteurs de la sous-famille des CATs**

(Closs et al., 1997) (Vékony et., al 2001)

Gène	Transporteur	Substrats	Mécanisme de transport	Affinité pour l'arginine (μM)	Capacité pour l'arginine (pmol/oocyte/min)	Expression tissulaire
SLC7A1	CAT1	R, K, O (Cit)	Uniport	70–150	20-30	Ubiquitaire sauf le foie
SLC7A2	CAT2-A	R, K, O	Uniport	3360–3900	40-140	Foie, muscle, pancréas
	CAT2-B	R,K,O	Uniport	120-250	20-60	Inductibles dans différents types cellulaires
SLC7A3	CAT3	R, K, O	Uniport	200-500	20	Thymus, cerveau, ovaire, testicule,
SLC7A4	CAT4	Inconnu	Inconnu	-	-	Cerveau, testicule, placenta
SLC7A14	-	inconnu	inconnu	-	-	Système nerveux central

### Les différents CATs

La sous-famille des CATs comprend 6 transporteurs codés par 5 gènes. Quatre d'entre eux sont des transporteurs d'acides aminés cationiques confirmés dont CAT1 (SLC7A1), CAT3 (SLC7A3) ainsi que CAT2-A et CAT2-B, deux variants issus de l'épissage alternatif de SLC7A2<sup>143</sup>. Ils présentent, entre eux, une homologie de séquences en acides aminés d'environ 60%. Les transporteurs CAT1, CAT2-B et CAT3 ont des caractéristiques très proches les uns des autres, ils font partie du système  $\gamma^+$ , excluant CAT2-A qui présente des activités différentes (Tableau 5).

Les deux autres gènes constituant cette sous-famille, SLC7A4 et SLC7A14, ont pour leurs parts été ajoutés à la sous-famille des CATs de par leur homologie (38-40%) avec ces derniers. Cependant, qu'il s'agisse de SLC7A14 ou de SLC7A4, parfois appelé CAT4, aucune activité de transport pour les acides aminés cationiques ou les autres acides aminés n'a cependant été observée en relation avec l'expression de ces gènes. En effet, bien que CAT4 soit exprimé à la membrane plasmique, sa surexpression dans des oocytes de xénope (*Xenopus laevis*) et dans des cellules humaines n'induit pas d'influx ou d'efflux cellulaires d'acides aminés<sup>144</sup>. Il en est de même pour SLC7A14, qui serait un transporteur intracellulaire, localisé à la membrane lysosomale<sup>145 146</sup>. Jaenecke et ses collaborateurs ont tout de même montré qu'un transporteur chimérique composé du squelette de CAT2 et du domaine « fonctionnel » théorique de SLC7A14 induit une activité de transport<sup>146</sup>. Ces résultats démontrent que le domaine catalytique de SLC7A14 est bien fonctionnel. En outre, cette étude montre que SLC7A14 est exprimé dans les lysosomes et que sa faible activité de transport diminue à des pH faibles. Ils en ont donc conclu que SLC7A14 permettrait l'influx lysosomal d'arginine et lysine mais avec des activités de transport très faibles, voire même difficilement détectables.

### Expression tissulaire

CAT1 est exprimé ubiquitairement et est considéré comme le principal transporteur d'acides aminés cationiques dans la plupart des tissus, il est cependant peu exprimé dans les glandes lacrymales<sup>147</sup> et dans le foie. CAT2-A, lui, est au contraire peu exprimé dans la plupart des tissus excepté le foie, où il est le plus abondant ainsi que faiblement dans les cardiomyocytes et le muscle squelettique<sup>148</sup>. CAT2-B est, quant à lui, peu exprimé constitutivement, mais son expression est cependant induite en cas d'infection ou d'inflammation dans les poumons<sup>149</sup> et les macrophages<sup>150</sup>. CAT3 est également peu exprimé dans la plupart des tissus chez les mammifères adultes et serait plus exprimé pendant le développement. A l'âge adulte, CAT3 est spécifique du cerveau chez le rat<sup>151</sup> et la souris<sup>152</sup> alors que chez l'homme il est également exprimé dans les tissus périphériques et particulièrement dans le thymus<sup>153</sup>.

CAT4 est également exprimé dans le cerveau ainsi que dans les testicules et le placenta<sup>154</sup>. SLC7A14 quant à lui est plus exprimé dans les tissus du système nerveux central chez la souris<sup>155</sup>.

## Substrats

Les 4 CATs pour lesquels une activité de transport a été observée reconnaissent les mêmes substrats comprenant les stéréoisomères L de l'arginine et ses analogues, la lysine et l'ornithine. La seule différence en terme de reconnaissance de substrats se trouve dans la capacité de CAT1 de transporter la L-histidine sous sa forme protonée à pH faible, entre 5.5 et 7.5<sup>140</sup> alors que CAT3 en est incapable<sup>153</sup>. CAT3 présente également une affinité plus faible pour la lysine que CAT1 et CAT2-B<sup>152</sup>.

Bien que les différents CATs reconnaissent les mêmes substrats ils présentent des caractéristiques de transport différentes. Ainsi, CAT1 a une affinité plus élevée pour les acides aminés cationiques ( $K_m$  compris entre 70 et 150  $\mu\text{M}$ <sup>156 140</sup> que CAT3 (entre 200 et 500  $\mu\text{M}$ )<sup>152 157</sup> et CAT2-B<sup>156 153</sup>. CAT2-A, lui, a une affinité pour les acides aminés cationiques, jusqu'à 10 fois moins importante que celle de CAT2-B mais une vitesse d'absorption maximale bien plus élevée que les autres CATs (Tableau 5).

CAT1 et CAT3 peuvent également transporter des acides aminés neutres comme la méthionine et la cystéine ainsi que des acides aminés anioniques tels que l'aspartate et le glutamate avec des affinités cependant très faibles rendant cela physiologiquement très improbable<sup>152 141 151</sup>.

## Diffusion facilitée

Les CATs permettent la diffusion facilitée des acides aminés cationiques et sont ainsi les seuls uniporteurs d'acides aminés connus pour être exprimés à la membrane plasmique. Cela est dû à la particularité de leurs substrats, les acides aminés cationiques, qui sont chargés positivement à pH physiologique. Le milieu intracellulaire étant chargé négativement, cela crée un gradient électrochimique négatif entre le milieu extracellulaire et intracellulaire, « motorisant » ainsi la diffusion facilitée des acides aminés cationiques contre leurs gradients de concentrations. Les activités de transport des CATs dépendent donc du potentiel de membrane.

Ainsi, il a été démontré qu'une hyperpolarisation de la membrane induit une augmentation de l'absorption de lysine dans les cellules de placenta<sup>158</sup> et d'arginine dans 2 lignées cellulaires d'ovaires d'hamster<sup>159</sup> par le système  $\gamma^+$ . De plus, ces études montrent également que la dépolarisation de la membrane inhibe fortement l'absorption d'arginine et lysine par le système  $\gamma^+$ . Cela est également observé dans des oocytes de xénope exprimant CAT1, dans lesquels, l'hyperpolarisation de la membrane augmente l'influx d'arginine alors que sa dépolarisation provoque l'efflux d'arginine préchargée<sup>160</sup>. Le pH ayant également un effet sur les charges des molécules et sur le potentiel membranaire, celui-ci a logiquement un impact sur les activités de transport des CATs. Ceux-ci présentent toutefois des sensibilités au pH différentes. En effet, le transport d'acides aminés cationiques par CAT1 et CAT3 varie très peu en fonction du pH et reste constant pour des pH compris entre 5.5 et 8.5<sup>153 161</sup>. Le transport par CAT2-A et CAT2-B est, quant à lui, dépendant du pH. En effet, à pH 5.5, les activités de transport d'arginine par CAT2-A et CAT2-B sont environ deux fois moins importantes qu'à pH 7.5<sup>161</sup>.

## b. Les échangeurs hétérodimériques d'acides aminés cationiques ( $\gamma^+$ LATs)

### Structure des hétérodimères

Les transporteurs  $\gamma^+$ LAT1 et  $\gamma^+$ LAT2 font également partie de la famille de transporteurs des SLC7 et plus particulièrement de la sous-famille des transporteurs hétérodimériques d'acides aminés (Tableau 6).

**Tableau 6. Caractéristiques des transporteurs hétérodimériques d'AA**

Gène	Transporteur	Substrats	Mécanisme de transport	Affinité pour l'arginine ( $\mu$ M)	Capacité pour l'arginine	Expression
<b>Sous-unités catalytiques des transporteurs hétérodimériques</b>						
SLC7A7	$\gamma^+$ LAT1	R, K, O contre Q, H, M, L	Antiport	182	3822 $\mu$ mol/mg de protéine/min	Intestin, rein, rate, leucocytes, placenta, poumon, membrane basolatérale des cellules épithéliales
SLC7A6	$\gamma^+$ LAT2	R, K, O contre Q, H, M, L, A, C	Antiport	120	14.9-19.2 pmol/oocyte/min	Cerveau, intestin, testicule, glandes salivaires, cœur, rein, poumon, thymus
SLC7A9	rBAT/ $b^{0,+}$ AT	AA cationiques et AA neutres larges	Antiport	65	100 pmol/oocyte/min	Rein, intestin, foie, placenta
<b>Chaines lourdes des transporteurs hétérodimériques</b>						
SLC3A2	4F2hc	-	Localisation des $\gamma^+$ LATs	-	-	Ubiquitaire
SLC3A1	rBAT	-	Localisation de rBAT/ $B^0+$ AT	-	-	Rein, intestin, foie, pancréas

Ces transporteurs, sont comme leur nom l'indique, constitués de deux sous-unités protéiques, une chaîne légère faisant partie de la famille des SLC7 (de SLC7A5 à SLC7A13 et SLC7A15) qui assure la fonction de transport de leurs substrats et une chaîne lourde appartenant à la famille des SLC3 qui ne compte que deux membres SLC3A1 et SLC3A2.

Parmi les transporteurs hétérodimériques, 3 transporteurs sont des transporteurs d'acides aminés cationiques : rBAT/B0+AT constitués de SLC3A1 et SLC7A9 ainsi qu' $\gamma^+$ LAT1 et  $\gamma^+$ LAT2 qui sont formés respectivement des chaînes légères SLC7A7 et SLC7A6 et de la chaîne lourde SLC3A2 (Tableau 6).

### *L'unité lourde SLC3A2*

L'unité lourde codée par le gène SLC3A2 a plusieurs noms, elle est aussi nommée 4F2hc (4F2 cell-surface antigen heavy chain) et CD98hc (CD98 heavy chain). Cette protéine initialement décrite comme faisant partie d'un antigène à la membrane cellulaire des lymphocyte T conduisant à leur activation <sup>162</sup>, s'est vue attribuer, depuis, de nombreuses fonctions. Elle est impliquée dans la signalisation des  $\beta$ -intégrines <sup>163 164 165</sup> jouant un rôle dans la survie, la prolifération, la migration, l'adhésion et la fusion cellulaires <sup>166 167</sup>.

L'une des principales fonctions de 4F2hc reste l'adressage des sous-unités légères SLC7 à la membrane plasmique. Contrairement aux CATs qui sont glycosylés, ce qui permet l'intégration des protéines membranaires d'intégrer les membranes biologiques <sup>168</sup>, les sous-unités légères ne le sont pas, ce qui empêche leur intégration aux membranes biologiques. Pour intégrer les membranes, les unités légères se lient à la sous-unité lourde 4F2hc, qui elle est glycosylée, par un pont disulfure au niveau d'un résidu cystéine (Cys-109) <sup>169 170</sup>. La surexpression de SLC7A6 et SLC7A7 sans la surexpression 4F2hc ne permet ni leur adressage dans la membrane plasmique ni l'activité de transport d' $\gamma^+$ LAT1 et  $\gamma^+$ LAT2 <sup>169</sup>. Cependant, la surexpression de 4F2hc dans les oocytes de xénope induit des activités de transport correspondant au système  $\gamma^+$ L <sup>171 172</sup> et du système L <sup>173 174</sup> probablement dues à l'expression constitutive d'unités catalytiques dans les oocytes <sup>175</sup> démontrant que l'expression de 4F2hc est un facteur limitant pour l'absorption d'acides aminés par les transporteurs  $\gamma^+$ L.

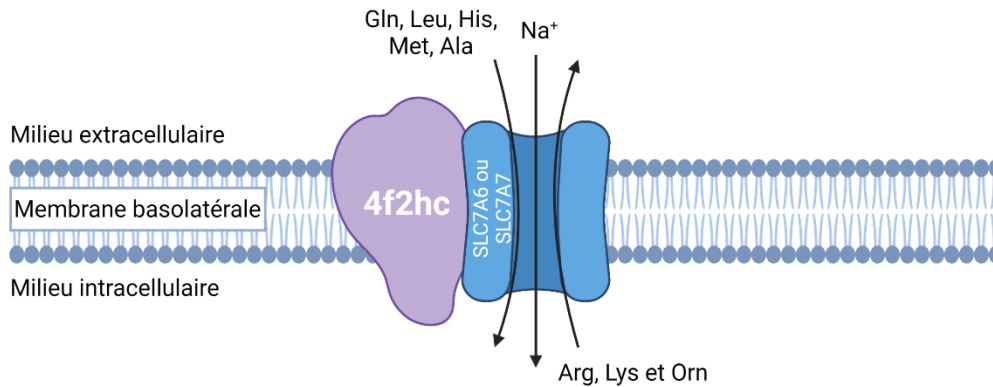
### *Les unités légères SLC7A6 et SLC7A7*

Les acides aminés cationiques, du fait de leur charge positive, sont accumulés principalement par les cellules *via* les CATs et l'hétérodimère rBAT/B0+AT. Cependant, pour assurer les échanges inter-organes d'acides aminés cationiques, certains types cellulaires doivent être capables d'excréter ces acides aminés. Cette fonction est assurée par les transporteurs  $\gamma^+$ LAT qui assurent cet efflux d'acides aminés cationiques des cellules épithéliales.

Initialement,  $\gamma^+$ LAT1 et  $\gamma^+$ LAT2 ont été identifiés par homologie avec LAT1, puis, il a été démontré dans les oocytes de xénope, qu'ils fonctionnaient tel que le système  $\gamma^+$ L et non comme le système L quand ils étaient co-exprimés avec 4F2hc <sup>176 169</sup>.



En effet,  $\gamma^+$ LAT1 et  $\gamma^+$ LAT2 sont des échangeurs strictes d'un acide aminé neutre avec un ion  $\text{Na}^+$  contre un acide aminé cationique rendant l'échange électroneutre <sup>176 169 177</sup> (Figure 9).



**Figure 9. Echange des acides aminés cationiques contre les acides aminés neutres par les  $\gamma^+$ LATs**

$\gamma^+$ LAT1 est exprimé dans les poumons et le placenta mais principalement dans les cellules épithéliales de l'intestin et des reins où il est localisé à la membrane basolatérale.  $\gamma^+$ LAT2 est également exprimé dans les reins et l'intestin, cependant le rapport de l'expression de  $\gamma^+$ LAT1/ $\gamma^+$ LAT2 y est très haut <sup>178</sup>.  $\gamma^+$ LAT2 est cependant exprimé dans un plus large panel de tissus que  $\gamma^+$ LAT1, incluant le cerveau, le cœur, les testicules <sup>179</sup>.

### Substrats

Ces deux échangeurs ont beaucoup de caractéristiques en commun dont des affinités pour les acides aminés similaires avec des  $K_m$  pour l'arginine d'environ 182  $\mu\text{M}$  pour  $\gamma^+$ LAT1 dans les macrophages et de 145  $\mu\text{M}$  pour  $\gamma^+$ LAT2 dans les fibroblastes <sup>180</sup>. La seule différence se trouve dans les acides aminés neutres qu'ils transportent (Tableau 6). En effet, l'échange des acides aminés cationiques par  $\gamma^+$ LAT2 est possible contre un spectre d'acides aminés neutres moins large avec seulement la leucine, l'histidine, la méthionine et la glutamine <sup>179</sup> alors que  $\gamma^+$ LAT1 peut également transporter l'alanine.

Les transporteurs  $\gamma^+$ LATs peuvent également induire l'efflux des acides aminés neutres. Seulement, l'efflux des acides aminés neutres nécessite des concentrations intracellulaires élevées en  $\text{Na}^+$ . La concentration intracellulaire en  $\text{Na}^+$  étant faible, le transport des acides aminés neutres du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire par les  $\gamma^+$ LATs est physiologiquement peu probable. L'efflux des acides aminés cationiques par les  $\gamma^+$ LAT peut alors être inhibée par une concentration trop élevée en  $\text{Na}^+$ . En effet, l'élévation de la concentration en sodium augmente l'affinité des transporteurs  $\gamma^+$ L pour les acides aminés neutres, ceux-ci peuvent alors être transportés à la place des acides aminés cationiques <sup>169</sup>.

### c. Les autres transporteurs d'acides aminés cationiques

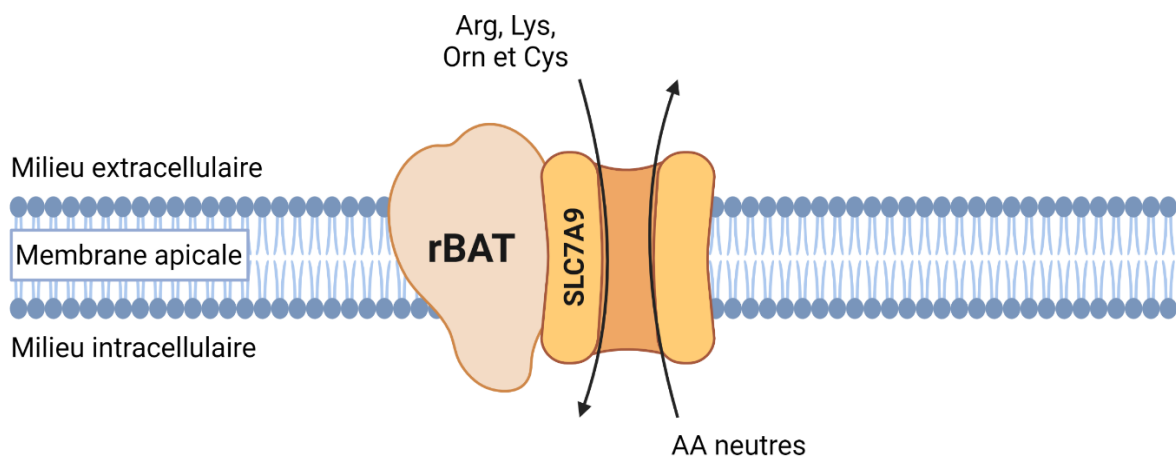
#### *Le transporteur rBAT/b<sup>0,+</sup>AT*

En plus des transporteurs  $\gamma^+$ LATs, et comme mentionné précédemment, il existe un autre transporteur hétérodimérique d'acides aminés cationiques : rBAT/b<sup>0,+</sup>AT. Ce transporteur est également formé d'une sous-unité protéique lourde faisant partie de la famille des SLC3 appelée rBAT (SLC3A1) et d'une sous-unité légère de la famille SLC7 appelée b<sup>0,+</sup>AT (SLC7A9).

rBAT/b<sup>0,+</sup>AT est majoritairement exprimé à la surface apicale des cellules épithéliales intestinales et rénales où il permet l'absorption des acides aminés cationiques, contrairement aux transporteurs  $\gamma^+$ LATs qui permettent leur efflux de ces cellules.

La sous-unité lourde, rBAT, permet l'adressage du transporteur b<sup>0,+</sup>AT à la membrane plasmique et plus particulièrement à la membrane apicale des cellules épithéliales <sup>181 182 183</sup>. Il forme également, avec la chaîne légère SLC7A13, le transporteur AGT1 (Sodium-independent aspartate/glutamate transporter 1) <sup>184</sup>. Comme 4F2hc, rBAT ne présente aucune activité de transport quand elle est exprimée seul, contrairement à SLC7A9 <sup>185</sup>. Ces deux sous-unités sont reliées par un pont disulfure <sup>186</sup> et formeraient également des tétramères par liaison non covalente entre les deux protéines <sup>187</sup>.

La co-transfection de rBAT et b<sup>0,+</sup>AT entraîne une absorption d'arginine dans des cellules COS-1 <sup>188</sup>, permettant ainsi l'influx d'acides aminés cationiques et également de cystine de manière Na<sup>+</sup> indépendante contre l'efflux d'acides aminés neutres (Figure 10) correspondant au système b<sup>0,+</sup> (Figure 10). L'influx d'acides aminés cationiques est favorisé par leur charge positive, l'hyperpolarisation de la membrane augmentant l'influx d'arginine contre l'efflux de leucine intracellulaire <sup>185</sup>.



**Figure 10. Mécanisme de transport de rBAT/ b<sup>0,+</sup>AT**

## Le transporteur ATB<sup>0,+</sup>

SLC6A14 ou ATB<sup>0,+</sup> est un transporteur d'acides aminés faisant partie de la famille des transporteurs de neurotransmetteurs dépendants du sodium et du chlorure (SLC6) et le seul membre du système B<sup>0,+</sup> décrit à ce jour (Tableau 4). Le transport d'acides aminés par ce transporteur s'effectue du milieu extracellulaire vers le cytosol en symport avec deux ions Na<sup>+</sup> et un ion Cl<sup>-189</sup> (Tableau 7).

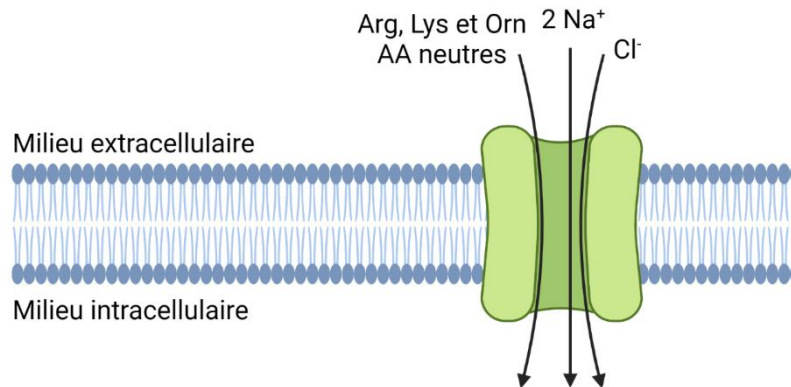
### Tableau 7. Caractéristiques des autres transporteurs d'acides aminés cationiques

(Fiermonte et al., 2003), (Porcelli et al., 2015), (Porcelli et al., 2014), (Hatanaka et al., 2001), (Jézégou et al., 2012) (Sloan et al., 1999)

Gène	Transporteur	Substrats	Mécanisme de transport	Affinité pour l'arginine (μM)	Capacité pour l'arginine	Expression tissulaire
<b>Transporteurs d'acides aminés neutres et cationiques</b>						
SLC6A14	ATB <sup>0,+</sup>	AA cationiques et neutres	Symport	110-160	33.3 nmol/mg de protéine/min	Poumon, trachée, glandes salivaires et mammaires, estomac, intestin, utérus, prostate, testicule
SLC38A4	SNAT4	R, K, O, A, N, C, G, S, T	Symport Na <sup>+</sup> dépendant pour AA neutres	300	1.2 nmol/million de cellules/min	Cerveau, rétine, foie, rein, tissus adipeux
<b>Transporteurs mitochondriaux</b>						
SLC25A15	ORNT1	O, R, K, Cit, H	Antiport	1580	3.0 nmol/g de protéine/min	Nombreux tissus
SLC25A2	ORNT2	R, K, O, Cit, H	Antiport	710	0.2 nmol/g de protéine/min	Foie, testicule, rate, poumon, pancréas, intestin, cerveau, rein
SLC25A29	ORNT3	R, K, O, Cit, H	Antiport	420-470	0.2 nmol/g de protéine/min	Cœur, muscle, foie, cerveau
<b>Transporteurs lysosomaux</b>						
SLC66A1	PQLC2	R, O, H, K	Uniport	2000-4000	112 pmol/oocyte/min	Ubiquitaire
SLC38A9	SNAT9	R, Q, H, P, K, E, L	Uniport	3900	-	Ubiquitaire

SLC6A14 a été fonctionnellement caractérisé dans des cellules cancéreuses humaines <sup>190</sup>. Bien que Kekuda et ses collaborateurs avaient d'abord montré que SLC6A14 ne transportait que des acides aminés neutres, et non pas cationiques, il a été démontré par la suite qu'il transporte un plus large spectre d'acides aminés, neutres et cationiques <sup>191</sup>.

Il est en effet capable de transporter la plupart des acides aminés, mis à part la proline, le glutamate et l'aspartate <sup>189</sup> et permet une importante accumulation intracellulaire de leucine, glutamine et arginine <sup>192</sup> (Figure 11).



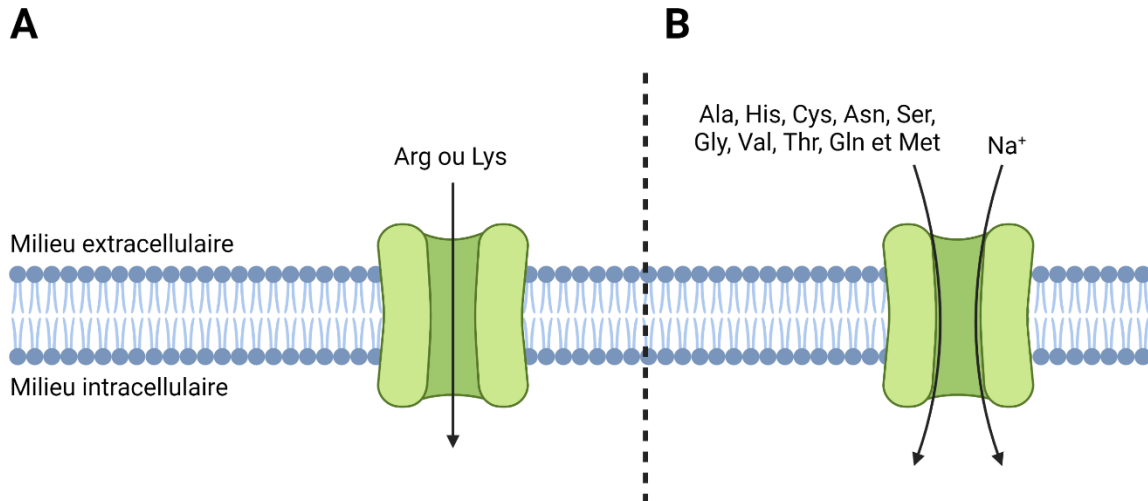
**Figure 11. Absorption Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> dépendante d'AA neutres et cationiques par ATB<sup>0,+</sup>**

Il présente une affinité importante pour l'arginine avec des *K<sub>m</sub>* compris entre 80 μM dans les cellules épithéliales bronchiales humaines et 104 μM dans oocytes de xénope <sup>189</sup>. Il est exprimé principalement dans les poumons et la trachée <sup>189</sup> mais aussi dans le pancréas, les muscles squelettiques, le placenta ainsi qu'à la membrane apicale des cellules épithéliales intestinales et rénales (Tableau 7).

#### SNAT4

SNAT4, codé par le gène SLC38A4, est un transporteur faisant partie de la famille des SNAT (Sodium coupled Neutral Amino acid Transporter). Les SNAT sont des symporteurs d'acides aminés neutres, et principalement de glutamine, dépendants du sodium et du pH correspondant au système A (Tableau 4). SNAT4, comme les autres membres des SNATs, transporte des acides aminés neutres dont principalement la L-alanine suivie de l'histidine et la glutamine de manière Na<sup>+</sup> dépendante <sup>193</sup> (Figure 12) mais possède des affinités inférieures à celles de SNAT1 et SNAT2 pour ces acides aminés <sup>194 195</sup>. Il a également été montré que, contrairement aux autres SNATs <sup>196 197</sup>, SNAT4 peut également transporter les acides aminés cationiques indépendamment du sodium (Figure 12) avec une haute affinité comparé aux acides aminés neutres <sup>194</sup> (Tableau 7).

SNAT4 est exprimé dans le placenta <sup>198 199</sup> et principalement dans le foie <sup>194</sup>. SNAT4 ayant une affinité pour les acides aminés cationiques supérieure à CAT2-A, le seul autre transporteur d'acides aminés cationiques connu pour être exprimé dans le foie, il a été suggéré qu'il pourrait être la voie principale d'absorption des AAC par cet organe <sup>194</sup>.

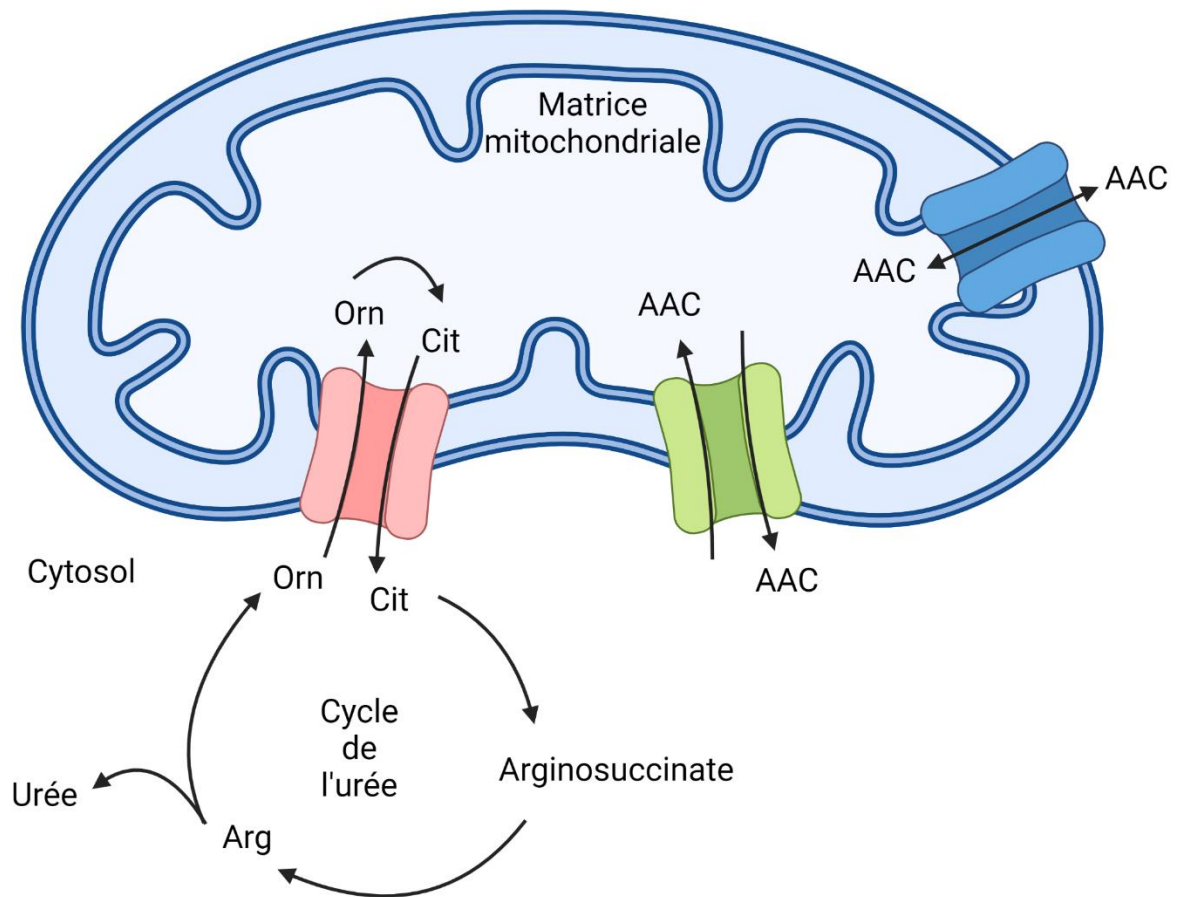


**Figure 12. Absorption  $\text{Na}^+$  indépendante des AA cationiques (A) et  $\text{Na}^+$  dépendante des AA neutres (B) par SNAT4**

### *Les transporteurs mitochondriaux d'ornithine*

Les transporteurs mitochondriaux (SLC25) représentent la famille de SLC regroupant le plus de gènes avec plus d'une cinquantaine de gènes. Ils permettent le transport de nombreux substrats différents au niveau de la membrane interne des mitochondries <sup>200</sup>. Trois d'entre eux, les transporteurs d'ornithine (ORNT), sont des transporteurs d'acides aminés cationiques : ORNT1 (SLC25A15) , ORNT2 (SLC25A2) <sup>201</sup> et ORNT3 (SLC25A29) <sup>202</sup>. Ils sont exprimés au niveau de la membrane interne mitochondriale dans de nombreux tissus mais ORNT1 est le transporteur prédominant <sup>201</sup>.

Ces trois transporteurs partagent de nombreuses caractéristiques, ils peuvent transporter l'arginine, la lysine, l'ornithine et l'histidine par uniport (diffusion facilitée) ou par échange avec des acides aminés de la matrice mitochondriale <sup>202</sup> (Figure 13).



**Figure 13. Transport mitochondrial des acides aminés cationiques par ORNT1, ORNT2 et ORNT3**

Connexion des réactions enzymatiques cytoplasmiques et mitochondriales du cycle de l'urée (rouge). Transport des acides aminés cationiques par échange (vert) ou diffusion facilitée (bleu).

ORNT1 permet principalement la diffusion facilitée de L-arginine, alors que ORNT2 permet l'uniport d'un plus large spectre d'acides aminés comprenant les isomères L et D d'ornithine, lysine, citrulline, histidine et arginine. ORNT1 et ORNT3 présentent des affinités supérieures pour la L-arginine et la L-lysine<sup>201 202</sup> alors qu'ORNT2 présente, quant à lui, plus d'affinité pour l'ornithine et la citrulline<sup>201</sup> (Tableau 7). Ces transporteurs sont impliqués dans la synthèse protéiques des mitochondries et également dans le cycle de l'urée en reliant les réactions cytosoliques et mitochondriales (Figure 17). En effet, les mutations génétiques de ORNT1 sont liées au syndrome HHH (hyperornithinémie, hyperammoniémie, homocitrullinurie) qui est dû à un dysfonctionnement du cycle de l'urée et la synthèse d'arginine<sup>201 203</sup>.

### Les transporteurs lysosomaux

#### PQLC2

Le transport PQLC2 (proline-glutamine loop containing 2), codé par le gène SLC66A1, est un transporteur exprimé à la surface des lysosomes et qui permet l'efflux d'arginine, lysine et histidine de la lumière lysosomale au cytosol<sup>204 205</sup>. Après dégradation des protéines par les

lysosomes, la libération par PQLC2 des acides aminés lysosomaux changerait sa conformation (voir Activation de la voie mTOR par les transporteurs d'acides aminés).

#### SLC38A9

SLC38A9 est également un transporteur exprimé à la membrane lysosomale. Premièrement décrit comme un transporteur d'arginine, des études ultérieures ont montré que SLC38A9 transporte majoritairement des acides aminés neutres et particulièrement la leucine, de la lumière lysosomale au cytosol<sup>206 207</sup>. Cependant, sa capacité à fixer de l'arginine intensifierait l'efflux de leucine du lysosome vers le cytosol (voir Activation de la voie mTOR par les transporteurs d'acides aminés).

## C- Rôles physiologiques et régulations des TAACs

La lysine et l'arginine étant des acides aminés décrits respectivement comme essentiel et semi-essentiel chez les mammifères, les cellules doivent alors être capables d'en absorber de grandes quantités afin de maintenir leurs fonctions. La lysine et l'arginine sont des substrats pour la synthèse protéique et de polyamines qui sont impliqués dans la croissance et la prolifération cellulaire. L'arginine est également un précurseur de nombreux métabolites comme l'oxide nitrique (NO) qui régule les fonctions endothéliales et participe à l'immunité, ou encore la créatine qui est un substrat énergétique du muscle. L'arginine est également impliquée dans le cycle de l'urée qui permet l'élimination des déchets azotés de l'organisme. De plus l'arginine et l'ornithine, un métabolite secondaire de l'arginine, sont synthétisés et consommés par des organes différents. Leur transport entre les différents organes est donc primordial pour l'homéostasie de ces acides aminés dans l'organisme.

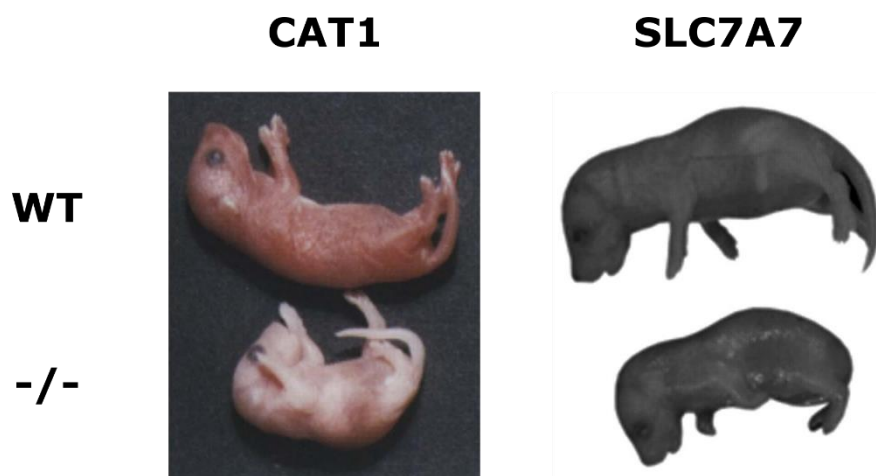
Les transporteurs d'acides aminés cationiques permettent l'absorption cellulaire et les échanges de ces acides aminés entre les tissus. En influant sur les concentrations d'acides aminés dans les cellules, ils jouent donc un rôle dans les régulations des différentes voies métaboliques utilisant les acides aminés cationiques comme celles précédemment citées.

### a. Rôles physiologiques

#### *Développement et croissance*

Des études montrent que certains transporteurs d'acides aminés cationiques jouent un rôle important dans la croissance et la prolifération cellulaire.

Chez la souris, la mutation de CAT1 dans des cellules souches embryonnaires de souris est létale. Les souris issues de ces cellules meurent un jour après la naissance et montrent une taille réduite d'environ 25% comparé aux souris de type sauvage <sup>208</sup> (Figure 14).



**Figure 14. Réduction de la croissance chez la souris induite par la délétion de CAT1 et SLC7A7**

(Perkins et al., 1997) (Sperandeo et al., 2007).

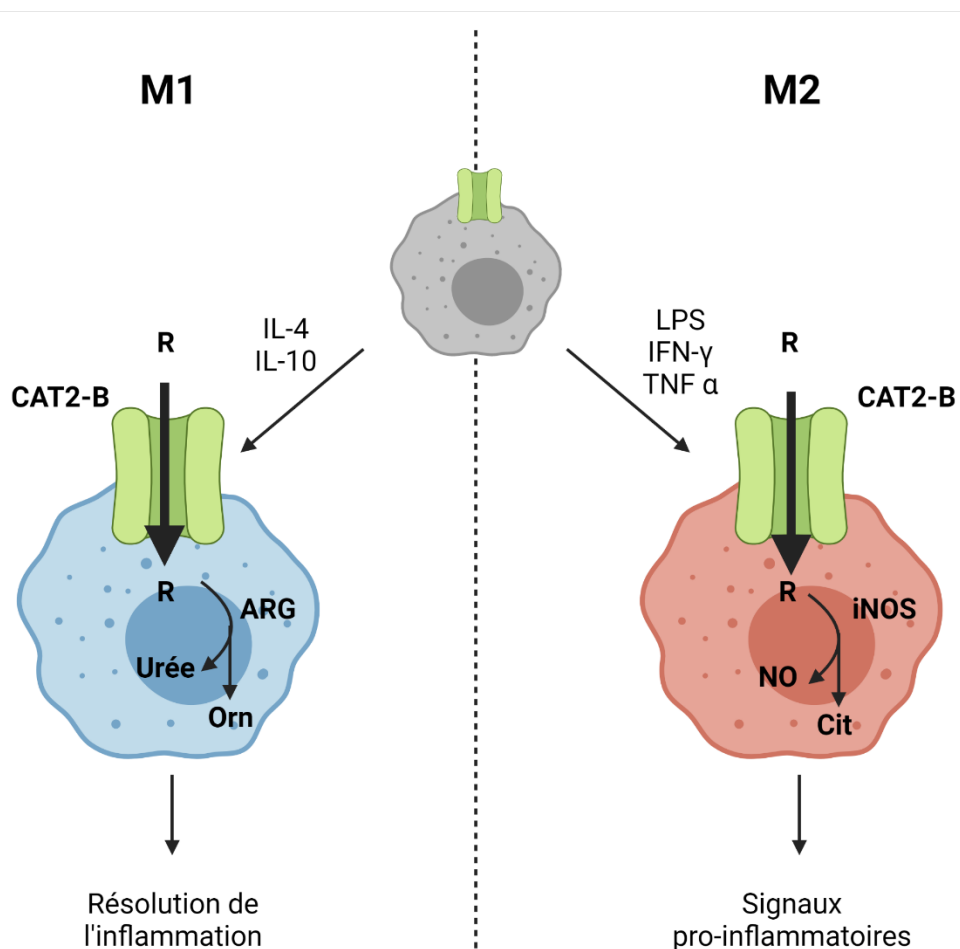


De plus, la délétion de CAT1 dans les lignées cellulaires HG3 CLL, MCF-7 et T47D réduit l'absorption d'arginine dans ces cellules, affectant leur prolifération et leur viabilité <sup>209</sup>.

Le transporteur  $\gamma^+$ LAT1 est également impliqué dans le développement. En effet, la délétion homozygote de SLC7A7 chez la souris provoque une croissance intra-utérine et périnatale réduite ainsi qu'une augmentation de la létalité chez ces souris <sup>210 211 212</sup> (Figure 14). Cette diminution de la croissance serait causée par l'altération de l'expression d'hormones de croissance et d'IGF1 <sup>210</sup> qui est essentiel à la croissance fœtale chez la souris <sup>213 214</sup>.

SNAT4 joue également un rôle dans le développement chez la souris. Sa délétion paternelle induit une diminution de la croissance fœtale <sup>215</sup>.

Le transporteur mitochondrial d'acides aminés cationiques ORNT1 est également impliqué dans la prolifération cellulaire. Sa délétion dans les cellules de mélanome A375 réduit leur prolifération et induit l'apoptose <sup>216</sup>.



**Figure 15. Rôle du transporteur CAT2-B dans l'activation des macrophages M1 et M2**

### *Synthèse de NO et activation des macrophages*

Les macrophages sont des cellules immunitaires capables de phagocytose et participant à l'immunité innée et à l'immunité adaptative qui sont actives lors d'une infection ou une inflammation. En fonction de signaux extracellulaires particuliers (présence de cytokines, de LPS...), les macrophages peuvent se polariser selon 2 façons différentes qui conduisent notamment soit à la production d'oxyde nitrique (NO) et de citrulline grâce à la NO synthase (NOS), ce qui participe à la réponse pro-inflammatoire dite M1; soit à la production d'urée et d'ornithine par l'arginase, ce qui constitue en partie la réponse de résolution de l'inflammation dite M2 <sup>217</sup> (Figure 15).

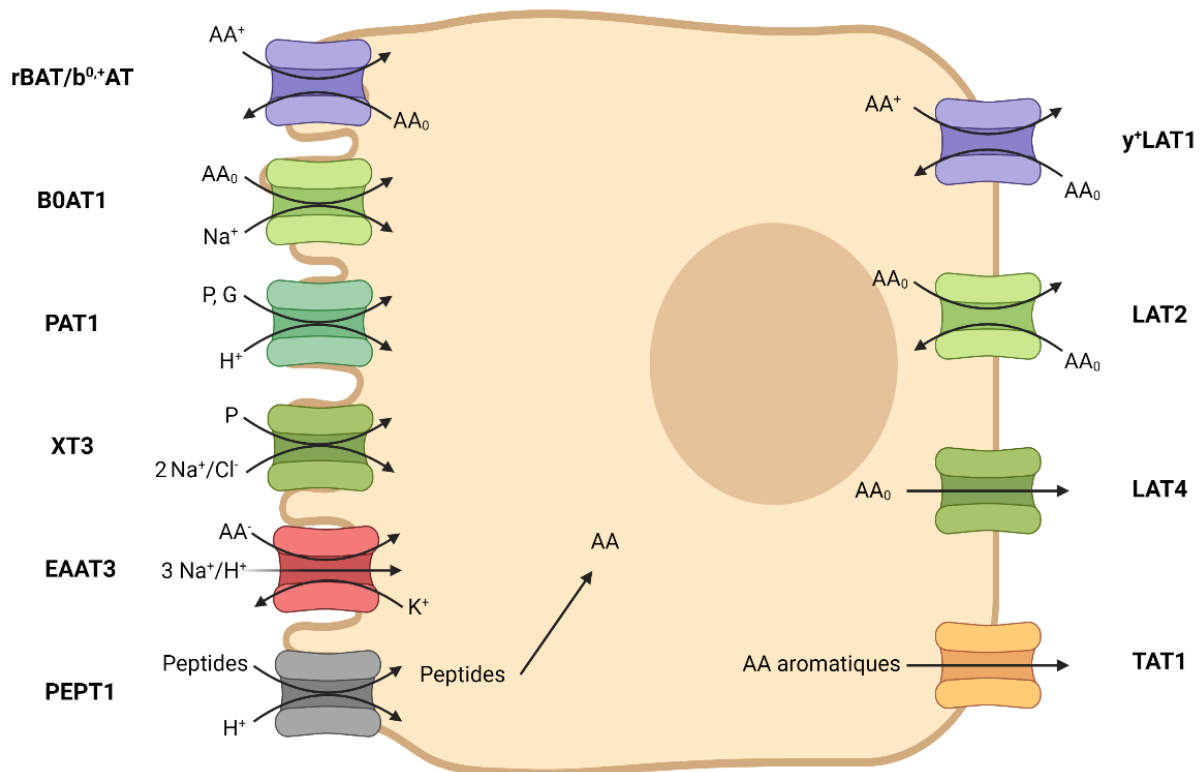
Comme l'arginine est le substrat de ces 2 voies de synthèses (NO et urée), l'activation des macrophages induit un besoin élevé en arginine exogène, celle-ci n'étant pas synthétisée par les macrophages. L'apport d'arginine aux macrophages régule alors l'activation de ces 2 voies qui sont donc dépendantes des transporteurs d'acides aminés cationiques, de la régulation de leur expression et de leur activité permettant ainsi de moduler l'activation des macrophages <sup>218</sup>.

Chez la souris, CAT3 et CAT2 ne sont pas constitutivement exprimés, contrairement à CAT1 <sup>219</sup> qui voit son expression diminuer lors de l'activation des macrophages <sup>220</sup>. CAT2, quant à lui, est surexprimé lors des activation M1 et M2 des macrophages <sup>219</sup>. L'absorption d'arginine et la production de NO sont drastiquement diminuées dans les macrophages de souris CAT2<sup>-/-</sup> réduisant leur prolifération et leur activation <sup>150 219</sup>. Chez l'Homme, il semblerait que l'apport en arginine dans les monocytes primaires <sup>221</sup> et les macrophages <sup>222 180</sup> nécessaire à leur activation soit médié par les transporteurs  $\gamma^+$ LATs et plus particulièrement par  $\gamma^+$ LAT1. Ces résultats démontrent que les transporteurs  $\gamma^+$ LATs, en plus de l'efflux des AAC des cellules épithéliales peuvent également permettre l'influx d'acides aminés cationiques dans d'autres types cellulaires tels que les monocytes primaires et les macrophages.

### *Absorption intestinale des acides aminés*

Une association de transporteurs d'acides aminés cationiques aux membranes apicale et basolatérale permet leur transport à travers les épithéliums intestinaux permettant l'absorption des acides aminés cationiques de la lumière intestinale après la digestion d'aliments.

Le transporteur majeur d'acides aminés cationiques exprimé à la surface apicale des entérocytes et des cellules rénales est rBAT/B<sup>0,+</sup>AT (SLC3A1/SLC7A9). L'absorption des acides aminés cationiques de la lumière intestinale issus de l'alimentation vers le cytosol des entérocytes passe majoritairement par ce transporteur (Figure 16).

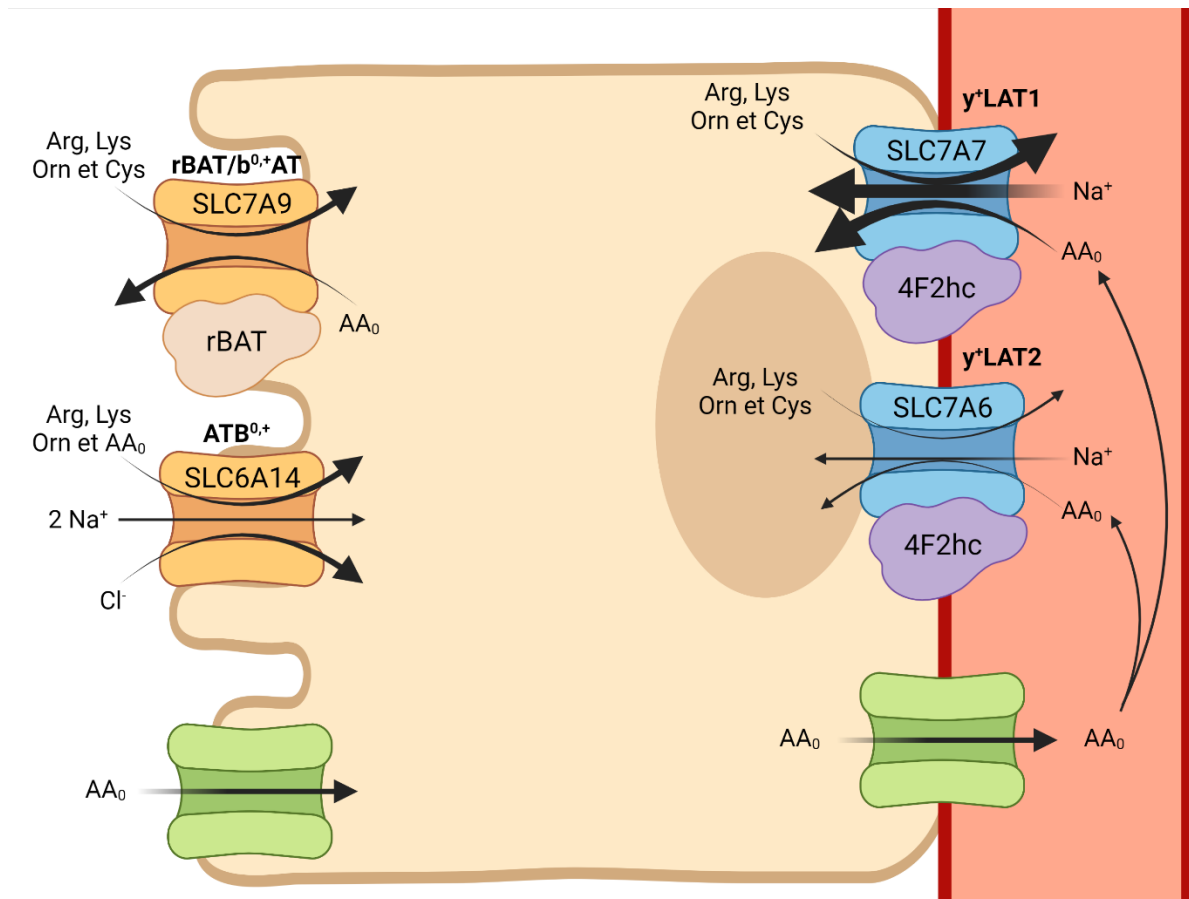


**Figure 16. Transport des acides aminés à travers les entérocytes**

AA<sup>+</sup> : acides aminés cationiques, AA<sup>-</sup> : acides aminés anioniques, AA<sub>0</sub> : acides aminés neutres, P : proline, G : glycine

Des mutations des gènes SLC3A1 et SLC7A9 peuvent causer une cystinurie chez l'homme. La cystinurie est caractérisée par des défauts d'absorption intestinale et de réabsorption rénale des acides aminés cationiques et de la cystine. Des mutations de SLC3A1<sup>223 224</sup> et SLC7A9 (Feliubadaló et al., 1999) en sont à l'origine démontrant le rôle primordial de rBAT/b<sup>0,+</sup>AT dans l'absorption de la face apicale des acides aminés cationiques.

Le transporteur ATB<sup>0+</sup> jouerait également un rôle dans l'absorption apicale des acides aminés cationiques mais celui-ci serait plus exprimé au niveau du colon (Figure 16). En effet, la délétion de SLC6A14 chez la souris induirait une réduction de l'absorption d'arginine dans les colons de ces souris par rapport à ceux des souris de type sauvage<sup>226</sup>.



**Figure 17. Transport des acides aminés cationiques à travers les entérocytes.**

Les AA cationiques sont premièrement absorbés au niveau de leur face apicale par des transporteurs tels que rBAT/b<sup>0,+</sup>AT et ATB<sup>0,+</sup>. Les AA neutres (AA<sub>0</sub>) sont, eux, absorbés par différents transporteurs d'AA<sub>0</sub> de la face apicale puis transportés au niveau de la face basolatérale des entérocytes vers le plasma par d'autres transporteurs d'AA<sub>0</sub>. Les seuls transporteurs connus permettant l'efflux d'AA cationiques des entérocytes vers le plasma sont les y<sup>+</sup>LATs (y<sup>+</sup>LAT1 et y<sup>+</sup>LAT2) qui échangent des AA<sub>0</sub> plasmatiques contre des AA cationiques contenus dans les entérocytes. La majeure partie de l'efflux des AA cationiques vers le plasma semble s'opérer via y<sup>+</sup>LAT1 chez les mammifères.

Une fois les AAC absorbés dans le cytosol des entérocytes, ils doivent par la suite être transportés dans le plasma à travers la membrane basolatérale afin d'être disponibles pour les autres organes. Ce transport des CAA, du cytosol des entérocytes vers le plasma, est alors assuré par les transporteurs y<sup>+</sup>LATs, ces derniers sont d'ailleurs les seuls connus à ce jour assurant cet efflux depuis les entérocytes. Leur fonction est donc essentielle à l'absorption des acides aminés cationiques par l'intestin. Il semble que cette fonction soit principalement assurée par y<sup>+</sup>LAT1 (Figure 17). En effet, des mutations du gène SLC7A7 cause l'intolérance aux protéines dibasiques avec lysinurie (IPDL) qui est due à une réduction de l'absorption des acides aminés cationiques par l'intestin et la réabsorption par les reins<sup>227</sup>. Il a également été démontré que la délétion de SLC7A7 chez la souris provoque une diminution de l'absorption intestinale et la réabsorption rénale des acides aminés cationiques<sup>211 212</sup>. y<sup>+</sup>LAT2, quant à lui semble jouer un rôle moins important dans l'absorption intestinale des CAA car les effets

délétères des mutations ou délétions de SLC7A7 ( $\gamma^+$ LAT1) ne peuvent être compensés par l'expression ou la surexpression d' $\gamma^+$ LAT2 fonctionnel <sup>210</sup>.

Sperandeo et ses collaborateurs ont montré qu'une délétion de SLC7A7 induisait une réduction de l'expression de SLC7A9 ( $b^{0,+}$ AT) <sup>210</sup>. L'absence de SLC7A7 à la membrane basolatérale des entérocytes empêchant l'efflux des acides aminés cationiques vers le plasma, la diminution de l'expression de SLC7A9 observée pourrait être mise en place pour empêcher l'accumulation d'acides aminés cationiques dans les entérocytes, ce qui suggère une relation entre ces deux transporteurs permettant le flux d'acides aminés cationiques à travers les entérocytes.

## b. Régulation de l'expression des TAAC

### b.1. Transcription et stabilisation des ARN messagers

Les transporteurs d'acides aminés cationiques sont impliqués dans de nombreuses voies métaboliques et la régulation de leur transcription, traduction et modifications post-traductionnelles sont diverses selon les transporteurs et les tissus étudiés. La grande majorité des données disponibles quant à la régulation des transporteurs d'acides aminés cationiques concernent majoritairement CAT1.

#### Carence en acides aminés

Lors d'une carence, les cellules mettent en place des mécanismes d'adaptation pour réduire la consommation d'acides aminés en réduisant l'activité des processus anaboliques et en favorisant la synthèse d'acides aminés. De plus, les cellules en carence surexpriment des transporteurs d'acides aminés afin d'augmenter leur capacité d'absorption des acides aminés.

Il a été montré dans différents types cellulaires que la carence en acides aminés induit une augmentation de la transcription de CAT1 <sup>228</sup>. CAT1 est surexprimé quel que soit l'identité de l'acide aminé considéré, essentiel et semi-essentiel, causant la carence <sup>229</sup>. Cette augmentation de la transcription s'accompagne d'une augmentation du transport d'acides aminés cationiques <sup>230 231</sup>. Ces régulations de la transcription par la carence en acides aminés sont notamment médiées par la voie GCN2 qui sera décrite dans la partie 3.

La délétion de CAT1 dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) entraîne une surexpression de CAT2 et CAT3 pour compenser l'absence de CAT1 <sup>157</sup>. La délétion de SLC7A7 chez la souris, elle, induit la surexpression de CAT2 et de SLC7A6 <sup>210</sup>. Ces surexpressions de CAT2, CAT3 et SLC7A6 pourraient être dues à des carences en acides aminés cationiques générées dans un premier temps par l'absence de CAT1 et SLC7A7.

En plus de l'augmentation de la transcription de CAT1, la carence en acides aminés augmente également la stabilité de l'ARN messenger (ARNm) produit. En effet, l'ARNm de CAT1 est stabilisé au niveau de l'UTR 3' (UnTranslated Region) <sup>232 231</sup>. L'UTR 3' de CAT1 contient ARE (Adenylate-uridylylate-rich elements) de 11 nucléotides. Ces ARE permettent le recrutement de la protéine HuR (Human antigen R), aussi connu sous le nom d' ELAVL1, qui augmente la stabilité des ARNm en empêchant leur dégradation <sup>233 234</sup>. La carence en acides aminés induit

la fixation d'HuR sur l'ARE et empêche la dégradation de l'ARNm de CAT1 permettant sa stabilisation<sup>235 236</sup>.

### Cytokines

Comme vu précédemment, certains transporteurs sont impliqués dans les processus inflammatoires via l'activation des macrophages qui est notamment régulée par les cytokines pro-inflammatoires (Figure 15). Ainsi, CAT2-B, voit sa transcription augmenter par les cytokines pro-inflammatoires telles que l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) dans les macrophages chez le rat (Hammermann et al., 2000) (Baydoun et al., 1999) ainsi que dans les cellules endothéliales humaines<sup>237</sup>. Son expression est également induite par le TNF $\alpha$  dans les cellules HUVEC<sup>237 147</sup>. Ces augmentations de la transcription de CAT2-B induites par ces cytokines pro-inflammatoires sont régulées par la voie NF- $\kappa$ B<sup>238 239</sup>. CAT2-B n'est pas le seul transporteur d'acides aminés cationiques régulé par les cytokines pro-inflammatoires. CAT2-A et CAT1 sont également induits par le TNF  $\alpha$  dans la lignée de cellules épithéliales de la cornée (HCE)<sup>147</sup> et par l'IFN- $\gamma$  dans les cellules de muscle lisse aortique de rat<sup>239</sup>, alors que ce dernier réduit l'expression de CAT1 après 9 heures de traitement dans les cellules HUVEC<sup>237</sup>.  $\gamma$ <sup>+</sup>LAT1 (SLC7A7) est également surexprimé au niveau protéique par l'IFN- $\gamma$  dans les monocytes humains mais pas la chaîne légère d' $\gamma$ <sup>+</sup>LAT2 (SLC7A6) ainsi que la chaîne lourde 4F2hc<sup>221</sup> alors que cette dernière est, au contraire, induite par l'IFN- $\gamma$  dans les Caco2 et les colons humains et murins<sup>240</sup>.

CAT2-B est également induit par les cytokines anti-inflammatoires (Figure 15), notamment par les interleukines 4 (IL-4) et 13 (IL-13) dans les macrophages de souris et est accompagné par une augmentation de l'absorption d'arginine alors que l'expression de CAT1 et CAT3 reste identique. De plus, la délétion de CAT2-B dans les macrophages empêche l'accumulation d'arginine induite par IL-4 et IL-10<sup>218</sup>.

Ces données montrent que la régulation des transporteurs d'acides aminés cationiques dans les processus inflammatoires est complexe et diffère de par les cytokines impliquées et les transporteurs régulés selon les tissus.

### Effet de l'insuline

Il est connu que l'insuline régule l'expression de certains transporteurs d'acides aminés dont certains SNATs<sup>241</sup> et LATs<sup>242</sup>. L'insuline régule également l'expression de certains transporteurs d'acides aminés cationiques. En effet, l'insuline augmente l'absorption d'arginine qui est associée à une augmentation de CAT1 et CAT2-B dans les myocytes cardiaques de rat<sup>243 244</sup> et les cellules endothéliales humaines<sup>245 246</sup>.

Gonzalez et ses collaborateurs ont montré que l'insuline augmentait également l'abondance du facteur de transcription Sp1, pour lequel le promoteur du gène SLC7A1 contient 4 séquences consensus. Ces résultats suggèrent que l'insuline induirait la fixation du facteur de transcription Sp1 au promoteur de SLC7A1, ce qui induirait sa transcription et stabiliserait l'ARNm produit<sup>245</sup>.

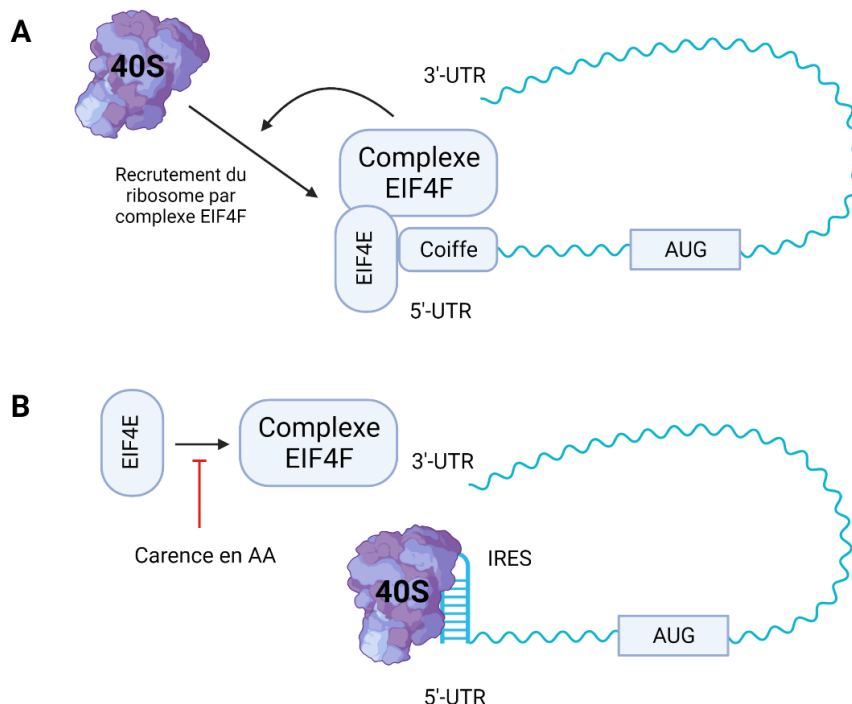
## b.2. Régulations traductionnelles et post traductionnelles

### Internal Ribosome Entry Site

Lors d'un stress activant la réponse intégrée au stress (ISR) tels que l'hypoxie, les changements de température ou la carence en acides aminés, la traduction canonique dépendante de la coiffe est inhibée afin de réduire la synthèse protéique globale en attendant des conditions plus favorables <sup>247</sup>. La carence en acides aminés réduit la formation du complexe eIF4F nécessaire au recrutement de la sous-unité 40S du ribosome dépendant de la coiffe, notamment par la fixation de 4EBP à ce dernier qui empêche son association avec les autres sous-unités protéiques du complexe (Figure 18A). Cependant pour faire face au stress et y survivre, les cellules mettent en place des mécanismes de survie qui nécessitent la traduction des ARNm impliqués dans la réponse au stress malgré l'inhibition de la traduction générale. Pour ce faire, la cellule peut recourir à des mécanismes de traduction alternatifs tels que l'utilisation du site d'entrée interne du ribosome dit IRES (Internal Ribosome Entry Site).

L'IRES est une séquence présente dans l'UTR 5' qui forme une structure secondaire permettant le recrutement des ribosomes à l'ARNm au niveau d'un cadre de lecture ouvert (ORF) et permet la traduction de l'ARNm, tout en se passant de la coiffe et du complexe EIF4F nécessaires à l'initiation de la traduction canonique (Figure 18B).

Ainsi, il a été montré chez le rat que l'ARNm de CAT1 comporte une séquence IRES dans son UTR 5' <sup>230</sup>. Fernandez et ses collaborateurs ont montré que lors d'une carence en acides aminés, la traduction de CAT1 augmente grâce à l'IRES présent dans son UTR 5' et que l'activation de la voie intégrée au stress (ISR) était nécessaire à cette traduction alternative <sup>248</sup>.



**Figure 18. Initiations de la traduction coiffe dépendante (A) et par l'IRES (B)**

La coiffe à l'extrémité 5' de l'ARNm permet le recrutement d'EIF4E qui s'associe aux autres sous-unités du complexe EIF4F. Le complexe EIF4F formé, il permet le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome (A). La carence en acides aminés empêche la formation du complexe EIF4F au niveau de la coiffe, empêchant la traduction coiffe-dépendante des ARNm. Les ARNm qui possèdent des IRES peuvent continuer à être traduits, la sous-unité 40S pouvant se fixer à la structure secondaire formant l'IRES et permettre l'initiation de la traduction de l'ARNm (B).

### Régulations par les protéines kinase C

Les protéines kinases C sont une famille de sérine/thréonine kinases phosphorylant de nombreuses protéines différentes impliquées dans la prolifération, l'apoptose et la survie cellulaire <sup>249</sup>. L'activation de la protéine kinase C (PKC) diminue l'activité d'absorption des acides aminés cationiques dans différents types cellulaires et les oocytes de xénope par les CATs <sup>250 251 252</sup> (Rotmann et al., 2006) <sup>253</sup> ainsi que par les  $\gamma$ -LATS, alors que l'inhibition de PKC augmente leur absorption <sup>254</sup>.

Curieusement, bien que l'activation de PKC réduit l'activité de transport des CATs, le traitement au phorbol 12-myristate 13-acétate, un activateur de PKC, induit la transcription de CAT1 et CAT2 (Gräf et al., 2001) (Krotova et al., 2003) (Rotmann et al., 2007) <sup>255</sup> sans augmenter, toutefois, les niveaux protéiques de CAT1 <sup>251 254 252 255</sup> ainsi que ceux de CAT3 (Rotmann et al., 2006).

Ceci suggère que PKC modifie l'activité de CAT1 et CAT3 par des modifications post-traductionnelles. En effet, il a été suggéré que PKC régule l'activité de CAT1 en le phosphorylant, CAT1 possédant des séquences consensus de phosphorylation de PKC <sup>255</sup>. Toutefois, Rotmann et ses collaborateurs ont montré que l'activation de PKC n'induisait pas de phosphorylation de CAT1 <sup>255</sup> suggérant que PKC ne diminue pas l'activité de CAT1 en le phosphorylant mais par un mécanisme indirecte.

La même équipe démontrera que l'activation de PKC modifie l'activité de CAT1 et CAT3 en réduisant leur localisation à la membrane plasmique en favorisant leur internalisation <sup>255 256</sup>. Cette internalisation serait induite par endocytose clathrine-dépendante. L'activation de PKC induirait l'ubiquitination de CAT1 favorisant son endocytose et son transport vers les endosomes tardifs et les lysosomes afin qu'il y soit dégradé <sup>257</sup>.

Il existe plusieurs isoformes de PKC, l'utilisation de la toxine pertussique inhibe l'activité de l'isoforme  $\alpha$  et non des isoformes  $\xi$  et  $\lambda$ . Des traitements avec cette toxine augmentent également l'absorption d'arginine par les cellules démontrant que la régulation des CATs passerait principalement par PKC $\alpha$  <sup>254</sup>.

Pour autant, la régulation négative des TAAC par la protéine PKC ne semble pas être un processus universel et pourrait être dépendante du transporteur considéré. En effet, certains transporteurs voient au contraire leur activité et leur localisation à la membrane plasmique augmenter suite à l'activation de PKC. Ainsi, il a été démontré que l'activation de PKC induit une augmentation de l'activité de transport de l'arginine dans les macrophages <sup>258</sup>. Il est possible d'imaginer que les mécanismes sous-jacents à cette augmentation des activités de transports soient similaires à ceux observés dans les cellules HEK293 chez lesquelles



l'activation de PKC $\alpha$  augmente également l'adressage de ATB<sup>0,+</sup> à la membrane plasmique, augmentant ainsi l'activité de transport des cellules. <sup>259</sup>.

## D- Données chez les poissons

Jusqu'à présent, la majorité des études menées chez les poissons s'est intéressée aux relations entre les compositions des aliments et leurs répercussions fonctionnelles sur la physiologie des organismes considérés. Cependant, les mécanismes moléculaires régulant l'absorption de ces nutriments restent encore à élucider. Ainsi, l'étude moléculaire des transporteurs d'acides aminés et des régulations de leurs expressions et activités chez les poissons n'a reçu que très peu d'attention jusqu'à présent, aussi bien chez les poissons d'intérêt agronomique que chez les poissons modèles, tels que le poisson zèbre (*Danio rerio*) ou le médaka (*Oryzias latipes*).

### *Régulations de l'expression des transporteurs d'acides aminés chez les poissons*

La régulation postprandiale de la transcription des transporteurs d'acides aminés n'a été étudiée que pour un nombre très restreint d'entre eux (seulement 11 parmi la soixantaine de transporteurs décrits chez les mammifères) chez différentes espèces de poissons d'intérêt agronomique telles que la carpe <sup>260</sup>, le tilapia <sup>261,262</sup>, le turbot <sup>263</sup>, la perche chinoise (*Siniperca chuatsi*) <sup>264</sup> et la truite <sup>265</sup>. Concernant les TAAC, ces différentes études montrent qu'après la prise alimentaire, CAT2 et  $\gamma^+$ LAT2 mais également les deux sous-unités de rBAT/b<sup>0,+</sup>AT (SLC3A1 et SLC7A9) sont surexprimés suivant des cinétiques différentes. Dans l'intestin de la perche chinoise CAT2 est surexprimé entre 6 et 24 h après le dernier repas alors qu' $\gamma^+$ LAT2 présente, lui, une première surexpression entre 1 et 3 h suivie d'une autre à partir de 24 h et qui persiste jusqu'à 96 h après le dernier repas. Cette surexpression bimodale d' $\gamma^+$ LAT2 montre que celui-ci pourrait être surexprimé potentiellement à la fois par des régulations hormonales suite à la prise alimentaire mais également par une carence prolongée.  $\gamma^+$ LAT1, quant à lui, voit sa transcription diminuer après un jour de carence chez la carpe <sup>260</sup>.

Dans une récente étude, Brezas et ses collaborateurs ont également montré que des truites nourries avec un aliment à base de végétaux supplémenté avec de la lysine, de la méthionine et du tryptophane libres voient l'expression post-prandiale de SLC7A9 et d'autres transporteurs d'acides aminés de la membrane apicale des entérocytes affectée <sup>265</sup>. De plus, cette étude montre également que des lignées de truites présentant une bonne aptitude à utiliser des aliments à base de végétaux voient l'expression de SLC7A9 et ASCT2 modifiée comparativement à une lignée non adaptée aux aliments végétaux. En effet, SLC7A9 et ASCT2 sont plus exprimés dans l'intestin de truites non sélectionnées que dans l'intestin de truites adaptées aux aliments végétaux. Ces résultats suggèrent que l'expression intestinale des transporteurs d'acides aminés est dérégulée par l'utilisation d'aliments végétaux et que l'adaptation des truites à ces aliments impacterait leur expression.

Les aliments à base de végétaux et la supplémentation en acides aminés libres semblent donc modifier l'expression de certains transporteurs d'acides aminés. Il a également été montré que la présence de glycine, un facteur antinutritionnel, induit une diminution de la

transcription des transporteurs CAT1 et ATB0,+ dans l'intestin de la carpe (*Ctenopharyngodon idella*)<sup>266</sup>. Par ailleurs, il a été observé qu'un aliment déficient en méthionine induit la surexpression de CAT1 chez la truite<sup>267</sup>.

### Activités et rôles

Aujourd'hui aucune étude n'a permis de déterminer les caractéristiques de transport (substrats, affinités, capacités) d'un transporteur d'acides aminés donné chez les poissons. Seul le transporteur de di/tripeptides PEPT1 a été récemment caractérisé chez le saumon par clonage et surexpression de ses deux paralogues dans des oocytes de xénopes<sup>268</sup>.

De plus, peu d'études se sont penchées sur les voies de signalisations régulant et/ou régulées par les transporteurs d'acides aminés cationiques chez les poissons, leurs rôles physiologiques et les effets de leur inhibition ou délétion. Seules 2 études ont été menées dans cette optique. Ainsi, la délétion de CAT3 a été étudiée chez le poisson zèbre chez qui l'absence de CAT3 induit une diminution de la production de NO et augmente l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans le foie conduisant à une stéatose hépatique<sup>269</sup>. De même, Asaoka et ses collaborateurs ont étudié l'effet de la délétion génétique de SLC7A7 chez le médaka. Ainsi, il a été observé que la suppression d' $\gamma^+$ LAT1 chez le médaka réduit l'activation de la voie mTOR dans les embryons, et impacte le développement des poissons selon leur axe gauche-droite<sup>270</sup>.

Ces deux études montrent que les transporteurs d'acides aminés cationiques pourraient jouer un rôle dans l'activation de la voie mTOR chez les poissons.

L'étude moléculaire de la régulation de l'expression de ces transporteurs par les nutriments et les mécanismes de transport dont ils dépendent apparaît donc primordiale pour mieux comprendre comment les acides aminés sont absorbés chez la truite en fonction des sources protéiques des aliments et notamment les aliments à bases de plantes et ainsi éventuellement connaître l'impact de possibles dérégulations de ces transporteurs d'acides aminés sur les voies de signalisation et de façon plus large sur la physiologie et la croissance de cette espèce d'intérêt agronomique.



## Partie III : Les voies de signalisation cellulaire régulées par les acides aminés

Lors de cette thèse, nous nous sommes intéressés, en plus des transporteurs d'acides aminés cationiques, aux effets des acides aminés sur 3 voies détectant leur disponibilité et régulant la croissance : la voie GCN2 (General Control Nonderepressible-2), la voie mTOR (mechanistic Target Of Rapamycin) et la macro-autophagie. La voie GCN2 permet de ressentir les carences en acides aminés et induit la mise en place de mécanismes de survie face à ce stress telle que la régulation de l'autophagie qui permet la libération d'acides aminés et d'acides gras indispensables au métabolisme et à la production d'ATP en « digérant » des éléments cellulaires lors de la carence. La voie mTOR, quant à elle, adapte l'anabolisme et le catabolisme en fonction de la disponibilité en acides aminés ainsi que d'autres stimuli afin de promouvoir la synthèse protéique et la croissance des organismes.

### A- La voie GCN2

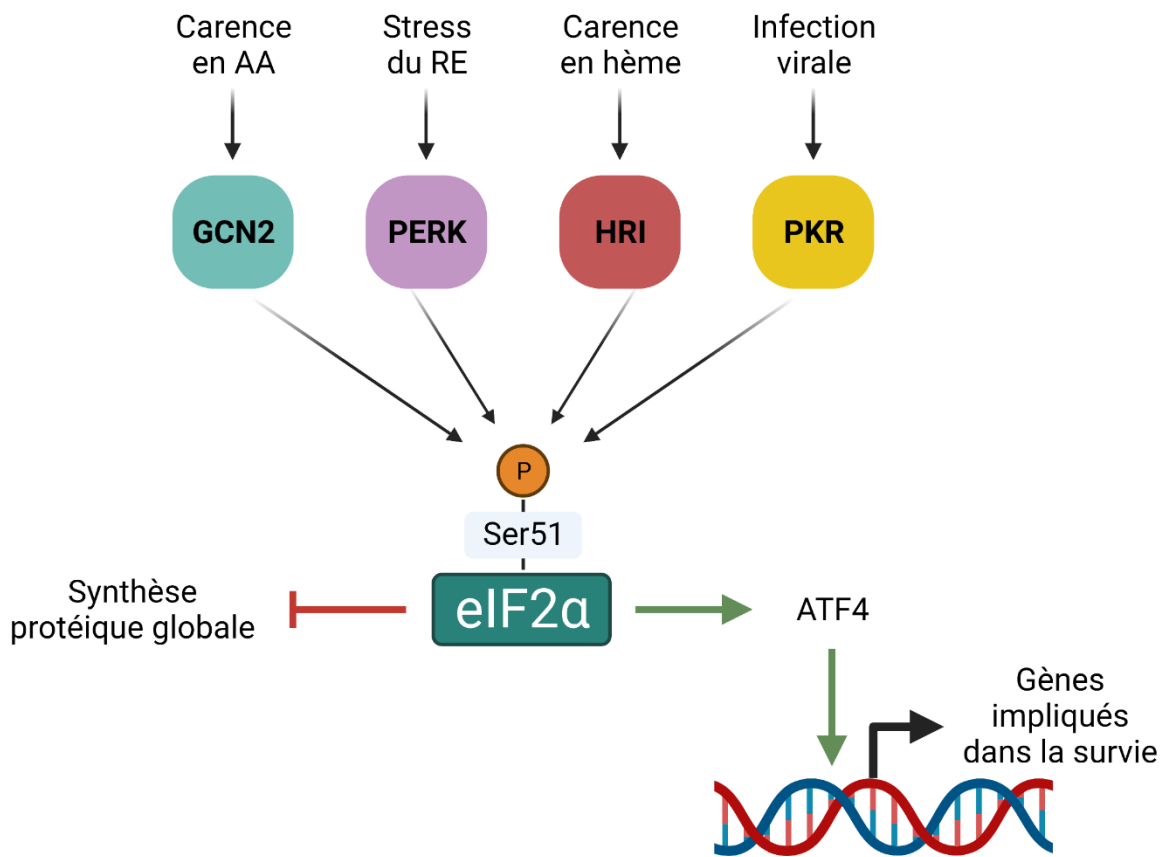
Lors d'une carence en acides aminés, les cellules régulent l'expression de nombreux gènes afin de mettre en place des mécanismes de survie. Ainsi, il a été montré qu'une carence en leucine induit la surexpression de 420 gènes dans des cellules de type MEF immortalisées<sup>271</sup> et 301 dans la lignée HepG2/C3A<sup>272</sup>. Les gènes surexprimés par la carence en leucine sont impliqués notamment dans la synthèse d'acides aminés, la protéolyse, la transcription, la croissance, le cycle cellulaire, le métabolisme des lipides et la synthèse de nucléotides<sup>271 272</sup>. Certains transporteurs d'acides aminés sont également induits tels que xCT, GlyT1, ASCT1, ASCT2, LAT1 ainsi que les transporteurs d'acides aminés cationiques CAT1, PQLC2 et 4F2hc, (la chaîne lourde des  $\gamma^+$ LATs)<sup>273 272 271</sup>.

Bien que la carence en AA régule l'expression de gènes par différentes voies de signalisation cellulaires impliquant notamment les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B<sup>274 275</sup>, cJUN<sup>276</sup> et ATF2 (Activating Transcription Factor 2)<sup>277</sup>, la régulation de la transcription par la carence semble être principalement médiée par la voie GCN2. En effet, Deval et ses collaborateurs ont montré, par la délétion de GCN2 dans des cellules de type MEF immortalisées, que la transcription de 61 % des gènes surexprimés par la carence en leucine est dépendante de GCN2<sup>271</sup>.

#### a. Activation de la voie GCN2 et arrêt de la traduction

La voie GCN2 fait partie de la réponse intégrée au stress (ISR pour Integrated Stress Response) qui est induite par différents stimuli incluant l'hypoxie, l'infection virale, le stress du réticulum endoplasmique (RE) ainsi que les carences en glucose et en acides aminés. Ces divers stimuli induisent l'activation de 4 kinases chez les mammifères phosphorylant la même cible, eIF2 $\alpha$ , au niveau de son résidu sérine 51 (Ser51). La phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  induit l'inhibition de la synthèse protéique d'une part et la transcription de gènes impliqués dans la survie de la cellule en induisant la traduction de facteurs de transcription dont ATF4 (Activating Transcription

Factor 4). C'est cette convergence des réponses aux divers stress au niveau d'eIF2 $\alpha$  et ATF4 qui a donné son nom à l'ISR (Harding et al., 2003) (Figure 19).



**Figure 19. La réponse intégrée au stress dans son ensemble**

L'activation des kinases impliquées dans l'ISR induit la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  ayant pour effet d'inhiber la synthèse protéique globale et d'induire la traduction d'ATF4 qui lui-même amorce la transcription de gènes impliqués dans la survie cellulaire.

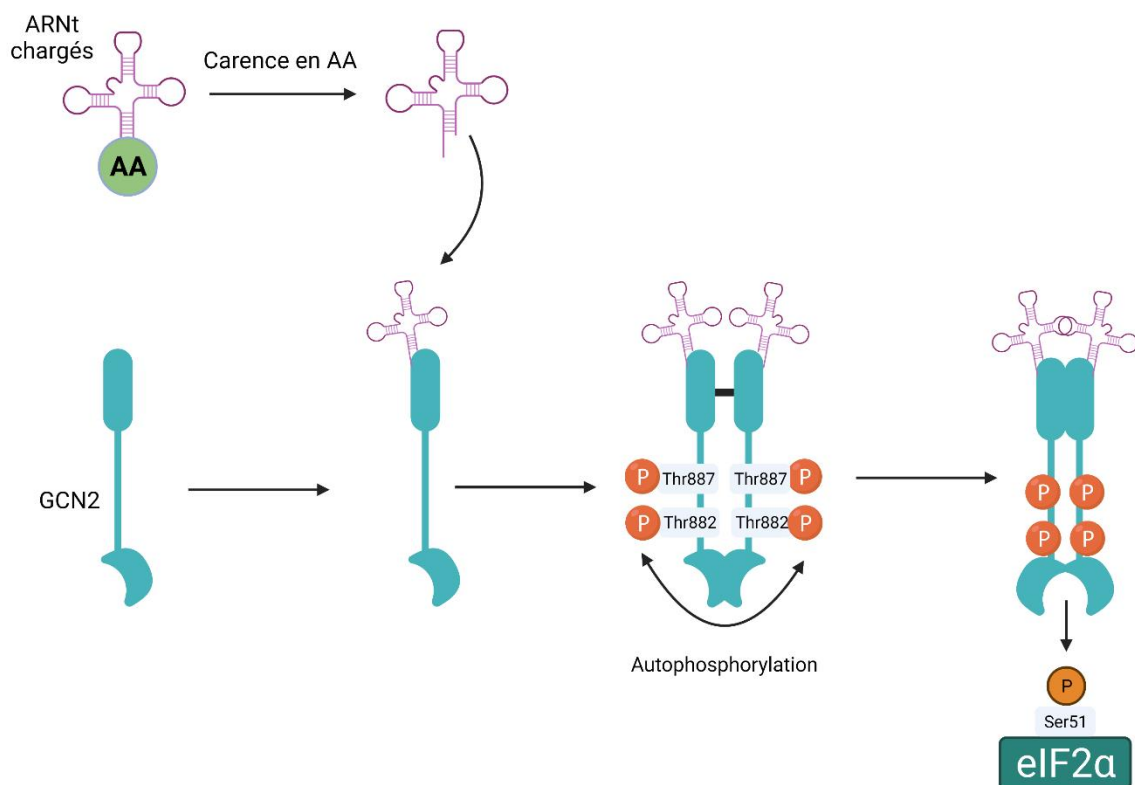
#### *Les différents stress et kinases initiant l'ISR*

La phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  est opérée, chez les mammifères, par les kinases PKR (Protein Kinase double-stranded RNA-dependent), PERK (PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase), HRI (Heme Regulated Inhibitor) et GCN2. Les domaines catalytiques de ces kinases présentent une forte homologie et leur permet de phosphoryler le résidu Ser51 d'eIF2 $\alpha$ <sup>278</sup>. Ces kinases partagent également des mécanismes d'activation et plusieurs d'entre elles peuvent être activées par un même stress. Cependant, leurs fonctions principales consistent en la détection du stress du RE pour PERK<sup>279</sup>, d'infection virale pour PKR<sup>280-281</sup>, la diminution de la

concentration cytoplasmique en hème (hème de fer) pour HRI<sup>282 283</sup> et la détection d'une carence en acides aminés pour GCN2<sup>284</sup> (Figure 19).

### Activation de la kinase GCN2

La fonction principale de GCN2 est de ressentir les carences intracellulaires en acides aminés<sup>284</sup>. Lors d'une carence en acides aminés essentiels ou d'un défaut de synthèse d'acides aminés, les ARN de transfert (ARNt) non chargés s'accumulent dans les cellules<sup>285</sup>. Chez la levure, GCN2 est activée par la fixation des ARNt non chargés sur un domaine relatif au HiRS (histidyl-tRNA synthetase) qui lui permet de lier ces ARNt<sup>286 287</sup>. La fixation des ARNt par GCN2 induit son autophosphorylation au niveau des résidus Thr882 et Thr887<sup>284</sup>. De plus, comme pour les autres kinases d'eIF2 $\alpha$  sa dimérisation semble nécessaire à son activation chez la levure<sup>288</sup> (Figure 20).



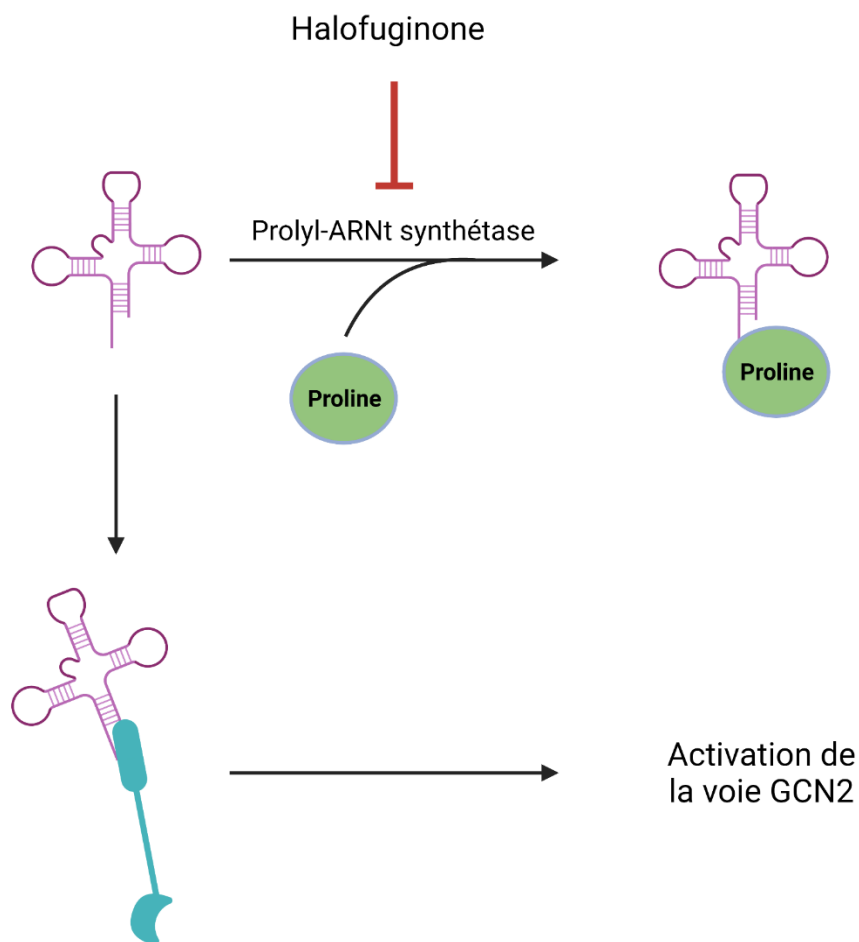
**Figure 20. Activation de GCN2 par la carence en acides aminés**

La carence en AA induit une accumulation d'ARN de transfert non chargés dans les cellules. La kinase GCN2 les fixe, ce qui entraîne son homo-dimérisation et son autophosphorylation qui permettent son activation et la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$

Cependant, chez les mammifères, contrairement aux autres kinases d'eIF2 $\alpha$ , GCN2 forme déjà des homodimères non actifs dans les cellules non carencées<sup>289</sup>. Toutefois, comme pour les autres kinases d'eIF2 $\alpha$ , son autophosphorylation, au niveau des résidus Thr882 et Thr887,

activerait sa fonction kinase responsable de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  <sup>290</sup>. De la levure aux mammifères, la protéine GCN2 est très conservée, notamment le domaine HiRS qui permet une activation de GCN2 par liaison avec les ARNt non chargés, tel que ce qui a été observé chez la levure <sup>291</sup>.

Ainsi, GCN2 peut être activée pharmacologiquement en inhibant la liaison des acides aminés aux ARNt. Il a été observé que l'utilisation de dérivés alcooliques d'acides aminés, tel que l'histidinol, un inhibiteur compétitif de l'histidyl-ARNt-synthétase qui empêche la fixation de l'histidine sur l'histidyl-ARNt <sup>292</sup>, inhibe la synthèse protéique <sup>293</sup>. En effet, les traitements par perfusion avec ce type de dérivés alcooliques des acides aminés induisent une augmentation

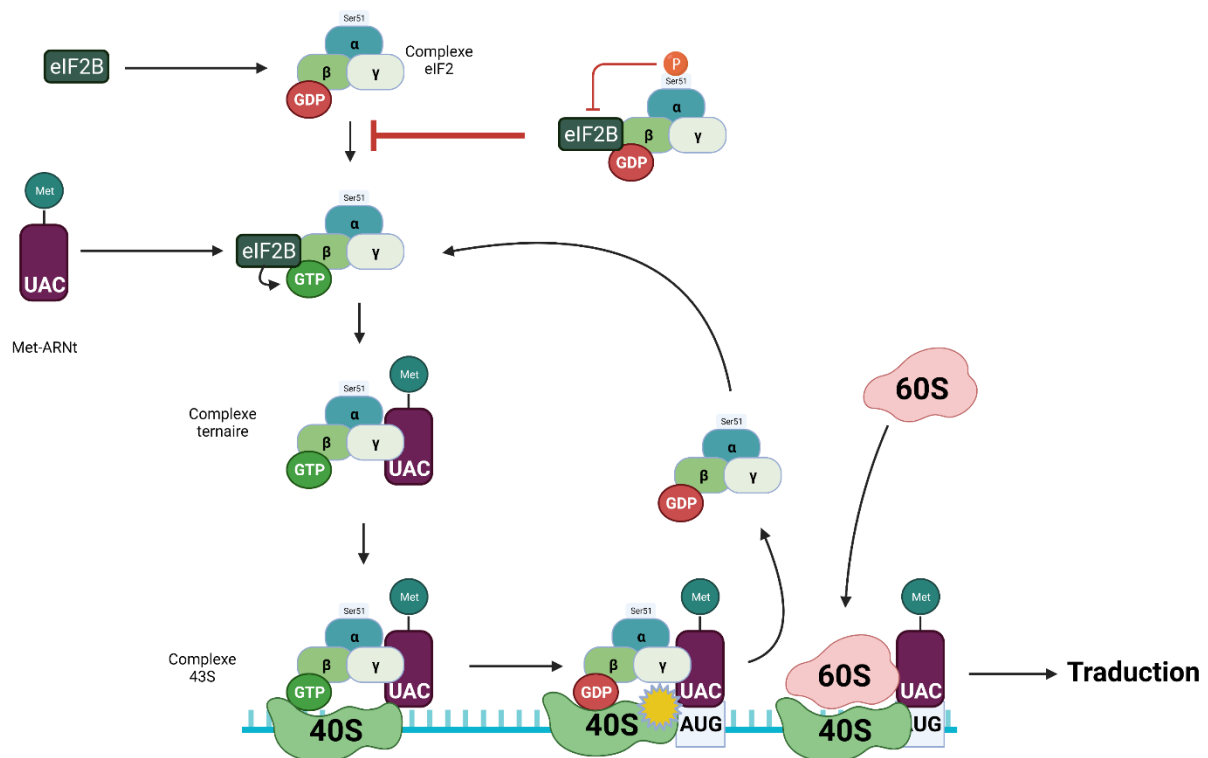


**Figure 21. Activation de la voie GCN2 par l'halofuginone**

*L'halofuginone inhibe la prolyl-ARNt synthétase qui permet la fixation de la proline sur l'ARNt. Cette inhibition induit une accumulation d'ARNt comme lors d'une carence en AA conduisant à l'activation de GCN2.*

de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  dans le foie de souris, ce qui n'est pas observé chez les animaux n'exprimant plus GCN2 <sup>294</sup>. L'halofuginone est un autre activateur de la voie GCN2 fonctionnant sur le même principe que l'histidinol. L'halofuginone inhibe la prolyl-ARNt-synthétase qui catalyse la liaison de la proline sur le prolyl-ARNt et active ainsi la voie GCN2 <sup>295</sup> (Figure 21).

GCN2 a également été montrée comme étant activée par les rayons ultraviolets (UV). Lors de l'irradiation aux UV, les cellules augmentent leur production de NO par la NOS dont le substrat est l'arginine. La production de NO réduirait la concentration intracellulaire en arginine, activant GCN2<sup>296</sup>. GCN2 est également activée lors d'infections virales<sup>297 298</sup> et sa mutation peut augmenter la susceptibilité de souris à un virus à ADN double-brin<sup>299</sup>. L'activation de GCN2 par les virus semble s'effectuer par la liaison des acides nucléiques de ceux-ci au domaine HiRS comme cela a pu être démontré par Berlanga et ses collaborateurs avec le virus Sindbis<sup>297</sup>. La carence en glucose peut également induire l'activation de la kinase GCN2 dans des cellules cancéreuses<sup>300</sup>, vraisemblablement indirectement, en utilisant les acides aminés comme source d'énergie alternative au glucose. Ceci conduirait à une carence en acides aminés dans ces cellules cancéreuses induisant l'activation de GCN2.



**Figure 22. Inhibition de la traduction coiffe-dépendante par la phosphorylation d'eIF2α**

En condition basale, le complexe eIF2 contribue à l'initiation de la traduction globale. L'activation de ce complexe est réalisée par l'échange d'un guanosine diphosphate (GDP) lié à la sous-unité eIF2β contre un guanosine triphosphate (GTP) par la protéine EIF2B. Le complexe eIF2-GTP se lie alors à un méthionyl-ARnt (Met-ARnt) pour former le complexe ternaire qui reconnaît le codon initiateur de l'ARNm et y permet le recrutement des complexes ribosomiaux qui initient la traduction. La phosphorylation d'eIF2α empêche la fixation d'eIF2B au complexe eIF2, inhibant ainsi la formation du complexe ternaire et arrêtant la traduction coiffe-dépendante.



Les carences des différents acides aminés induisent la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  à des niveaux différents. Dans les cellules HepG2, si toutes les carences en acides aminés essentiels (mis à part la valine) conduisent à la phosphorylation de eIF2 $\alpha$ , les carences en leucine et thréonine semblent être celle qui induisent la plus forte élévation du taux de phosphorylation de eIF2 $\alpha$  (environ 10 fois)<sup>301</sup>.

### *Phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ et inhibition de la synthèse protéique globale*

Comme mentionné dans la partie précédente, en condition de stress, les cellules arrêtent la traduction générale des protéines. La synthèse protéique étant un processus consommant beaucoup d'énergie, l'arrêt de la traduction coiffe-dépendante permet de préserver l'énergie pour assurer les fonctions essentielles à la survie des cellules. En condition basale, le complexe eIF2, constitué des sous-unités eIF2 $\gamma$  et eIF2 $\beta$  contribue à l'initiation de la traduction globale des ARNm<sup>247</sup>. L'activation de ce complexe permettant d'initier la traduction est réalisée par l'échange d'un guanosine diphosphate (GDP) lié à la sous-unité eIF2 $\beta$  contre un guanosine triphosphate (GTP) par la protéine EIF2B qui se lie à eIF2 $\alpha$  (Figure 22). Le complexe eIF2-GTP peut alors se lier à un méthionyl-ARNt (Met-ARNt) qui permet la reconnaissance du codon initiateur de la traduction de l'ARNm et le recrutement des complexes ribosomiaux. En condition de stress, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  sur son résidu Ser51 par les kinases de l'ISR inhibe l'échange de GDP contre du GTP par EIF2B, rendant impossible la formation du complexe ternaire qui nécessite le GTP. L'inhibition de cet échange résulte en l'arrêt de la traduction globale coiffe-dépendante (Figure 22).

Pour autant, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  n'a pas pour seul effet l'arrêt de la traduction des protéines. En effet, ce facteur joue aussi un rôle important dans la mise en place des processus nécessaires pour lutter contre les stress rencontrés et possède donc un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Ceci a notamment été mis en évidence dans des études qui ont utilisées des mutants non phosphorylables de la Ser51 d'eIF2 $\alpha$ . Ainsi, l'introduction de ce mutant non fonctionnel dans les cellules les rendent plus sensibles au stress et diminuent leur survie<sup>302 303 282</sup>. Ceci s'explique notamment par le fait qu'eIF2 $\alpha$  active également des facteurs de transcription. En effet, dans le cas par exemple d'une activation d'eIF2 $\alpha$  par une carence en acides aminés, GCN2 active eIF2 $\alpha$  qui elle-même induit la transcription de facteurs de transcription dont ATF4, qui est le plus caractérisé, dont le rôle est de notamment stimuler l'expression de gènes impliqués dans la synthèse et l'absorption des acides aminés afin de mieux faire face à cette carence.

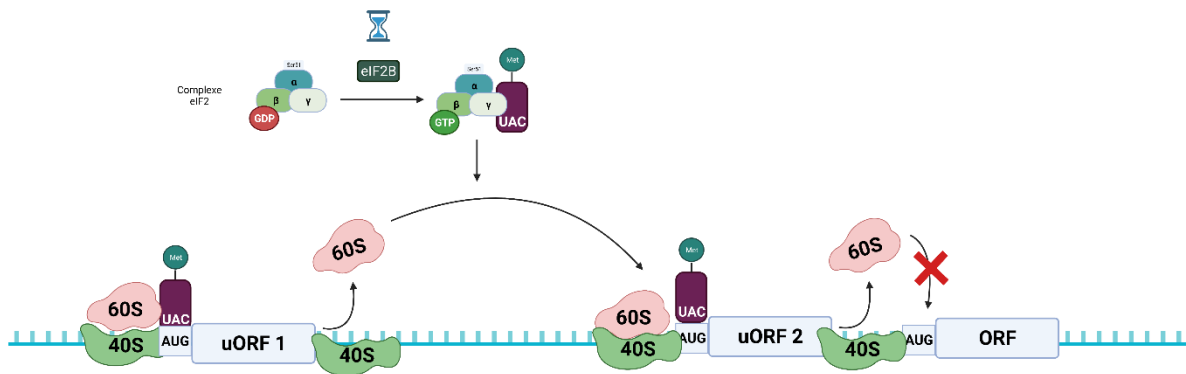
### *b. Régulation de la transcription par ATF4*

#### *Traduction d'ATF4*

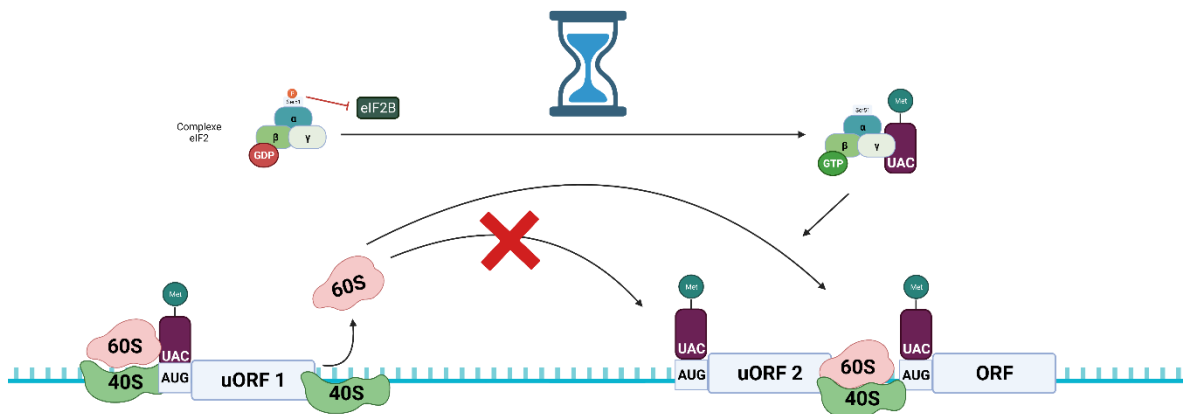
L'arrêt de la traduction globale par les cellules n'est pas cependant suffisant pour permettre aux cellules de faire face aux différents stress, celles-ci doivent également augmenter l'expression de certains gènes afin d'adapter leur réponse au stress. Ainsi, alors que la traduction coiffe-dépendante est à l'arrêt, la cellule induit la traduction de différents facteurs

de transcription dont ATF4 afin d'initier la transcription des gènes utiles à la résistance au stress <sup>304</sup>.

### Condition basale



### Condition de stress



**Figure 23. Traduction d'ATF4 en condition de stress**

En condition normale, le complexe ternaire est recruté au niveau des uORFs en amont de l'ORF d'ATF4. La distance séparant la fin de l'uORF2 et le début de l'ORF d'ATF4 est trop courte pour permettre la reformation du complexe ternaire au niveau de l'ORF après sa dissociation au niveau de l'uORF2, empêchant ainsi la traduction de l'ORF d'ATF4. En condition de stress, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  ralentit la vitesse de reformation du complexe ternaire. Le temps nécessaire à la reformation du complexe ternaire étant plus long, ce dernier n'est pas reformé assez rapidement au niveau de l'uORF2. La lecture de l'uORF2 n'ayant pas lieu, cela permet la traduction de l'ORF d'ATF4.

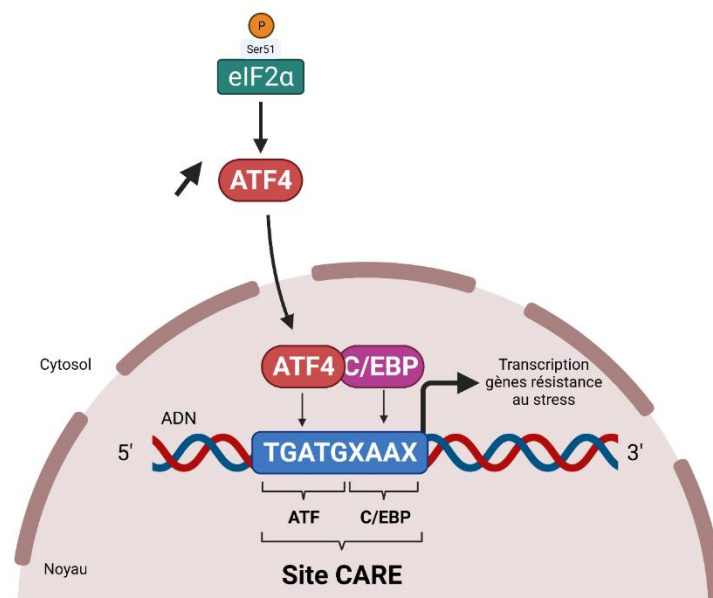
En situation de stress, le temps de reformation des complexes ribosomiaux est allongé <sup>305</sup>. La formation plus longue de ces complexes fait qu'ils ne sont pas reformés assez rapidement pour traduire l'uORF2. Les complexes ribosomiaux se reforment alors à temps au niveau de l'ORF d'ATF4 permettant ainsi sa traduction.

Ce modèle de régulation de la traduction par la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  est soutenu par des résultats expérimentaux. En effet, les uORFs 1 et 2 sont hautement traduits en condition

normale. Cependant, dans les conditions induisant la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ , la traduction de ces uORFs est réprimée contrairement à celle de l'ORF d'ATF4. De plus, les mutations des codons initiateurs des uORFs 1 et 2 induisent respectivement, une diminution de la traduction d'ATF4 en condition de stress et sa traduction constitutive en condition normale <sup>304 306</sup> démontrant le rôle initiateur de l'uORF1 et inhibiteur de l'uORF2 dans la traduction d'ATF4 en situation de stress.

### Régulations de l'expression par ATF4

A la suite de sa traduction, ATF4 va pouvoir migrer vers le noyau et exercer son rôle de facteur de transcription. En effet, ATF4 fait partie de la famille ATF (Activating Transcription Factor) qui comprend 8 membres, les ATF de 1 à 7 et B-ATF. La famille des ATF fait partie des bZIP (basic leucine zipper) qui se fixent à l'ADN grâce à leur domaine basique et forment des homodimères <sup>307</sup> ou des hétérodimères avec d'autres facteurs de transcriptions bZIP tels que NRF2, DDIT3 pour DNA damage-inducible transcript 3 aussi appelé CHOP (C/EBP-homologous protein) et ATF3. ATF4 peut former des hétérodimères avec les facteurs de transcription C/EBP (CCAAT/Enhancer-Binding Protein) et se fixer sur des sites de fixation spécifiques dans les séquences promotrices de l'ADN de ses gènes cibles, appelées CARE (C/EBP-ATF Response Element). Le site de fixation CARE est composé de deux séquences consensus. La première moitié de la séquence CARE comporte un site de fixation pour les facteurs de transcription de la famille ATF alors que la seconde constitue un site de fixation pour ceux de la famille des C/EBP. Les séquences CARE ont été identifiées dans différents gènes et ont permis de définir la séquence consensus : 5'-TGATGXAAX-3' (code IUPAC) (Figure 24).



**Figure 24. Fixation d'ATF4 sur les sites CARE dans les promoteurs de ses gènes cibles**

La phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  induit la traduction d'ATF4. ATF4 se fixe alors à l'ADN sur les sites CAREs composé d'un site de fixation pour les facteurs de transcription de la famille ATF et d'un site de fixation pour ceux de la famille C/EBP. La fixation d'ATF4 sur ces séquences présentes dans les promoteurs des gènes cibles de l'ISR induit leur transcription.

A la fin des années 1990 et le début des années 2000, des séquences permettant l'induction de la transcription des gènes CHOP et ASNS (asparagine synthétase), de façon dépendante des acides aminés, ont été identifiées dans leurs promoteurs. Celles-ci correspondent à la séquence CARE et sont appelées AARE (Amino Acid Response Element) dans le cadre de l'étude de la réponse aux acides aminés (AAR).

Premièrement, une séquence de 7 nucléotides, 5'-CATGATG-3', nécessaire à l'augmentation de la transcription par la carence en leucine et asparagine identifiée dans le promoteur du gène ASNS. En effet, Guerrini et ses collaborateurs, ont montré qu'en mutant cette séquence dans les cellules HeLa, la transcription d'ASNS induite par la carence en leucine et asparagine est inhibée par la mutation de cette séquence qu'ils ont alors appelé AARE<sup>308</sup>. Par la suite, un autre laboratoire, a identifié cette même séquence, 5'-GTTTCATCA-3', comme nécessaire à la transcription d'ASNS pendant l'AAR mais également lors d'une carence en glucose et le stress du RE qu'ils ont alors nommée NSRE (nutrient sensing-response element)<sup>309</sup>.

Une autre séquence également requise pour la transcription pendant l'AAR a été identifiée et nommée NSRE2. Les 2 NSRE sont distants de 12 nucléotides et l'altération de cette distance supprime la transcription d'ASNS pendant l'AAR. Suggérant que l'interaction entre les facteurs de transcription se fixant sur ces séquences NSRE est cruciale pour l'induction de la transcription<sup>310</sup>.

En parallèle, Bruhat et ses collaborateurs ont identifié des séquences similaires dans le promoteur de CHOP<sup>311</sup>. En clonant la région promotrice de CHOP, et en la combinant au gène codant pour la luciférase, ils ont montré que la carence en acides aminés essentiels induit la transcription du gène de la luciférase. Par la suite, en réalisant des mutations dans la séquence promotrice, une séquence longue de 9 nucléotides, 5'-ATTGCATCA-3'<sup>312</sup> a été identifiée comme nécessaire à la transcription de la construction luciférase en condition de carence en leucine. Cette séquence différait alors par 2 nucléotides avec celle identifiée pour ASNS par la suite<sup>310</sup>.

Bruhat et ses collaborateurs ont pu déterminer, par mutation des nucléotides de la séquence AARE de CHOP, sa séquence de base et l'ont défini comme étant : 5'-VTTDCRTCA-3' (code IUPAC)<sup>313</sup>. Des séquences AARE ont ensuite été identifiées dans les promoteurs d'autres gènes dont les transporteurs d'acides aminés SNAT2<sup>314</sup>, ATF3<sup>315</sup> et CAT1<sup>316</sup> conduisant à la définition de la séquence consensus : 5'-VTTDCATCA-3'<sup>317</sup>.

#### *Facteurs de transcription induits par ATF4*

ATF4 régule la transcription d'autres facteurs de transcription appartenant aux familles ATF et C/EBP entre autres. Les facteurs de transcription cibles d'ATF4 les plus décrits sont ATF5, ATF3 et CHOP.

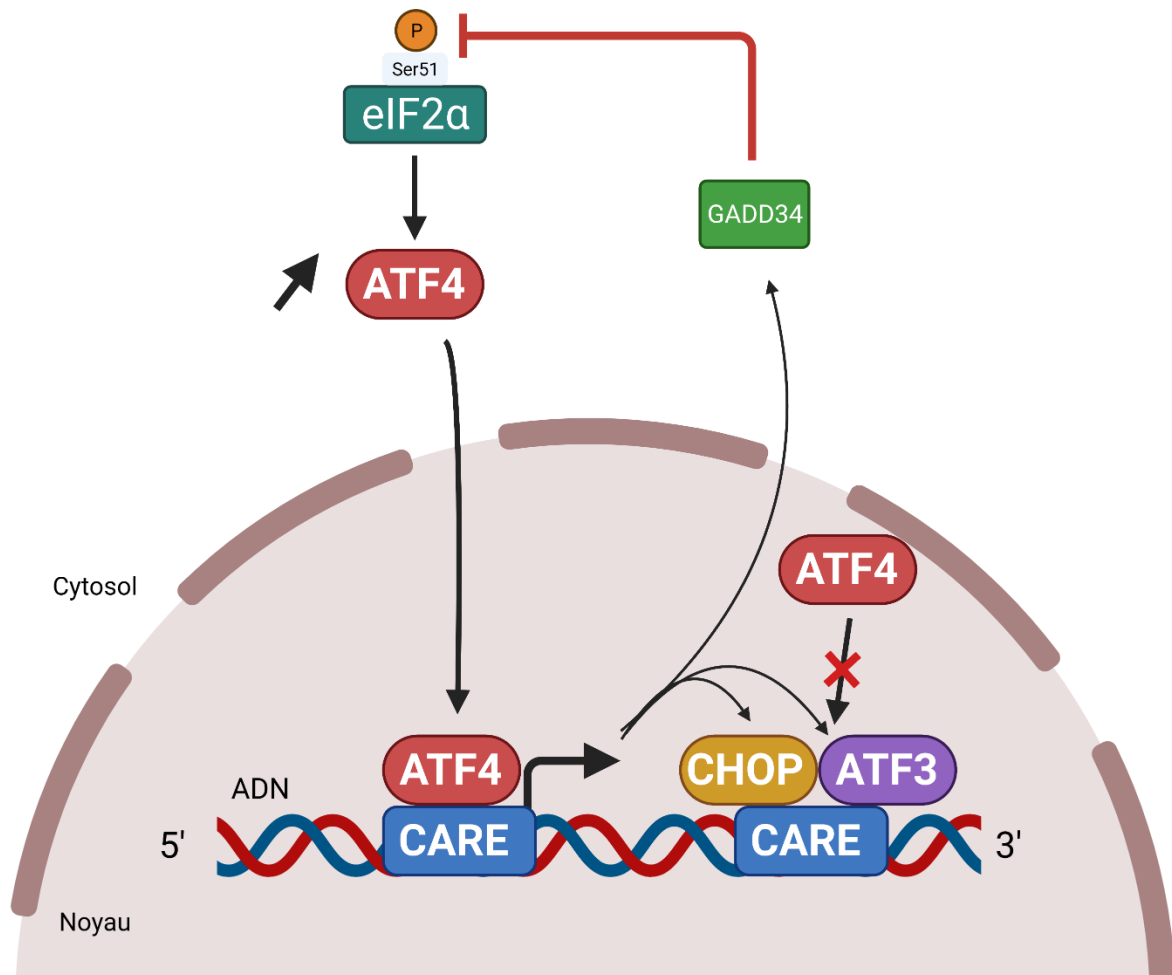
ATF5 partage une forte homologie avec ATF4. Comme ce dernier, la région 5'-UTR de son ARNm contient des uORFs permettant sa traduction lors de l'arrêt de la traduction globale en

condition de stress <sup>318 319</sup>. Il forme des hétérodimères avec ATF4 et des C/EBP et induit l'expression de gènes induits dans l'ISR tels que ASNS <sup>320</sup>.

La transcription d'ATF3 est induite par ATF4 <sup>321 322</sup> après l'induction de l'ISR par GCN2 et PERK <sup>323 324</sup>. Non seulement, ATF4 induit la transcription d'ATF3 mais l'ARNm de ce dernier est également stabilisé par la protéine HuR <sup>325</sup>, tel que décrit plus précédemment pour le transporteur CAT1 dans la partie 2 <sup>235</sup>. Cependant, ATF3 aurait principalement un effet antagoniste à celui d'ATF4 en inhibant la transcription des gènes induits par ce dernier <sup>322</sup> dont sa propre expression. Toutefois, ATF3 peut subir un épissage alternatif et induire l'expression d'une isoforme plus courte, qui elle, supporte l'action d'ATF4 <sup>324</sup>.

CHOP est également une cible d'ATF4 <sup>326</sup> dont la transcription et la traduction sont rapidement et fortement induites après activation de l'ISR. En effet, l'UTR-5' de CHOP contient des uORFs qui permettent sa traduction lors de l'arrêt de la transcription globale comme pour ATF4 <sup>327</sup>. Comme ATF3, CHOP réprime la transcription de certains gènes cibles d'ATF4 comme ASNS <sup>328</sup>.

Ainsi, les facteurs de transcription tels que CHOP et ATF3 permettent d'opérer un rétrocontrôle de la transcription de certains gènes cibles d'ATF4. La transcription de CAT1 est par exemple induite par ATF4 et par la suite réprimée par ATF3<sup>316</sup> (Figure 25).



**Figure 25. Mécanismes de rétrocontrôle de la voie eIF2α/ATF4**

Certains gènes cibles d'ATF4 sont d'autres facteurs de transcriptions tels que CHOP et ATF3 qui se fixent également sur les séquences CARE. Leurs fixations aux séquences CARE peut empêcher la liaison d'ATF4 et empêcher l'augmentation de la transcription de ses gènes cibles. ATF4 induit également la transcription de GADD34 qui induit la déphosphorylation d'eIF2α et donc un rétrocontrôle de l'ISR.

Il a également été démontré que TRB3 (Tribbles homolog 3) opère un rétrocontrôle sur la transcription des cibles d'ATF4 en se fixant sur les CAREs<sup>329</sup>. De plus, ces facteurs de transcription peuvent également opérer, avec ATF4, un rétrocontrôle en amont de la transcription par ATF4 en inhibant la phosphorylation d'eIF2α. En effet, ils induisent la transcription de GADD34 (Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34)<sup>330 323 331</sup> qui participe à la déphosphorylation d'eIF2α<sup>332 333</sup> (Figure 25) en interagissant avec la phosphatase PP1 (Protein Phosphatase 1) et en la conduisant vers eIF2α<sup>334</sup>. Ce rétrocontrôle permet alors de relancer la traduction coiffe-dépendante à la fin de la phase de stress.

Si le stress reste induit, cette reprise de la traduction peut faire basculer les mécanismes de survie mis en place par la cellule vers des processus de mort cellulaire en traduisant les ARNm de protéines pro-apoptotiques<sup>330</sup>. En effet, les facteurs de transcriptions tels qu'ATF3 et CHOP sont impliqués dans l'induction de l'apoptose. En situation de stress prolongé, CHOP induit la transcription de gènes pro-apoptotiques tels que BIM (Bcl2-interacting mediator of cell death)<sup>335</sup> PUMA (p53 up-regulated modulator of apoptosis)<sup>336 337</sup> et des récepteurs de mort DR4 et DR5<sup>338 339 340</sup>. En plus d'initier la transcription de ces facteurs pro-apoptotiques, CHOP inhibe en parallèle la transcription de gènes anti-apoptotiques tels que BCL2 (B-cell lymphoma 2)<sup>341 342</sup> et BCL-XL (B-cell lymphoma-extra large) qui empêchent la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale<sup>343</sup>.

### *Réponses différentes selon la nature de la carence*

De façon intéressante, la régulation de l'expression des gènes diffère selon les acides aminés manquants. En effet, le nombre de gènes dont la transcription est induite par la carence en leucine (301) est différent de celui des gènes surexprimés par la carence en cystéine (407) dans les cellules HepG2/C3A. De plus sur ces gènes dérégulés par la carence en leucine et cystéine, seuls 57 sont communs aux deux carences<sup>272</sup>. Bien que la signalisation de la carence en AA converge vers ATF4, les carences en différents acides aminés induisent, comme pour la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ , la traduction d'ATF4 à des niveaux plus ou moins importants<sup>301</sup> qui ne sont pas corrélés avec les niveaux de phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ . Par exemple, bien que la carence en valine n'induit pas de phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ , elle induit étonnamment l'expression d'ATF4 la plus importante<sup>301</sup>. Il est donc possible que l'augmentation des niveaux protéiques d'ATF4 induite par la carence en valine soit indépendante de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ . Il a en effet été montré que la carence en acides aminés pouvait induire la phosphorylation d'eIF2B indépendamment d'eIF2 $\alpha$ <sup>344</sup>. La phosphorylation d'eIF2B diminuant son activation de la traduction coiffe-dépendante, il est possible que la carence en valine induise la traduction d'ATF4 de façon indépendante de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ .

Les divers acides aminés ont également différents effets sur la transcription des cibles d'ATF4. La carence en acides aminés essentiels, semi-essentiels mais aussi en certains acides aminés non essentiels (asparagine, aspartate, alanine, glutamate et sérine) induit la surexpression de CHOP<sup>345 312</sup> et ASNS<sup>346</sup> avec des niveaux de surexpression différents. De plus, selon l'acide aminé manquant dans le milieu, l'activité au niveau des promoteurs de ces gènes varie<sup>347</sup>. En effet, Jousse et ses collaborateurs ont démontré que, dans les cellules HeLa, la carence en méthionine induit une forte activité luciférase au niveau du promoteur de CHOP alors que celle-ci est moins importante pour le promoteur d'ASNS. De façon, intéressante, les carences en leucine, cystéine, asparagine et histidine induisent, quant à elle, une activité luciférase plus importante au niveau du promoteur d'ASNS que pour celui de CHOP<sup>347</sup>.

L'ensemble de ces données suggèrent que selon les acides aminés manquant différentes voies seraient impliquées dont la voie GCN2. Bien que les régulations de l'ISR et de GCN2 convergent vers la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et l'induction de la transcription par ATF4, il semble que des

acteurs moléculaires permettent d'adapter les réponses aux différentes carences en acides aminés. Il est possible que ces différences puissent s'effectuer, entre autres, *via* les partenaires de dimérisation d'ATF4 qui permettraient la liaison à différentes séquences dans les promoteurs des divers gènes cibles.

### c. Rôle physiologiques de GCN2

#### *Cibles impliquées dans le métabolisme*

Lors de l'induction de l'ISR, il a été montré que l'augmentation de la transcription de gènes impliqués dans la néoglucogénèse tel que PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) est aussi dépendante d'ATF4<sup>348</sup>. Des études ont également montré que des gènes inhibiteurs de la signalisation de l'insuline *via* la voie Akt, tel que TRB3 (Tribbles homolog 3)<sup>349 350 351</sup> sont surexprimés par ATF4. En outre, ATF4 induit également la surexpression des inhibiteurs de la voie mTOR, tels que REDD1 (protein regulated in development and DNA damage response 1) et sestrin2<sup>352 353 354</sup>, montrant que l'ISR peut participer à l'inhibition de mTOR lors de stress tels que la carence en AA. Il a également été démontré que la voie GCN2 induit la surexpression de gènes autophagiques<sup>355</sup> dont les mécanismes seront également décrits plus précisément dans la partie de ce manuscrit traitant de la macro-autophagie.

ATF4 induit également la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés tels que des synthétases d'ARNt et ASNS<sup>321 356 357 326</sup> qui synthétise de l'asparagine et du glutamate à partir, respectivement, d'aspartate et de glutamine<sup>358</sup>. La régulation de l'expression d'ASNS par l'ISR a été fortement étudiée. Ainsi, ASNS est régulièrement utilisée dans les études de l'ISR comme un marqueur de son induction (Ye et al., 2010)<sup>360 361</sup>.

Certains transporteurs d'acides aminés voient également leur transcription augmenter par l'action d'ATF4. Il a en effet été démontré que les surexpressions d'ASCT1<sup>359</sup>, ASCT2<sup>360</sup>, de 4F2hc<sup>321</sup> et des chaînes légères de xCT<sup>362</sup> et LAT1<sup>321</sup> sont dépendantes d'ATF4. SNAT2<sup>363</sup> et CAT1<sup>364</sup>, qui sont également surexprimés par ATF4, sont souvent utilisés comme des marqueurs de l'activation de l'ISR<sup>365 360</sup>, tout comme ASNS.

#### *Rôle de GCN2 dans la régulation de la prise alimentaire*

Les acides aminés essentiels provenant de l'alimentation, il est important pour les animaux de discriminer les aliments qui les contiennent en quantité suffisante et ceux qui en sont « dépourvus ». Il a été démontré que la prise alimentaire des animaux est réduite lorsqu'ils sont nourris avec des aliments pauvres en un acide aminé essentiel, ces animaux développant alors une aversion pour ces aliments<sup>366</sup>. Des travaux ultérieurs ont montré que cette régulation est opérée par la région cérébrale du cortex pyriforme antérieure (APC)<sup>367</sup>. En effet, des lésions opérées dans l'APC annulent l'aversion pour les aliments déséquilibrés en acides aminés essentiels chez le rat<sup>368</sup> et le poulet<sup>369</sup>. Cette aversion peut également être supprimée par l'injection dans l'APC de l'acide aminé limitant dans l'aliment<sup>370 371</sup> alors que l'injection de dérivés alcooliques d'acides aminés tels que le thréoninol et le leucinol réduit la



prise alimentaire en inhibant par compétition l'acylation des ARNt<sup>372</sup>. GCN2 étant activée par les ARNt non chargés, cela suggère que GCN2 est bien impliquée dans la diminution de la prise alimentaire induite par les aliments déficients en acides aminés essentiels. Cela a été démontré par la délétion de GCN2 dans l'APC de rats. En effet, la délétion de GCN2 annule la diminution de la prise alimentaire provoquée par des aliments déficients en AAE et observée chez des animaux de type sauvage<sup>372 373 374</sup>.

#### d. La voie GCN2 chez les poissons

Comme pour les transporteurs d'acides aminés, la voie GCN2 et l'ISR ont été peu étudiées chez les espèces de poissons. Cependant, au début des années 2000, eIF2 $\alpha$  a été caractérisée dans des lignées cellulaires de truite et de poisson zèbre. Les protéines eIF2 $\alpha$  de la truite et du poisson zèbre partagent respectivement 93 et 91 % d'homologie avec la protéine humaine et ces sites de phosphorylation sont conservés chez ces deux poissons<sup>375</sup>. De plus, cette étude montre que les protéines eIF2 $\alpha$  de la truite et du poisson zèbre peuvent être phosphorylées par les kinases d'eIF2 $\alpha$  mammifères HRI, PKR et PERK ainsi que par des stress similaires à ceux qui sont connus chez les mammifères (stress du RE, infection virale). Malheureusement, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  par GCN2 et la carence en acides aminés n'a pas été testée dans cette étude. Toutefois, il a été observé chez la truite que la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  répond à la déficience en méthionine dans le muscle<sup>376</sup> et le foie<sup>365 361</sup>. De plus, des gènes cibles de GCN2 chez les mammifères tels que CAT1, SNAT2, ASNS et CHOP chez des truites nourries avec des aliments déséquilibrés en méthionine<sup>365 361 377</sup>.

Dans la plupart des études chez les poissons d'intérêt agronomique, la voie GCN2 est étudiée par la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et la transcription de gènes cibles connus chez les mammifères comme étant des cibles de GCN2 tels que ATF4, ASNS et CHOP. Cependant, aucune étude ne permet de lier la surexpression de ces gènes et la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  à GCN2, pharmacologiquement ou génétiquement.

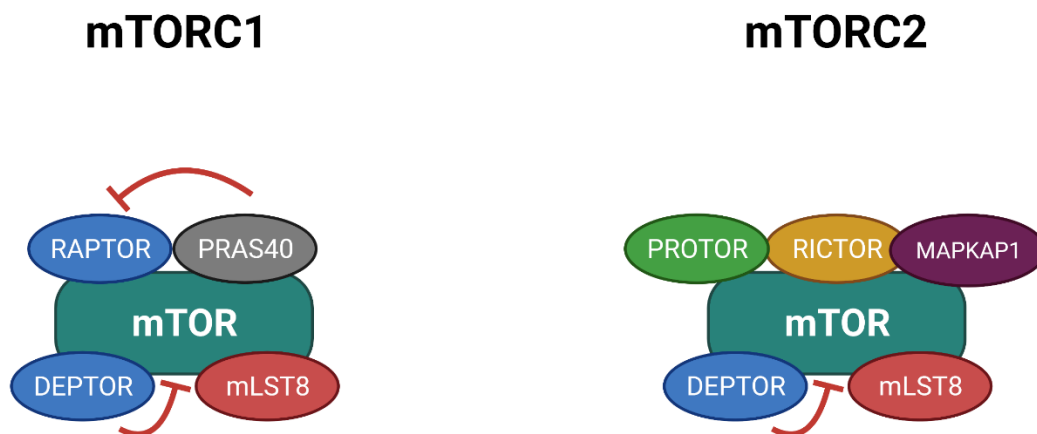
## B- La voie mTOR

### Découverte de la voie mTOR

La rapamycine est un agent microbien antibiotique découvert suite à des prélèvements de bactéries sur l'île de Rapa Nui (d'où elle tire son nom), réalisés en 1964 (Ile de Pâques) <sup>378</sup>. Des analyses ultérieures ont montré que ce composé inhibait le signal nécessaire à la croissance et la prolifération des eucaryotes, sans en connaître complètement le mécanisme. C'est en 1994, lors d'études menées chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, qu'a été identifiée la protéine TOR pour Target Of Rapamycin comme étant la cible directe de la rapamycine <sup>379</sup>. Après 30 ans d'études par de nombreux laboratoires, TOR a été renommée mTOR (pour mechanistic Target Of Rapamycin) et apparaît désormais comme un acteur majeur de la signalisation cellulaire et du métabolisme des eucaryotes qui régule la croissance en fonction de divers stimuli environnementaux.

#### a. Les deux complexes de mTOR

mTOR est une sérine/thréonine kinase constituant la protéine catalytique de deux complexes multiprotéiques différents, les complexes mTOR 1 (mTORC1) et 2 (mTORC2) (Figure 26).



**Figure 26. Structure des complexes mTORC1 et mTORC2**

Ceux-ci diffèrent par leurs constituants protéiques, leurs régulations, leurs cibles ainsi que leur sensibilité à la rapamycine. En effet, mTORC2 y est très peu sensible contrairement à mTORC1 <sup>380</sup>, bien qu'une exposition prolongée à la rapamycine conduise à l'inhibition de mTORC2 <sup>381</sup>.

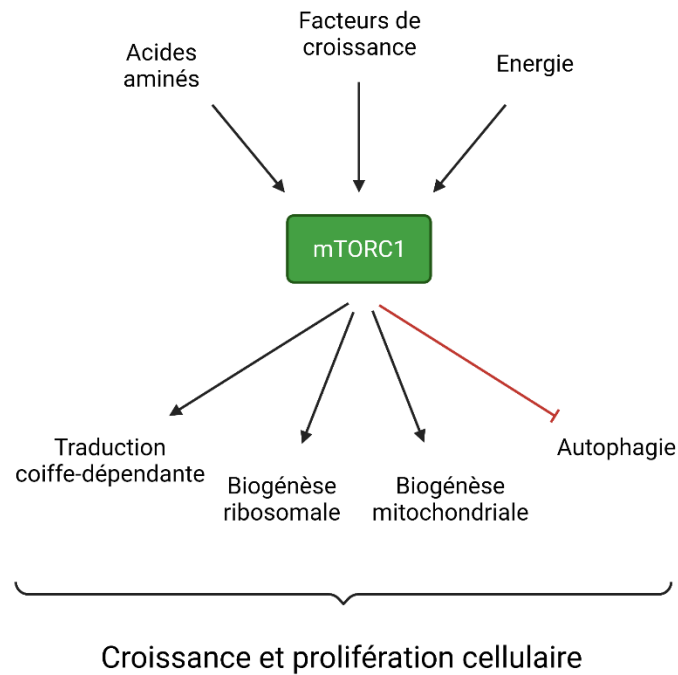
### Constitution des complexes mTORC1 et mTORC2

Le complexe mTORC1 est constitué de mTOR et des protéines mLST8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8) et RAPTOR (Regulatory-Associated Protein of mTOR). mLST8, aussi connue sous le nom GβL (G protein Beta subunit-Like), permet la stabilisation du complexe mTORC1

en facilitant la liaison de RAPTOR et mTOR ainsi que celle de son site actif augmentant son activité kinase<sup>382</sup>. RAPTOR est, quant à elle, essentielle à la liaison entre le complexe mTORC1 et ses substrats. En effet, RAPTOR se lie aux protéines présentant des motifs particuliers appelés TOS (TOR Signaling) qui contiennent les cibles de mTOR telles que 4EBP1 (eIF4E Binding Protein 1)<sup>383</sup> et S6K1 (Ribosomal protein S6 kinase 1)<sup>384 385</sup>. En plus de mLST8 et RAPTOR deux protéines inhibitrices peuvent également se lier au complexe mTORC1. L'une d'elles, PRAS40 (Proline-Rich Akt Substrate 40 kDa) se fixe à RAPTOR et empêche la liaison des substrats de mTORC1 à RAPTOR<sup>386</sup>. L'autre inhibiteur, DEPTOR, se lie directement à mTOR et inhibe donc l'activité des deux complexes mTORC1 et mTORC2<sup>387</sup> (Figure 26).

mTORC2 est composé, tout comme mTORC1, des protéines mTOR et mLST8 qui permettent la stabilisation du complexe<sup>388 389</sup>, ainsi que des protéines RICTOR (Rapamycin-insensitive companion of mTOR), PROTOR (Protein observed with Rictor) et MAPKAP1 (Mitogen-activated protein kinase 2-associated protein 1) aussi connue sous le nom de mSIN1 (Stress-activated map kinase-interacting protein 1) qui lui sont exclusives. RICTOR est essentielle à l'assemblage de mTORC2, améliorant sa stabilité et ses interactions avec ses substrats<sup>390</sup>. MAPKAP1 permet la phosphorylation d'Akt par mTORC2<sup>391</sup> qui intervient dans l'activation de mTORC1. RICTOR permet la fixation de MAPKAP1 et PROTOR au complexe mTORC2<sup>392</sup> (Figure 26).

## b. Rôles cellulaires

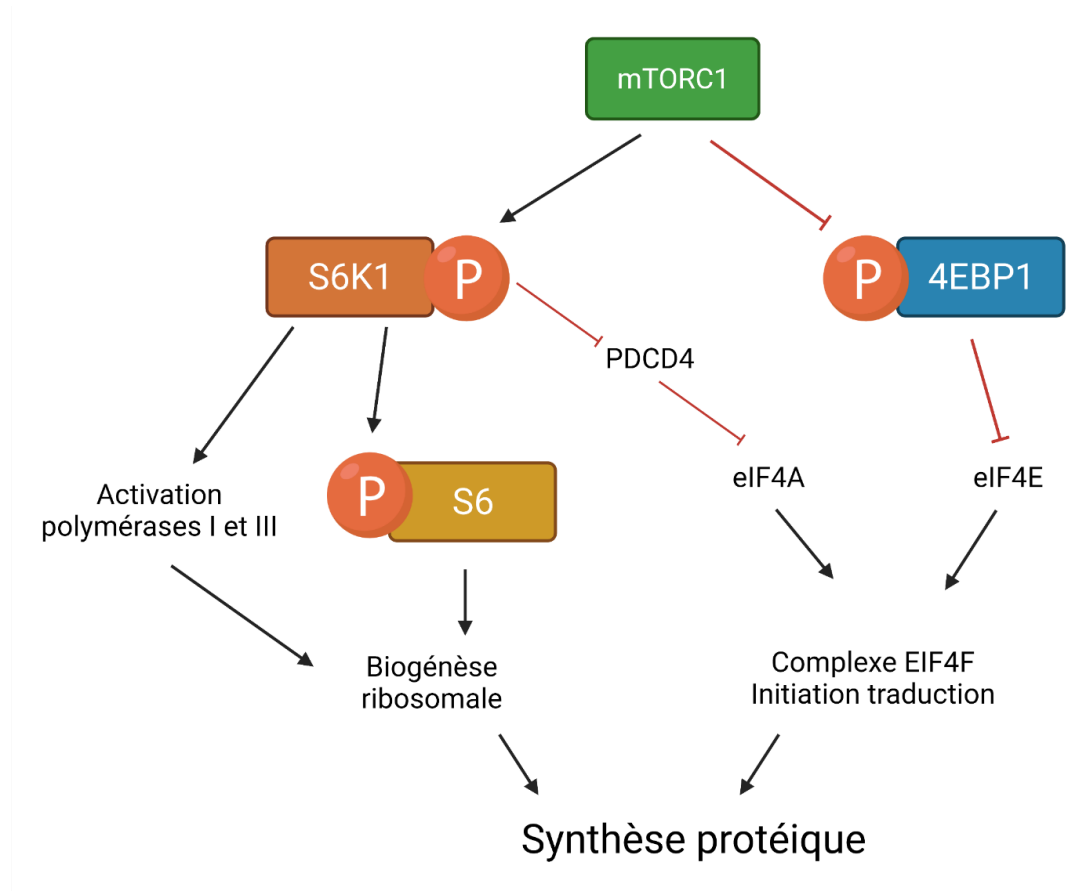


**Figure 27. Rôles principaux de mTORC1**

Le complexe mTORC1 permet à la cellule d'adapter les fonctions anaboliques et cataboliques en fonction notamment de la disponibilité en acides aminés, des facteurs de croissance et du niveau énergétique, en régulant notamment la traduction coiffe-dépendante, la biogénèse ribosomale, la synthèse de lipides, les fonctions mitochondriales et en inhibant les processus cataboliques telle que l'autophagie (Figure 27).

### *Synthèse protéique*

Au cours de la régulation de la traduction, la disponibilité d'eIF4E est un point essentiel. Lorsque la voie mTOR est inactive, la protéine 4EBP1 se lie à eIF4E inhibant de manière compétitive son association avec le complexe EIF4F (Gingras et al, 1999). L'inhibition de la liaison entre eIF4E et le complexe EIF4F empêche la liaison de ce dernier à la coiffe des ARNm, inhibant ainsi l'initiation de la traduction coiffe-dépendante (Figure 27). Lorsque mTORC1 est activé, il phosphoryle 4EBP1, inhibant sa liaison avec eIF4E <sup>393 394</sup> (Figure 28). Celui-ci est alors disponible pour se lier au complexe EIF4F et à la coiffe des ARNm induisant une augmentation de la traduction coiffe-dépendante. Le complexe mTORC1 est la kinase majeure de 4EBP1 <sup>395</sup>. mTORC1 se fixe à 4EBP1, au niveau de sa TOS, grâce à RAPTOR permettant sa phosphorylation par mTOR <sup>383</sup>.



**Figure 28. Régulation de la synthèse protéique par mTORC1**

L'activation de mTORC1 induit la synthèse protéique d'une part en activant les polymérase I et III ainsi que la biogénèse ribosomale en phosphorylant la kinase S6K1 et d'autre part en levant l'inhibition du complexe initiateur de la traduction EIF4F par 4EBP1 en phosphorylant cette dernière.

mTORC1 phosphoryle également, après liaison de RAPTOR à sa TOS, la protéine S6K1 au niveau de son résidu Thr389<sup>396</sup>. Cela crée un site de fixation pour PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1)<sup>397</sup>, une protéine impliquée dans l'activation de mTOR par l'insuline *via* Akt, et permet la phosphorylation de S6K1 au niveau de son résidu Thr229 est également requise pour une activation complète<sup>398 399</sup>.

L'activation de S6K1 induit l'activation des ARN polymérase I et III qui synthétisent l'ARN ribosomique, le principal constituant des ribosomes<sup>400</sup> (Figure 28). De plus, S6K1 active également la protéine EIF4B qui est un régulateur positif de la traduction coiffe-dépendante levant l'inhibition de PDCD4 sur eIF4A, un élément du complexe EIF4F<sup>401</sup>. S6K1 phosphoryle également la protéine ribosomale S6 qui est un élément constitutif de la sous-unité ribosomale 40S, nécessaire à l'initiation de la traduction (Figure 28). Cependant le rôle de la phosphorylation de S6 sur l'initiation de la traduction reste ambigu. En effet, la délétion des 5 sites de phosphorylation de S6 dans des cellules MEF n'a aucun effet sur l'efficacité de la traduction bien qu'elle réduise la taille des cellules<sup>402</sup>. L'inhibition de mTORC1 par la rapamycine inhibe les phosphorylations de 4EBP1 et de S6K1<sup>403 404</sup>.

## Synthèse lipidique

Lorsque mTORC1 est activé en période d'abondance de nutriments, celui-ci n'induit pas seulement la synthèse protéique mais également la lipogenèse. Il avait été démontré que des traitements à la rapamycine réduisaient l'expression de gènes impliqués dans la synthèse lipidique<sup>405 406</sup>. En effet, mTORC1 régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la lipogenèse en régulant l'expression des facteurs de transcription SREBPs (Sterol Regulatory Element-Binding Protein)<sup>407 408 407</sup>. De plus, l'activation de mTORC1 ne régule pas seulement la transcription des SREBPs, mais également leur activité<sup>409 407 410</sup>. mTORC1 phosphoryle et inactive lipin-1, un inhibiteur des SREBPs. Sa phosphorylation induit son exclusion du noyau, supprimant son inhibition de la transcription par les SREBPs<sup>411</sup>. S6K1 joue également un rôle dans la régulation des SREBPs en induisant leur clivage au niveau de l'appareil de Golgi, permettant leur relocalisation vers le noyau et donc leur activité de transcription des gènes impliqués dans la lipogenèse<sup>409 410</sup>.

Certaines études montrent que la déplétion de SREBPs dans les cellules réduit leur prolifération alors que la voie mTOR est activée<sup>409 410</sup>. Ceci démontre qu'une partie du rôle que mTORC1 joue sur la prolifération cellulaire, est due à sa régulation de la synthèse lipidique par les SREBPs.

## Métabolisme mitochondriale

mTORC1 régule également le métabolisme et la biogénèse mitochondriale. En effet, des études montrent que l'inhibition de mTORC1 par la rapamycine réduit le potentiel de membrane mitochondrial, la consommation d'oxygène et la production d'ATP<sup>412</sup> ainsi que l'expression de gènes impliqués dans les réactions de phosphorylation oxydative *via* le facteur de transcription PGC-1 $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha)<sup>413</sup>. De plus, la délétion de RAPTOR réduit la biogénèse mitochondriale induite par PGC-1 $\alpha$ <sup>414</sup> probablement en inhibant l'interaction de mTORC1 avec PGC1- $\alpha$ <sup>413</sup>.

mTORC1 induit également l'activation du facteur de transcription impliqué dans la régulation de fonctions mitochondriales, HIF1 $\alpha$  (Hypoxia Inducible Factor 1  $\alpha$ ). HIF1 $\alpha$  présente, tout comme 4EBP1 et S6K1, un motif TOS permettant la fixation de mTORC1. La mutation du motif TOS d'HIF1 $\alpha$  inhibe son activité de transcription sans affecter sa localisation nucléaire<sup>415</sup>. L'induction de la transcription d'HIF1 $\alpha$  est induite par mTORC1 *via* l'activation, par phosphorylation, du facteur de transcription STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3). De plus, l'induction de la traduction, par les phosphorylations de 4EBP1 et S6K1, augmente la traduction de HIF1 $\alpha$ <sup>416</sup>. L'activation de HIF1 $\alpha$  induit l'expression de gènes impliqués dans la glycolyse et des transporteurs de glucose afin d'augmenter l'oxydation du glucose lors de l'activation de mTORC1<sup>409</sup>.

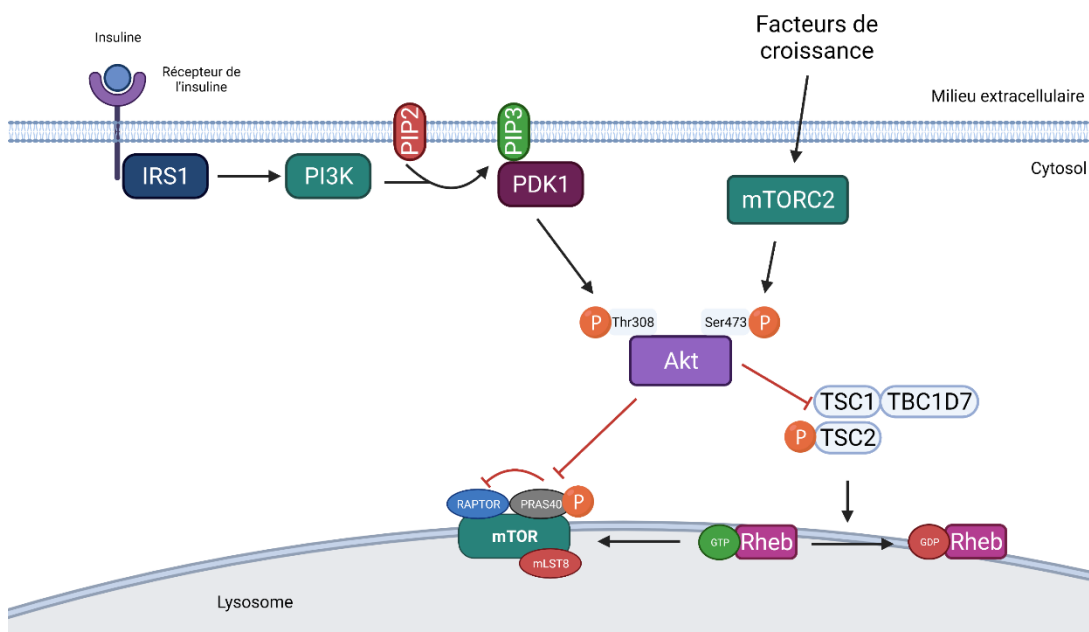
## Catabolisme

Au-delà de favoriser l'anabolisme, mTORC1 inhibe le catabolisme autophagique à différentes étapes incluant l'initiation, la nucléation, l'élongation et la maturation des autophagosomes ainsi que la biogénèse lysosomale. Les mécanismes permettant l'inhibition de l'autophagie par mTORC1 seront détaillés dans la partie autophagie du manuscrit (Inhibition par la voie mTOR).

### c. Régulations de la voie mTOR

#### Régulations par les facteurs de croissance

La régulation de mTORC1 par les facteurs de croissance converge vers le complexe TSC (Tuberous Sclerosis Complex). Ce complexe fonctionne comme une GAP (GTPase-Activating Protein) de la protéine Rheb (Ras homolog enriched in brain). Rheb, qui, lorsqu'elle est couplée à un GTP, est active et induit l'activation du complexe mTORC1 à la surface des lysosomes.



**Figure 29. Activation de mTORC1 par l'insuline et les facteurs de croissance**

La fixation de l'insuline à son récepteur induit la phosphorylation de l'IRS1 permettant son interaction avec la kinase PI3K induisant son activation. PI3K phosphoryle alors PIP2 pour former PIP3 qui permet le recrutement de PDK1 qui phosphoryle Akt sur son résidu Thr308. Les facteurs de croissances activent mTORC2 qui phosphoryle Akt sur son résidu Ser473. Ces deux phosphorylations induisent l'activation d'Akt qui active mTORC1 en inhibant le complexe TSC par phosphorylation qui inhibe lui-même Rheb et en levant également l'inhibition de PRAS40 sur mTORC1 par phosphorylation.

En conditions nutritives riches, l'insuline et le facteur de croissance analogue à l'insuline 1 (IGF1) se fixent à leurs récepteurs respectifs sur la membrane plasmique. La fixation de ces hormones sur leur récepteur induit la phosphorylation de l'IRS (Insulin Receptor Substrate).

La phosphorylation de l'IRS induit un changement conformationnel qui permet son interaction avec la kinase PI3K (Phosphatidylinositol-3-kinase) qui induit l'activation de cette dernière <sup>417</sup> (Figure 29).

Par la suite, PI3K phosphoryle le phospholipide PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-biphosphate) formant le PIP3 (phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphate). Le PIP3 formé dans la membrane plasmique permet le recrutement des kinases PDK1 et Akt à la membrane. PDK1 phosphoryle alors Akt au niveau de son résidu Thr308 <sup>418 419</sup>. Afin qu'Akt soit pleinement fonctionnelle, elle doit être phosphorylée sur une autre sérine (Ser473). La phosphorylation de ce résidu est opérée par mTORC2 qui est activé par les facteurs de croissance (Figure 29).

Une fois phosphorylée sur les 2 sites, Akt devient active et phosphoryle l'inhibiteur de mTORC1 PRAS40. En condition de carence, PRAS40 se fixe à RAPTOR et inhibe la fixation des substrats de TORC1 à ce dernier. La phosphorylation du résidu Thr246 de PRAS40 par Akt empêche sa fixation à RAPTOR et donc son inhibition de l'activité de mTORC1 <sup>420</sup> (Figure 29).

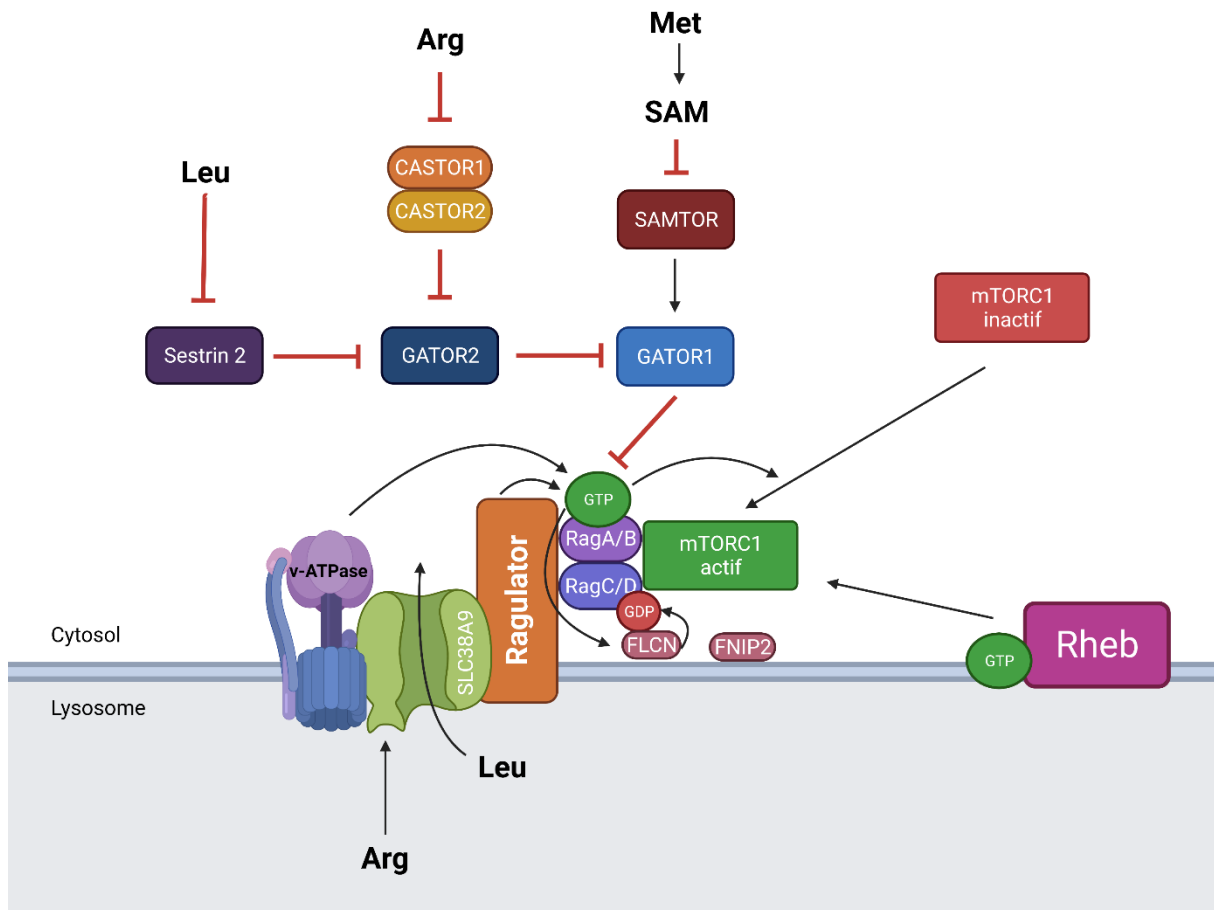
Akt phosphoryle également TSC2 qui, avec TSC1 et TBC1D7 (TBC1 domain family member 7), forment le complexe TSC. Ce complexe possède un domaine GAP (GTPase-activating Protein) qui inhibe mTORC1 en stimulant l'activité GTPase de Rheb. Quand le complexe TSC est fixé à Rheb, ce dernier hydrolyse le GTP en GDP, le rendant inactif <sup>421</sup>. Akt phosphoryle TSC2 sur différents sites <sup>422 423</sup>, ce qui entraîne la dissociation du complexe TSC de la membrane lysosomale, levant son effet inhibiteur sur Rheb et donc permettant l'activation de mTORC1 <sup>424 425 426 422</sup> (Figure 29).

### *Régulations par les acides aminés*

L'activation de mTORC1 par Rheb au niveau de la membrane lysosomale nécessite que mTORC1 y soit localisé. Cependant, en condition de carence en acides aminés, mTORC1 est principalement localisée dans le cytosol. C'est la présence d'acides aminés dans le cytosol et dans les lysosomes qui va induire sa relocalisation vers la membrane lysosomale par le biais de différents senseurs d'acides aminés.

La localisation de mTORC1 à la membrane lysosomale est opérée par le complexe Regulator-Rags <sup>427</sup>. Les Rags (Ras-related GTPases) sont des GTPases qui forment des hétérodimères. Il existe 4 Rags, nommés RagA, B, C et D. RagA et RagB forment des hétérodimères avec RagC ou RagD <sup>428 429 430</sup>. Ces hétérodimères se lient au complexe Regulator qui est ancré dans la membrane lysosomale (Figure 30).





**Figure 30. Régulations de l'ancrage de mTORC1 à la membrane lysosomale par les acides aminés**

Ragulator lie un GTP à RagA/B, ce qui lui permet de fixer mTORC1 à la membrane lysosomale et permet son activation par Rheb. Le transport de leucine de la lumière lysosomale vers le cytosol par SLC38A9 augmenté par la présence d'arginine intralysosomale favorise son interaction avec Ragulator et son effet sur l'activation de mTORC1. La liaison du GTP à Rag A/B est inhibée par la protéine GATOR1. GATOR 1 est elle-même inhibée par SAMTOR et GATOR2. SAMTOR est inhibée par SAM (un métabolite de la méthionine) alors que GATOR2 est inhibée par la sestrine 2 et le complexe CASTOR eux-mêmes inhibés respectivement par la leucine et l'arginine. Ainsi la présence cytoplasmique d'arginine, leucine et méthionine induisent l'inhibition de GATOR1 permettant l'ancrage de mTORC1 à la membrane lysosomale.

La fixation de mTORC1 aux Rags qui induit son ancrage à la membrane lysosomale dépend de la liaison des Rags à un GDP ou GTP <sup>427</sup>. Lors d'une carence en acides aminés, RagA et B sont liés à un GDP alors que RagC et D sont eux liés à un GTP. La fixation de mTORC1 aux Rags nécessite la situation inverse (GTP lié à RagA/B et GDP à RagC/D). C'est Ragulator qui permet l'échange de nucléotide en fonctionnant comme une GEF (Guanosine Exchange Factor) et qui lie donc un GTP à RagA/B.

L'échange de GDP contre du GTP de RagA/B induit la dissociation du complexe lysosomal de la folliculine constitué de FLCN et FNIP1 ou FNIP2 <sup>431 432</sup>. Cette dissociation permet alors

l'activation de FLCN grâce à son activité GAP de favoriser l'hydrolyse du GTP de RagC/D en GDP <sup>433</sup> contribuant ainsi à l'ancrage de mTORC1 à la surface lysosomale <sup>433</sup> (Figure 30).

L'activité GEF de Ragulator est rendue possible grâce à la v-ATPase qui, en présence d'acides aminés induit un changement de conformation de Ragulator qui permet son activité GEF <sup>434</sup> <sup>435</sup>. Cela permet alors l'ancrage de mTORC1 aux Rags à la surface lysosomale et son activation par Rheb.

Alors que Ragulator permet de maintenir le GTP sur RagA, un autres complexe, GATOR1, inhibe le recrutement de mTORC1 aux Rags, grâce à son activité GAP, en augmentant l'activité GTPasique de RagA/B <sup>436</sup>.

L'inhibition de mTORC1 par GATOR1 peut être levée grâce à d'autres complexes qui vont inhiber GATOR1. Ainsi, GATOR2 peut interagir physiquement avec GATOR1 et inhibe son activité <sup>437</sup>. GATOR2 est lui-même régulé par différentes protéines dont les protéines CASTOR 1 et 2. Les protéines CASTOR 1 et CASTOR2 forment un complexe hétérodimérique qui inhibe le complexe GATOR2, inhibant ainsi l'ancrage de mTORC1 à la membrane lysosomale. Lorsque l'arginine est présente en concentration suffisante dans le cytosol, CASTOR1 la fixe, ce qui provoque sa dissociation de CASTOR2 et lève l'inhibition de GATOR2 et donc de mTORC1 <sup>438</sup>. La sestrin 2 qui est un senseur de leucine inhibe également GATOR2 en se fixant à celui-ci lors d'une carence en leucine (Figure 30). La surexpression de sestrin 2 suffit à inhiber l'activation de la voie mTOR. Cependant, quand la leucine est abondante dans le cytosol, la leucine se fixe à la sestrin 2 ce qui inhibe sa fixation à GATOR2 et lève l'inhibition de mTORC1 <sup>439</sup> <sup>440</sup>.

Il existe également un senseur cytoplasmique de SAM (S-adénosylméthionine), qui est un métabolite secondaire de la méthionine, appelé SAMTOR (S-adenosylmethionine sensor upstream of mTORC1). La synthèse de SAM est réduite lors d'une carence en méthionine <sup>441</sup> <sup>442</sup>. Ainsi, une carence en méthionine peut être perçue par SAMTOR par les concentrations cytoplasmiques de SAM et réduire la localisation de mTORC1 à la surface lysosomale <sup>443</sup>. Lors de la carence en méthionine SAMTOR est fixé à GATOR1, ce qui réduit l'interaction entre ce dernier et GATOR2. Cela a pour effet de lever l'inhibition de GATOR2 sur GATOR1 et maintenir l'inhibition de GATOR1 sur l'ancrage de mTORC1 à la membrane lysosomale (Figure 30). Lorsque les concentrations en méthionine dans le cytosol sont suffisantes, la méthionine adénosyltransférase synthétise du SAM à partir de la méthionine. Le SAM produit se fixe alors sur SAMTOR qui favorise l'interaction entre GATOR2 et GATOR1, entraînant l'inhibition de ce dernier et le recrutement de mTORC1 à la membrane lysosomale.

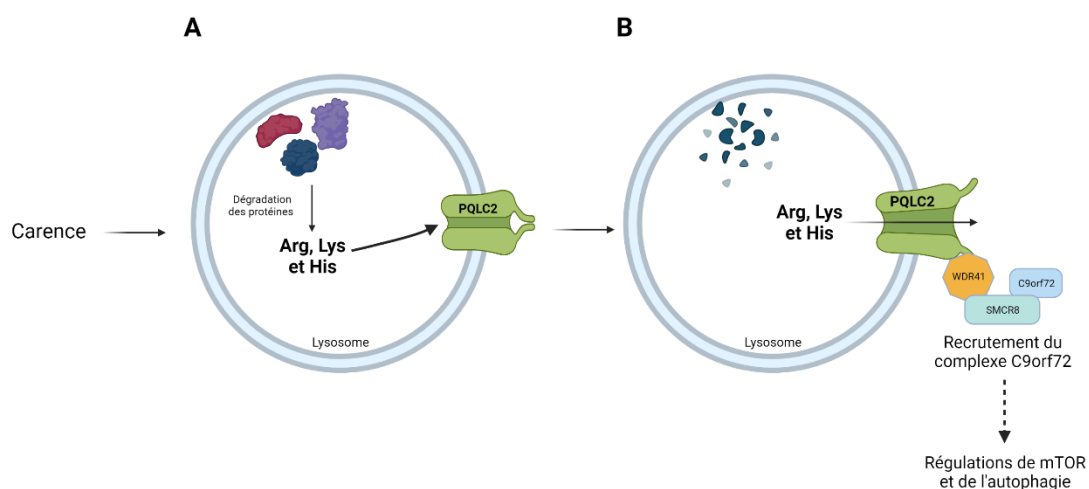
#### *Activation de la voie mTOR par les transporteurs d'acides aminés*

Certains transporteurs d'acides aminés contribuent également à l'activation de la voie mTOR soit en augmentant les concentrations intracellulaires en acides aminés activateurs de mTOR soit en régulant les concentrations en acides aminés lysosomales.

SLC38A9 que nous avons évoqué dans la partie 2 de ce manuscrit, est un transporteur d'acides aminés de la membrane lysosomale faisant partie de la famille des SNATs. L'arginine intra-

lysosomale favorise l'interaction de SLC38A9 avec Ragulator qui induit l'activation de mTORC1 (Figure 30). La lysine a également un effet sur la liaison entre SLC38A9 et Ragulator mais dans une moindre mesure comparée à l'arginine. Ainsi, la carence en lysine a peu d'effet sur l'activité de mTORC1 <sup>207</sup>. L'interaction entre SLC38A9 et Ragulator permet à ce dernier de favoriser l'échange de GDP de RagA/B contre du GTP et ainsi contribuer à l'activation des Rags permettant l'ancrage de mTORC1 à la surface lysosomale <sup>444</sup>.

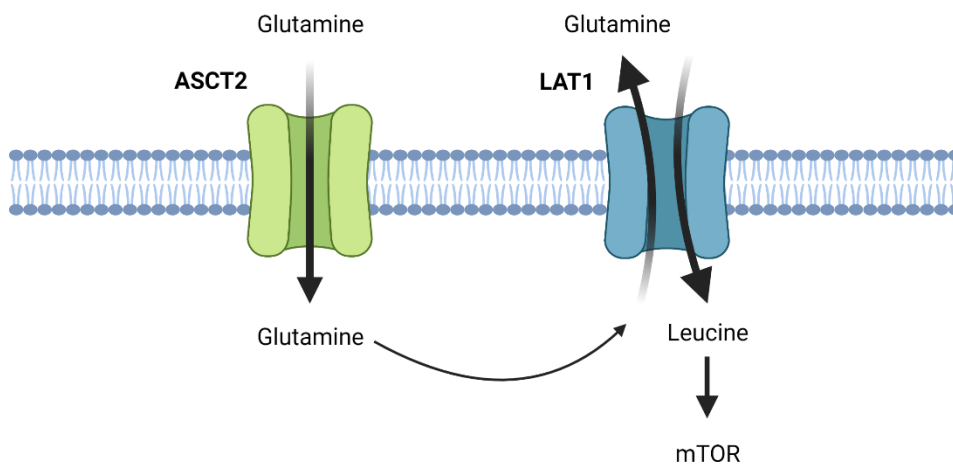
Des transporteurs d'acides aminés exprimés à la membrane plasmique tels que LAT1 peuvent être redirigés vers la membrane lysosomale afin de contribuer au recrutement et à l'activation de mTORC1 au niveau des lysosomes. LAT1 est relocalisé à la membrane lysosomale en se liant à une protéine membranaire des lysosomes, LAPT4b (Lysosomal-associated transmembrane protein 4B) dans le RE. Une fois présent dans la membrane lysosomale, LAT1 permettrait l'absorption de leucine par les lysosomes dont l'efflux par la v-ATPase et SLC38A9 induit le changement de conformation de Ragulator qui permet le recrutement de mTORC1 à la membrane lysosomale. Cependant, une étude récente a démontré que LAT1 pouvait être localisée à la membrane lysosomale par une autre protéine membranaire des lysosomes, DRAM-1 (DNA damage-regulated autophagy modulator protein 1). La relocalisation de LAT1 aux lysosomes par DRAM-1 induit l'efflux (et non l'influx) d'acides aminés de la lumière lysosomale vers le cytoplasme et est nécessaire à l'activation de mTOR à la manière de SLC38A9 <sup>445</sup>. De plus, le TAAC lysosomal PQLC2 dont les fonctions restent encore floues, pourrait également jouer un rôle dans l'activation de mTOR. En effet, l'efflux lysosomal d'arginine *via* ce TAAC induirait un changement de conformation qui permettrait le recrutement du complexe C9orf72 (Chromosome 9 open reading frame 72), constitué de C9orf72, WRD41 et SMCR8, à la surface lysosomale pendant les périodes de carences en acides aminés cationiques. Le rôle de ce complexe est encore indéterminé à ce jour mais il est suggéré qu'il pourrait jouer un rôle dans les fonctions lysosomales liées à l'activation de mTOR par les acides aminés <sup>446</sup> (Figure 31).



**Figure 31. Potentiel rôle de PQLC2 dans la régulation de mTOR**

Les transporteurs d'acides aminés de la membrane plasmique jouent également un rôle dans l'activation de mTOR en régulant les concentrations cytosoliques en acides aminés.

Il a notamment été démontré par Nicklin et ses collaborateurs que LAT1 jouait un rôle important sur l'activation de la voie mTOR en permettant l'absorption de leucine au niveau de la membrane plasmique. Ils ont en effet montré que l'activation de mTOR par l'échangeur LAT1 nécessite la mise en place d'un cycle « futile » de glutamine dont l'import, médié par ASCT2, favorise notamment l'absorption massive de leucine par LAT1 (Figure 32).



**Figure 32. Effet de l'échange de glutamine et leucine par ASCT2 et LAT1 sur l'activation de la voie mTOR**

Dans cette étude le traitement en acides aminés essentiels (AAE) seuls ne permet pas l'activation maximale de mTOR et nécessite l'ajout de glutamine. Ils montrent également que le pré-chargement des cellules en glutamine suivi d'un traitement avec les AAE permet une activation de mTOR plus importante et rapide comparé à un traitement combinant les EAA et la glutamine, démontrant que le pré-chargement en glutamine améliore l'activation de mTOR par les EAA. Ils ont également montré, par le biais d'inhibiteurs et d'ARN interférents dirigés contre les ARNm d'ASCT2 et de LAT1, que l'influx de glutamine est corrélé avec l'influx de leucine de façon dépendante de ces deux transporteurs <sup>447</sup> (Figure 32). Ainsi, Nicklin et ses collaborateurs ont démontré qu'ASCT2 permet l'accumulation de glutamine dans le cytosol et que par la suite, le transporteur LAT1 se sert du gradient de concentration transmembranaire de la glutamine induit par ASCT2 comme force motrice. Certains TAACs tels que les  $\gamma$ -LATs induisant l'influx AAC également par échange avec la glutamine <sup>448</sup>, il est possible que le pré-chargement en glutamine augmente l'absorption d'AAC contribuant ainsi à l'activation de mTOR.

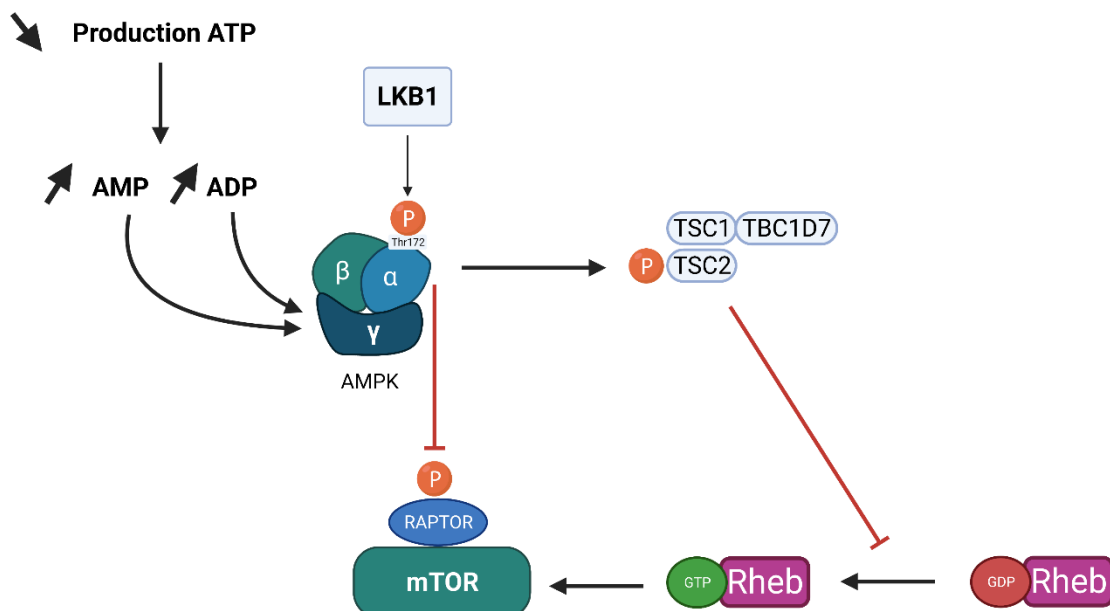
Bien que l'arginine soit un activateur connu de la voie mTOR, peu d'études montrent le rôle des transporteurs d'acides aminés cationiques dans l'activation de cette voie. Cependant, une

étude sur des neurones issus de cultures primaires de cerveaux de rats, a montré que la suppression de CAT1 et CAT3 par ARN interférence réduit l'activation de la voie mTOR, impactant la croissance des neurones. De plus, la délétion de *slimfast*, un homologue des CATs chez la drosophile, induit une croissance moins importante que chez les animaux contrôles en réduisant l'activation de la voie TOR <sup>449</sup>.

Il a également été démontré que le transporteur ATB<sup>0,+</sup> joue un rôle dans l'activation de la voie mTOR. Son inhibition pharmaceutique avec l' $\alpha$ -méthyltryptophane induit une carence en acides aminés réduisant l'activation de mTOR <sup>192</sup>, tout comme sa délétion qui réduit l'absorption d'arginine <sup>226 450 451</sup>. Cependant, ATB<sup>0,+</sup> transportant à la fois l'arginine mais également la leucine et la glutamine, deux autres acides aminés activateurs de mTOR, l'effet de son inhibition sur l'activation de mTOR pourrait être lié également à une carence en leucine et glutamine.

### Régulations par le niveau énergétique

La voie mTOR permettant l'adaptation des processus anaboliques en accord avec la disponibilité des nutriments mais également du niveau énergétique des cellules, mTOR doit être capable de ressentir le niveau énergétique de la cellule. Cette régulation est principalement effectuée par l'AMPK (AMP-activated Protein Kinase), une sérine/thréonine kinase, qui est considérée comme un senseur majeur d'énergie dans les cellules étant activée lorsque le ratio ATP/ADP diminue. L'AMPK est un complexe comprenant une sous-unité catalytique  $\alpha$  et deux sous-unités régulatrices  $\beta$  et  $\gamma$ . Lors d'une diminution du niveau d'énergie de la cellule, l'AMP et l'ADP se lie à la sous-unité  $\gamma$ . Cette liaison induit alors un changement de conformation qui bloque la déphosphorylation du résidu Thr172 de l'AMPK qui est phosphorylé par LKB1 (Liver kinase B1) afin de la maintenir active (Figure 33).



**Figure 33. Régulation de mTORC1 par le niveau énergétique**

L'AMPK est activée par phosphorylation par LKB1. La diminution de la production d'ATP induit une augmentation du ratio ADP/ATP. L'AMP et l'ADP se lient alors à la sous-unité  $\gamma$  induisant un changement de conformation de l'AMPK qui empêche sa déphosphorylation et maintient son activation. Une fois activée l'AMPK phosphoryle RAPTOR et TSC2 conduisant à l'inhibition de mTORC1.

Lorsque l'AMPK est activée par la diminution du ratio ADP/ATP, elle phosphoryle TSC2 du complexe TSC, ce qui stimule l'activité GAP de ce dernier <sup>452</sup>. Le complexe TSC hydrolyse alors le GTP lié à Rheb en GDP, inhibant ainsi l'activation de mTORC1 <sup>453</sup>. L'AMPK peut également inhiber l'activation de mTORC1 en phosphorylant directement RAPTOR <sup>454</sup> (Figure 33).

## d. Régulations de mTOR chez la truite

### *Activation de mTOR chez la truite*

C'est en 2008, au laboratoire, qu'a été étudié pour la première fois la signalisation de la voie mTOR chez une espèce de poisson, la truite arc-en-ciel<sup>455</sup>. Ils ont étudié au niveau protéique les phosphorylations de la protéine Akt en amont de l'activation du complexe mTORC1 ainsi que de ses cibles directes 4EBP1 et S6K1 dans le muscle de truites. Après un jeûne de 60h, qui correspond au temps nécessaire à l'intestin pour se vider après un repas, les truites ont été nourries *ad libitum*, avant échantillonnage du plasma et du muscle de 30 min à 24 h. L'analyse de l'insulinémie montre qu'elle augmente drastiquement dès 30 minutes après le dernier repas. L'aminoacidémie quant à elle, n'augmente significativement qu'après 3 h. Les analyses western blots montrent également que les sites de phosphorylation d'Akt (Ser473), de 4EBP1 (Thr37/46) et S6K1 (Thr389), conservés chez la truite, sont phosphorylés après la prise alimentaire, démontrant que mTORC1 est activé après la prise alimentaire. Les cinétiques ont permis de mettre en évidence des différences dans la phosphorylation d'Akt comparé à celles de S6K1 et 4EBP1. En effet, la phosphorylation d'Akt est plus précoce et correspond avec la hausse de l'insulinémie alors que les phosphorylations de S6K1 et 4EBP1 correspondent plus avec l'augmentation des acides aminés plasmatiques. Cela correspond avec ce qui est connu chez les mammifères, l'insuline activant l'axe Akt/mTORC1 et les acides aminés induisant la localisation de mTORC1 à la membrane lysosomale.

Différentes études *in vitro*, utilisant des cultures de cellules primaires, ont aidé à comprendre l'activation de la voie mTOR par les acides aminés. Ainsi, dans l'étude mentionnée précédemment, des cultures primaires de myotubes ont également été conduites afin de déterminer l'effet de l'insuline et des acides aminés sur l'activation de la voie mTOR. Cette étude montre qu'un traitement à l'insuline seule induit la phosphorylation d'Akt et 4EBP1 et une faible phosphorylation de S6K1. L'ajout d'acides aminés avec l'insuline induit une phosphorylation plus importante de 4EBP1 et surtout de S6K1 comparé au traitement à l'insuline seule. Ces résultats ont permis de montrer que l'insuline et les acides aminés agissent également de concert dans l'activation de la voie mTOR chez la truite.

Par la suite, d'autres études *in vitro* ont corroboré ces résultats obtenus dans les cultures primaires de myotubes<sup>456</sup>. Lansard et ses collaborateurs ont conduit des études *in vitro* d'hépatocytes primaires. Une première étude a montré que le traitement des hépatocytes (après carence) avec de l'insuline sans acides aminés induit la phosphorylation d'Akt mais pas de S6K1 et sa cible S6 alors que le traitement avec les acides aminés seuls n'induit la phosphorylation d'aucune de ces protéines. Bien que les acides aminés seuls ne permettent pas l'activation de la voie mTOR, l'ajout de l'insuline aux acides aminés permet la phosphorylation d'Akt, S6K1 et S6<sup>457</sup> confirmant les résultats obtenus dans les cultures primaires de myotubes<sup>455</sup>.

Une étude ultérieure, toujours dans des hépatocytes primaires, a ensuite permis de discriminer le rôle de trois acides aminés essentiels, la leucine, la méthionine et la lysine, sur l'activation de mTOR chez la truite. Cette étude confirme les résultats précédents en montrant que les traitements individuels en leucine, méthionine et lysine seules n'induisent pas la phosphorylation d'Akt et de S6 alors que l'ajout d'insuline à ces mêmes traitements induit la phosphorylation d'Akt. L'ajout de l'insuline au traitement en leucine seule induit également une phosphorylation significative de S6 contrairement à la méthionine et la lysine. Ceci démontre que la leucine jouerait un rôle plus important dans l'activation de la voie mTOR contrairement à la méthionine et la lysine <sup>458</sup>. Alors que l'absence d'effet de la lysine sur la voie mTOR est également observée chez les mammifères, ce n'est pas le cas pour la méthionine qui est un activateur indirect de mTOR via son métabolite SAM chez les mammifères. La leucine pourrait avoir un rôle plus important que la méthionine dans l'activation de mTORC1 et l'ajout seul de méthionine pourrait ne pas être suffisant à l'activation de mTOR contrairement à celui de la leucine. Cela est supporté par des observations *in vivo* montrant qu'une déficience en méthionine dans les aliments de truites n'induits également pas de différences de phosphorylation de S6K1 et 4EBP1 <sup>376 365 361</sup>. Pour l'arginine qui est également un activateur de mTORC1, aucune donnée n'est disponible, à notre connaissance, chez une espèce de poisson.

La voie mTOR a également été étudiée chez d'autres espèces de poissons telles que le poisson zèbre <sup>459</sup> et d'autres d'intérêt agronomique telles que le tilapia du Nil <sup>460</sup> la dorade royale (*Sparus auratus*) <sup>461</sup>, la carpe (*Cyprinus carpio*) <sup>462 463</sup> et la plie fine (*Paralichthys adspersus*) <sup>464</sup>. Cependant, les études de mTOR chez ces poissons observent seulement la phosphorylation d'Akt et mTOR, qui sont reconnus comme de moins bons indicateurs de l'activation de la voie mTOR que la phosphorylation de ses substrats directs ou indirects tels que 4EBP1, S6K1 et S6.

#### *Dérégulations de la voie mTOR par les aliments végétaux*

L'altération du ratio protéine/glucide impacte la régulation de la voie mTOR chez la truite. En effet la diminution du ratio protéines/glucides de l'aliment induit une diminution de la phosphorylation des cibles de mTORC1, S6K1, S6 et 4EBP1 dans le foie et le muscle de truite <sup>27</sup>. Les aliments à base de végétaux présentant de hautes teneurs en glucides, diminuant le ratio protéine/glucide, on peut s'attendre à ce que l'utilisation d'aliments végétaux diminue l'activité de la voie mTOR chez les poissons comparé aux animaux nourris avec des régimes contenant des farines de poissons. Néanmoins, alors que le remplacement de farines de poisson par des composants végétaux à hauteur de 80% réduit la taille des truites, cela n'affecte pas la phosphorylation de S6K1, S6 et 4EBP1 dans le foie <sup>465</sup>. L'injection intrapéritonéale de rapamycine chez la truite, inhibe la phosphorylation de S6K1, S6 et 4EBP1. L'injection de rapamycine réduit également l'expression de SREBP1 et de ces cibles FAS et de GK démontrant que mTORC1 régule l'expression de gènes de la synthèse lipidique comme ce qui est connu chez les mammifères <sup>466 467</sup>. De plus, il a également été montré que la phosphorylation des cibles de mTORC1 est plus fortement induite après un repas chez des



truites sélectionnées pour accumuler des lipides dans le muscle <sup>468</sup>, démontrant que la voie mTOR est, tout comme chez les mammifères, impliquée dans la synthèse lipidique.

## C- La macro-autophagie

L'autophagie est un processus cellulaire de dégradation d'éléments cytoplasmiques tels que des protéines, des organelles et même des pathogènes. Il existe différents types d'autophagie qui diffèrent dans les mécanismes de séquestration des matériels devant être dégradés et par les processus qui permettent leur adressage jusqu'au lysosome où ils seront recyclés. On distingue alors 3 formes majeures d'autophagie : la micro-autophagie, l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (plus communément appelée CMA pour Chaperone-Mediated Autophagy) et la macro-autophagie qui est la forme d'autophagie la plus étudiée <sup>469</sup>. Dans la suite de ce manuscrit, nous aborderons seulement la macro-autophagie que nous nommerons autophagie.

### *Découverte de la macro-autophagie*

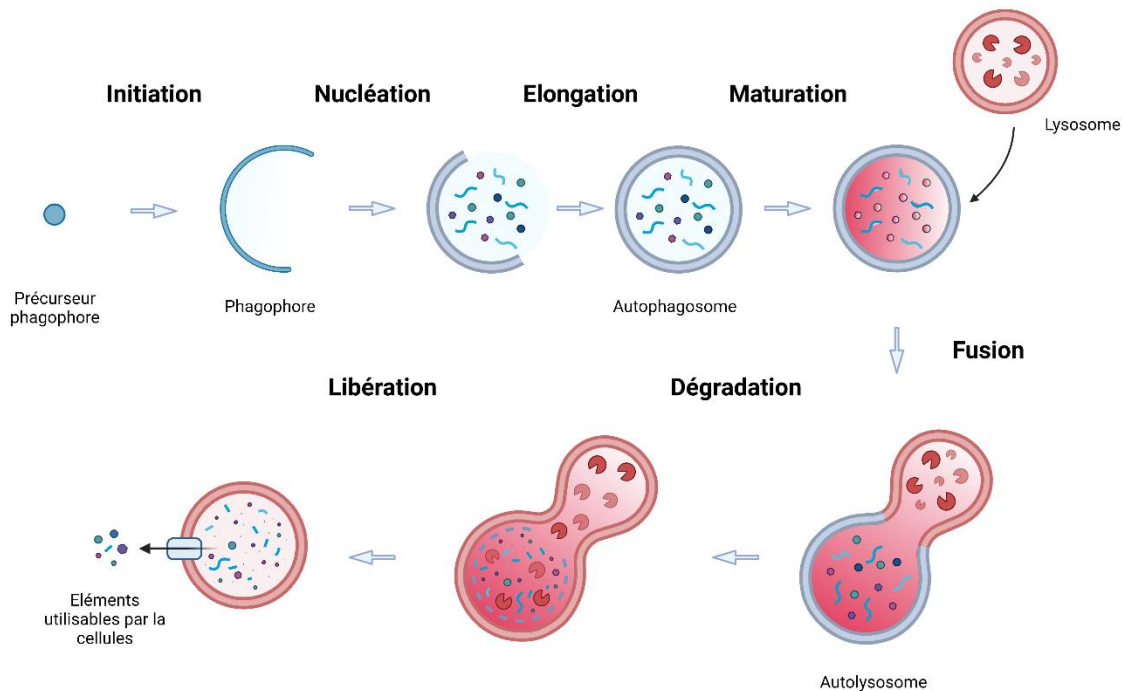
La première observation de l'autophagie a été réalisée en 1962. Il a été observé par microscopie électronique à transmission des structures sphériques séquestrant des portions de cytosol et des organelles dont le nombre augmente dans des cellules hépatiques provenant de foies de rats perfusés avec du glucagon <sup>470</sup>.

L'année suivante le terme autophagie a été utilisé pour désigner la dégradation de matériel cellulaire par les lysosomes, sans connaître toutefois les mécanismes de séquestration des éléments à dégrader <sup>471</sup>. Ce n'est que quelques années plus tard qu'il a été compris que le matériel voué à être dégradé par les lysosomes atteint la lumière lysosomale grâce aux vésicules autophagiques qui fusionnent avec les lysosomes <sup>472</sup>. Les étapes de formation de la membrane séquestrant les éléments cytoplasmiques à dégrader ont par la suite été définis.

C'est à partir des années 1990 que les gènes régulant l'autophagie nommés ATG (pour autophagy related) ont commencé à être identifiés chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) par Yoshinori Ohsumi <sup>473</sup> qui a été récompensé du prix Nobel de médecine en 2016 pour ses travaux sur l'autophagie. L'identification des protéines jouant un rôle primordial dans le processus autophagique a été réalisée par l'analyse de la survie de levures mutantes en condition de carence azotée <sup>474</sup>. Depuis, une trentaine de gènes de l'autophagie ont été identifiés. Par la suite, les gènes orthologues des ATG de la levure ont pu être identifiés chez les mammifères <sup>475</sup>.

### a. Mécanismes de la macro-autophagie

La macro-autophagie se distingue des autres formes d'autophagie par la formation d'une double-membrane nommée phagophore. Cette membrane s'allonge et se referme sur le matériel cytoplasmique à dégrader pour former une vésicule appelée autophagosome. Ce dernier va par la suite fusionner avec les lysosomes pour former les autolysosomes. Le contenu des autolysosomes est ensuite dégradé par les hydrolases lysosomales. Ce processus est communément divisé en 5 étapes : l'initiation, la nucléation, l'élongation, la maturation et la fusion (Figure 34).



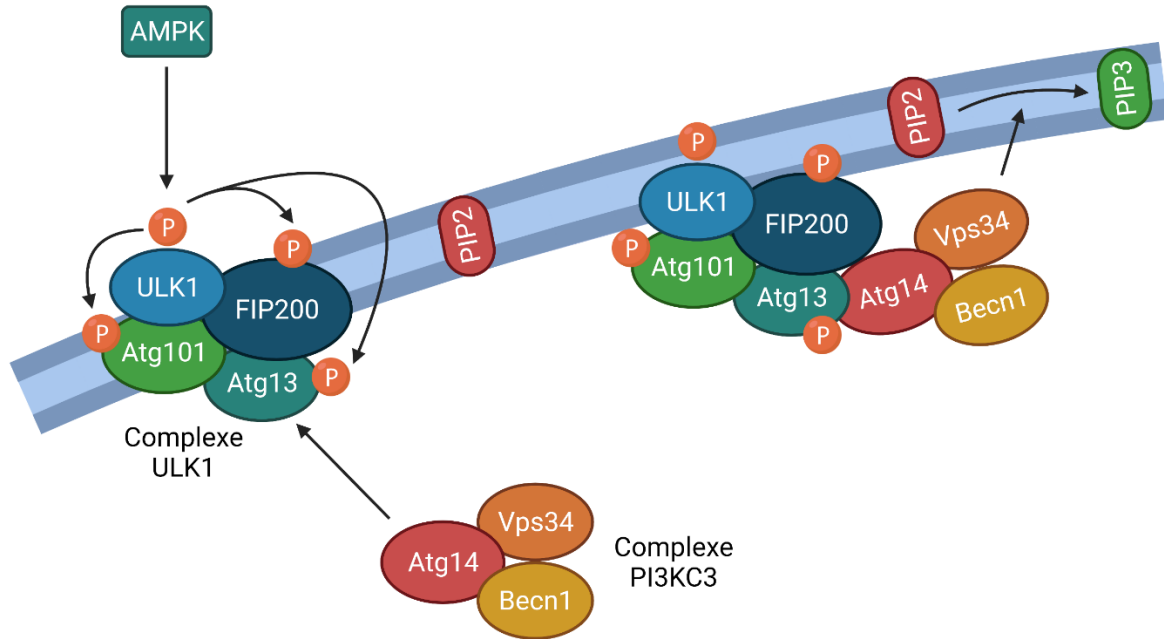
**Figure 34 Les différentes étapes de la macro-autophagie**

Le processus autophagique consiste en la formation d'une double membrane appelée phagophore autour des éléments cytoplasmiques à dégrader. Le phagophore fusionne ensuite avec les lysosomes permettant la dégradation des éléments cibles par les hydrolases lysosomales avant leur efflux du lysosome vers le cytosol où ils pourront être utilisés par la cellule.

### Initiation et nucléation

L'initiation est la première étape du processus autophagique et est opérée par le complexe ULK1 qui est constitutivement formé de la sérine/thréonine kinase ULK1 (UNC-51-like Ser/Thr kinase), Atg13, Atg101 et FIP200 (Focal adhesion kinase family Interacting Protein of 200 kDa). Lors de l'activation de l'autophagie par un stimulus tel que la carence, ULK1 est phosphorylée et activée par l'AMPK. ULK1 phosphoryle alors les autres protéines du complexe menant à son activation, permettant le recrutement d'autres protéines permettant la phase suivante dite de nucléation<sup>476</sup> (Figure 34).

Le complexe ULK1 actif induit le recrutement du complexe PI3KC3 (Phosphoinositide-3-Kinase Complex 3). Ce dernier est composé de Beclin-1, Atg14, Vps15 (Vacuolar protein sorting 15) et Vps34<sup>477 478</sup>. Le recrutement de PI3KC3 par le complexe ULK1 s'effectue par la liaison entre ATG13 et ATG14<sup>479</sup>. Le complexe PI3KC3 *via* Vps34 catalyse la conversion de phosphatidylinositol en phosphatidylinositol-3-phosphate (PIP3)<sup>480</sup> (Figure 35) permettant la formation de l'omégasome qui sert de site de fixation pour les protéines qui induisent la formation du phagophore telle que WIPI2 (WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2).

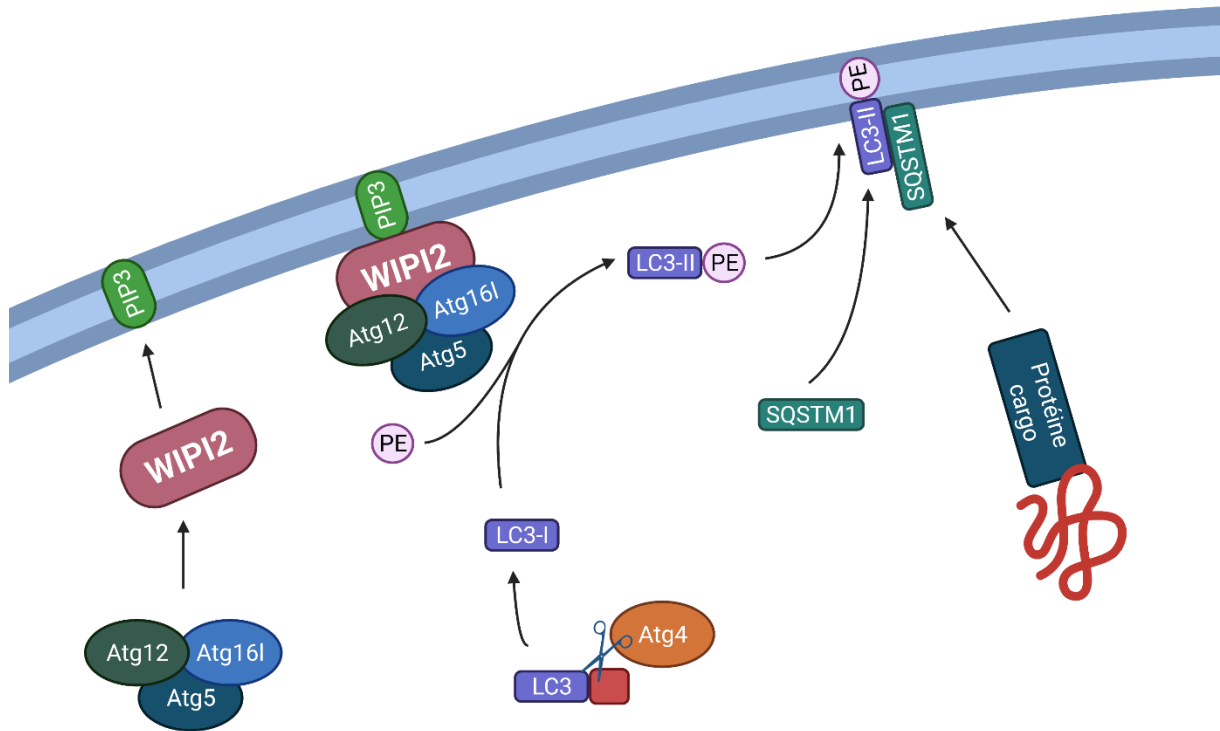


**Figure 35. Phases d'initiation et de nucléation du phagophore**

L'AMPK active phosphoryle les différentes protéines formant le complexe ULK1, ce qui induit son activation. Cela permet le recrutement du complexe PI3KC3 qui phosphoryle PIP2 en PIP3. PIP3 permet ensuite le recrutement des protéines nécessaires à la phase d'élongation au niveau de la membrane du phagophore.

#### Elongation du phagophore

WIPI2 permet le recrutement du complexe Atg5-Atg12-Atg16I qui possède une activité ubiquitine ligase et permet ainsi la lipidation de LC3-I (Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B) par conjugaison avec le phosphatidyléthanolamine (PE) pour former LC3-II qui peut intégrer le phagophore <sup>481</sup> (Figure 36).



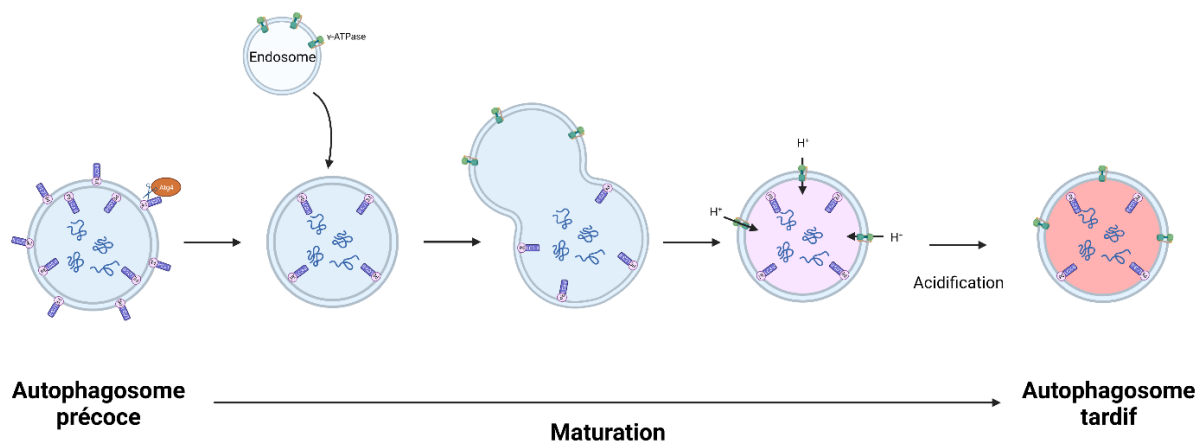
**Figure 36. Mécanismes d'élongation du phagophore**

WIPI2 est recruté à la membrane du phagophore au niveau de PIP3 et recrute lui-même le complexe Atg5-Atg12-Atg16l. Ce complexe induit la lipidation de la protéine LC3-I (provenant du clivage de pro-LC3 par Atg4) pour former LC3-II. LC3-II intègre la membrane du phagophore et permet le recrutement de SQSTM1 qui sert de récepteur aux protéines cargo qui relocalisent les éléments à dégrader vers le phagophore.

Cependant, préalablement à la liaison du PE à LC3-I, LC3 doit être clivée au niveau de son extrémité C-terminale, formant LC3-I, par Atg4. Le clivage de l'extrémité C-terminale de LC3 rend accessible un résidu glycine qui est essentiel à la liaison du PE pour former LC3-II<sup>482</sup>. Sequestosome 1 (SQSTM1), une protéine également connue sous le nom de p62 intègre également la membrane du phagophore lors de la phase élongation en se liant à LC3-II<sup>483</sup>. SQSTM1 sert de récepteur aux protéines cargo et permet la relocalisation des éléments à dégrader vers le phagophore<sup>484 485</sup> (Figure 36). Finalement, le phagophore, ou membrane d'isolation, s'allonge jusqu'à former une structure vésiculaire fermée à double membrane appelée autophagosome.

#### Maturation des autophagosomes

Les autophagosomes nouvellement formés ne peuvent fusionner directement avec les lysosomes et doivent subir au préalable des étapes de maturation. Bien que le rôle des homologues mammifères d'ATG4 dans la maturation des autophagosomes reste à élucider, il est supposé qu'ils ont des rôles similaires à ATG4 chez la levure chez qui elle permet le recyclage d'ATG8 (l'homologue de LC3 chez le mammifère) en hydrolysant la liaison entre ATG8 et le PE<sup>486</sup> (Figure 37).



**Figure 37. Maturation des autophagosomes**

*Atg4 clive les protéines LC3-II de la membrane extérieure du phagophore, ce qui permettrait ensuite la fusion avec les endosomes. La fusion avec les endosomes apporte des v-ATPases qui en pompant des protons entraînent l'acidification de l'autophagosome permettant la maturation de l'autophagosome tardif.*

La délétion d'Atg4 empêche fortement la fusion entre autophagosomes et la vacuole, l'équivalent des lysosomes chez la levure <sup>487 488 489</sup>. Bien que le rôle des homologues mammifères d'Atg4 (ATG4b et ATG4d) reste flou, leur mutation semble empêcher la fusion entre autophagosome et lysosome <sup>490</sup>.

L'acidification des autophagosomes précoces est réalisée par leur fusion avec les endosomes formant des autophagosomes tardifs aussi appelés amphisomes <sup>491</sup>. Cette fusion permet le recrutement de pompes à protons v-ATPase <sup>492</sup> qui acidifient l'intérieur des autophagosomes <sup>493</sup> (Tanaka et al., 2000) (Figure 37). Cette acidification permet le bon fonctionnement des hydrolases lysosomales qui dégradent les contenus des autophagosomes après leur fusion avec les lysosomes.

### *Fusion des autophagosomes et lysosomes*

Les autophagosomes tardifs fusionnent ensuite avec les lysosomes pour former les autolysosomes. La fusion des membranes biologiques est contrôlée par différentes protéines dont des membres de la famille des petites GTPases Rab (Ras-Associated Binding) <sup>494</sup> et Arf (ADP-Ribosylation Factor) <sup>495</sup> ainsi que les protéines SNARE (Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptor) <sup>496</sup>.

Parmi les protéines Rab, Rab7 jouent un rôle majeur dans la fusion des lysosomes et des autophagosomes <sup>497 498</sup>. En condition basale, Rab7 est liée à un GDP et cytoplasmique. Lors de la carence, le complexe Mon1-Ccz1 ((Monensin sensitivity protein 1—Caffeine, calcium, and zinc 1) possédant une activité GEF, favorise l'échange du GDP contre du GTP ce qui induit l'ancrage de Rab7 à la membrane de l'autophagosome <sup>499</sup>. L'ancrage de Rab7 permet alors le recrutement d'autres protéines dont des protéines motrices qui induisent le déplacement des

autophagosomes sur les microtubules jusqu'aux lysosomes périnucléaires<sup>500 501</sup> et induisent leurs fusions grâce au complexe HOPS par interaction avec Rab7<sup>502</sup>. La fusion forme alors les autolysosomes dont les hydrolases lysosomales peuvent finalement digérer les éléments séquestrés par les autophagosomes et la membrane interne de l'autophagosome.

### *Mesure du flux autophagique*

Il est possible de suivre l'induction de la macro-autophagie grâce aux niveaux protéiques de LC3-I et LC3-II. En effet, lors de l'élongation du phagophore, la lipidation de LC3-I en LC3-II va augmenter les niveaux protéiques de cette dernière. Ainsi, plus les niveaux protéiques de LC3-II sont élevés, plus l'activité autophagique est importante. Toutefois, comme nous l'avons vu précédemment, lors du processus autophagique, une partie des protéines LC3-II est recyclée en LC3-I et l'autre dégradée par les hydrolases lysosomales suite à la fusion entre lysosomes et autophagosomes. Afin de suivre l'accumulation de LC3-II due à l'induction de l'autophagie, il est donc nécessaire d'inhiber la dégradation de LC3-II. Cette dégradation peut être inhibée en utilisant des composés qui inhibent la fusion entre autophagosomes et lysosomes telle que la chloroquine (CQ)<sup>503</sup>. Ensuite la différence de niveaux protéiques de LC3-II entre des cellules traitées avec la CQ et non traitées obtenue par western blot permet de quantifier le flux autophagique reflétant l'induction de l'autophagie dans les cellules<sup>504</sup>.

## **b. Rôles physiologiques de l'autophagie**

### *Survie des cellules en condition de carence*

L'autophagie est induite lors de la carence et est utilisée par les cellules afin de maintenir un pool minimal d'acides aminés pour la survie. Il a été montré que l'autophagie est induite lors de la carence dans la plupart des tissus chez la souris<sup>505</sup>. Lors de la naissance de souriceaux, l'autophagie est induite pour adapter les nouveau-nés à l'arrêt de l'alimentation par le placenta<sup>506</sup>. Les souris ayant subi une délétion d'Atg5, qui est impliqué dans la formation de l'autophagosome, naissent « normalement » mais meurent après 12 h de carence contre 21 h pour les souris de types sauvages, démontrant ainsi le rôle indispensable de l'autophagie dans la survie des nouveaux nés lors de la carence<sup>506</sup>.

L'induction de l'autophagie pendant la carence permet le recyclage des protéines pour obtenir les acides aminés nécessaires à la synthèse des protéines impliqués dans la réponse au stress tels que ceux surexprimés par la voie GCN2. Ces acides aminés peuvent également être utilisés pour la production d'énergie en entrant dans le cycle de Krebs afin de maintenir un niveau énergétique minimale dans les cellules comme observé dans le muscle<sup>507</sup>.

## **c. Régulations de l'autophagie par les acides aminés**

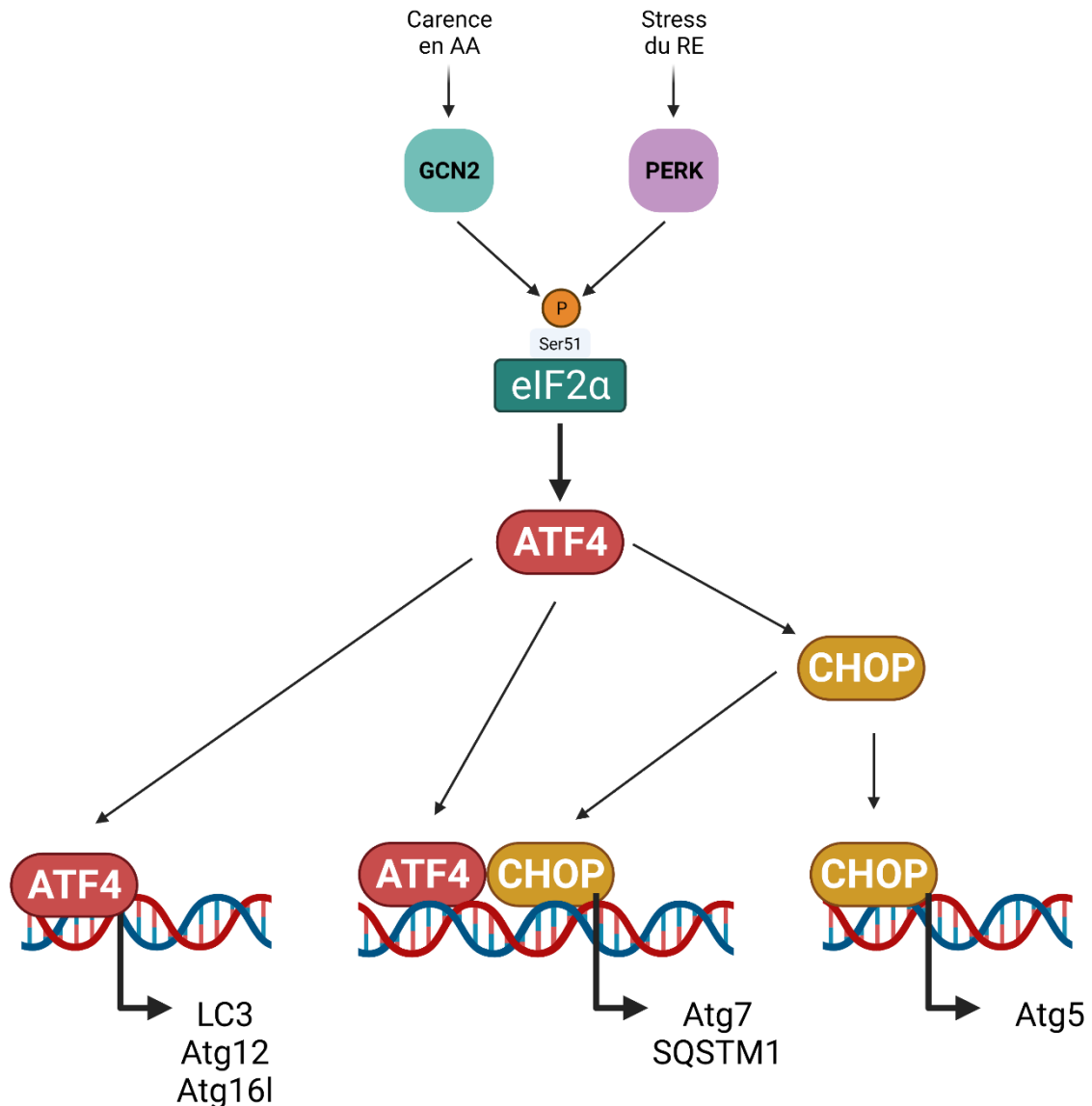
Il est aujourd'hui établi que la carence en acides aminés induit l'activation de l'autophagie chez les mammifères<sup>508 300 509 510</sup>. La régulation de l'autophagie par les acides aminés est en

partie réalisée au niveau transcriptionnel, notamment par la voie GCN2, mais aussi de façon post-traductionnelle, notamment par la voie mTOR.

### *Régulations par GCN2*

La carence en acides aminés ainsi que le stress du RE induisent l'activation de l'autophagie<sup>300</sup><sup>511</sup>. B'Chir et ses collaborateurs ont identifiés de nombreux gènes autophagiques dont la transcription est régulée par les voies GCN2 et PERK. Dans les cellules MEF, une carence en lysine, méthionine et leucine induit la surexpression de SQSTM1<sup>510</sup>. Ils ont également démontré que la transcription de SQSTM1 observée lors de la carence en leucine est dépendante de la voie GCN2. En effet, la délétion de GCN2 ou ATF4 dans les cellules MEF empêche la transcription de SQSTM1 lors d'une carence en leucine. En plus de SQSTM1, la transcription de Atg16l1, Atg12, LC3, Atg7 et Atg5 sont également dépendante de GCN2 et ATF4. De plus, le facteur de transcription CHOP a des effets différents sur la transcription de ces gènes. Bien que tous régulés par la voie GCN2/ATF4, ces gènes montrent des mécanismes de régulations transcriptionnelles différents notamment vis-à-vis de CHOP (Figure 38). En effet, la délétion de CHOP supprime la surexpression d'Atg5 et Atg7 mais pas des autres gènes précités. De plus, l'étude de la liaison de CHOP aux promoteurs de ces gènes a permis d'établir 3 groupes de gènes ayant des mécanismes de régulation différents. Ainsi l'augmentation de la transcription d'Atg16l1, LC3 et Atg12 est régulée par ATF4 seule et non par CHOP. La transcription de SQSTM1 et Atg7 est régulée par ATF4 et CHOP qui doivent probablement effectuer cette régulation en formant un hétérodimère alors que celle d'Atg5 dépend seulement de CHOP<sup>510</sup> (Figure 38). Bien que CHOP doit participer à la survie cellulaire sur le court terme en induisant la transcription de gènes autophagiques, sa surexpression sur le long terme réduit la viabilité des cellules<sup>512</sup>.

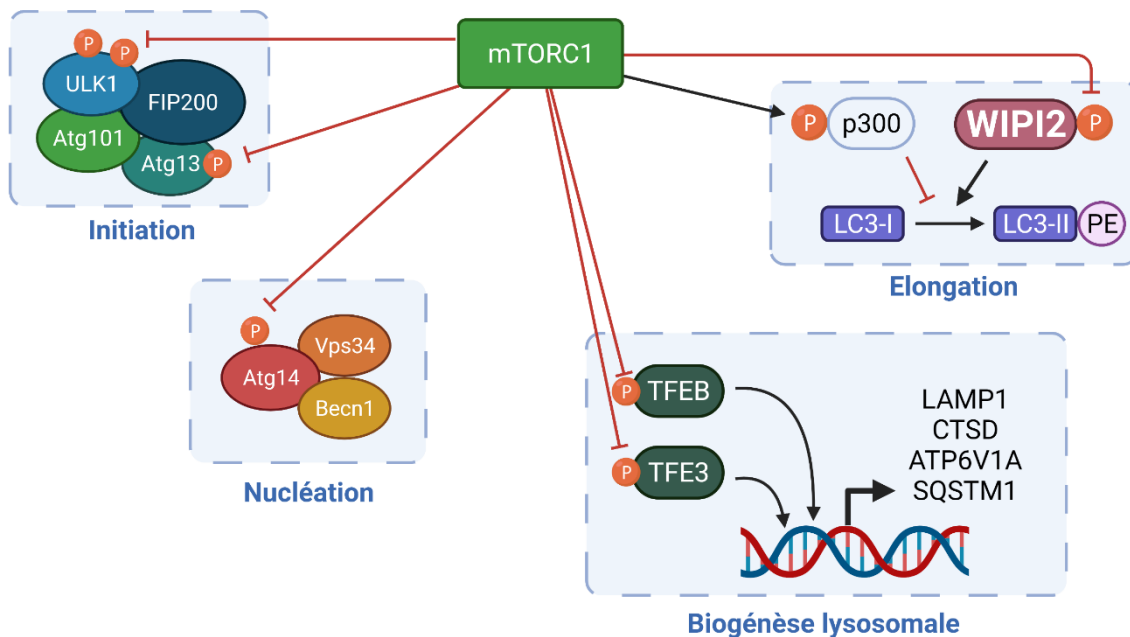




**Figure 38. Régulation de l'autophagie par GCN2 et PERK**

*Inhibition par la voie mTOR*

En conditions nutritives riches, l'activation de mTORC1 conduit également à phosphorylation de la protéine ULK1 au niveau de ses résidus Ser758 et Ser638 ainsi qu'Atg13 sur le résidu Ser258<sup>513 514 515</sup>. Ces phosphorylations empêchent par la suite l'activité kinase d'ULK1 requise pour l'initiation de l'autophagie<sup>516</sup> et le recrutement du complexe PI3KC3 pour l'étape de nucléation (Figure 39).



**Figure 39. Inhibition des différentes étapes de l'autophagie par mTORC1**

mTORC1 peut aussi réguler négativement l'étape de nucléation en phosphorylant directement certains composants du complexe PI3KC3 dont ATG14. Ainsi, mTORC1 phosphoryle ATG14 sur de multiples sites. Il a été montré par mutations de ces résidus que la phosphorylation d'ATG14 par mTORC1 est nécessaire à l'inhibition de l'activité kinase du complexe PI3KC3<sup>517</sup> (Figure 39).

mTORC1 inhibe également l'élongation des autophagosomes en phosphorylant WIPI2 et p300. WIPI2 facilite la lipidation de LC3-I pour former LC3-II qui est nécessaire à la formation de la double membrane des autophagosomes. mTORC1 contrôle les niveaux protéiques de WIPI2, en la phosphorylant sur son résidu Ser395 (Figure 39). En effet, cette phosphorylation par mTORC1 augmente l'interaction entre WIPI2 et HUWE1 qui promeut sa dégradation par le protéasome<sup>518</sup>. mTORC1 phosphoryle p300 au niveau de nombreux sites. La phosphorylation de p300 lève son auto-inhibition. Une fois activée, p300 acétyle LC3 empêchant sa lipidation (Figure 39).

De plus, mTORC1 inhibe également, par phosphorylation, la relocalisation des facteurs de transcription TFEB (Transcription factor EB) et TFE3 (Transcription Factor E3) dans le noyau. Ces deux facteurs de transcriptions induisent la transcription de gènes impliqués dans la biogénèse lysosomale, tels que LAMP1 (Lysosome-associated membrane glycoprotein 1), CTSD (cathepsine d) et ATP6V1A (V-type proton ATPase catalytic subunit A) et l'autophagie dont SQSTM1<sup>519</sup> (Figure 39).

#### d. La macro-autophagie chez la truite

L'autophagie chez la truite a été observée pour la première fois au début des années 90 dans des cultures primaires d'hépatocytes lors d'une étude de la sénescence des hépatocytes isolés de truite. Les auteurs ont ainsi observé, par microscopie électronique à transmission, une augmentation des autophagosomes au cours du temps de culture <sup>520</sup>. Par la suite, les mécanismes de régulation de l'autophagie ont été étudiés chez la truite par des expérimentations *in vivo* mais également *in vitro* avec des cultures primaires de cellules musculaires et hépatiques.

L'autophagie étant régulée par la carence en acides aminés et permettant aux organismes de s'adapter à cette carence en réduisant leur croissance, il est intéressant d'étudier les régulations de l'autophagie chez la truite qui présentent de hauts besoins alimentaires en AA afin de comprendre son possible rôle dans la diminution de la croissance observée chez les truites nourries avec des aliments végétaux qui contiennent peu d'AA.

Il a été démontré par une première étude menée en 2010 chez des truites non nourries pendant 14 jours, des niveaux d'ARNm des gènes autophagiques LC3, *atg12l* et *atg4b* supérieurs dans le muscle comparé à ceux de truites nourries. La culture primaire de cellules de muscles, quant à elle, a montré que ces gènes étaient surexprimés par l'absence de sérum et du facteur de croissance IGF-1 dans le milieu culture, correspondant à ce qui est connu chez les mammifères <sup>521</sup>. Les myoblastes de truites isolés surexpriment également LC3 et *atg4b* dans un milieu de culture dépourvu de sérum et d'acides aminés <sup>456</sup>. De plus, l'addition d'acides aminés au milieu de carence réduit la surexpression de ces gènes démontrant que la disponibilité en acides aminés régule l'expression de ces gènes <sup>456 522</sup>. L'utilisation de la rapamycine dans cette même étude a également permis de déterminer que la transcription d'*atg4b* est régulée par la voie mTOR contrairement à LC3. Cette étude montre également que la carence en acides aminés et facteurs de croissance induit une augmentation du flux autophagique comme ce qui a été observé chez le poisson zèbre <sup>523</sup> L'alimentation de truites avec un aliment déficient en méthionine induit également une accumulation de LC3-II dans le foie bien que l'activation de la voie mTOR ne semble pas réduite <sup>361</sup>. Toutefois, ces résultats ont été obtenus sans utiliser de chloroquine qui inhibe la dégradation de LC3-II par la fusion entre lysosomes et autophagosomes nécessaire pour observer l'induction du flux autophagique comme nous l'avons vu précédemment. L'augmentation de LC3-II dans cette étude ne reflète donc potentiellement pas une induction de l'autophagie chez ces poissons.

## Hypothèses et objectifs de la thèse

Mon travail de thèse s'inscrit dans l'effort de recherche conduit pour permettre le remplacement des farines de poisson dans les aliments aquacoles par des matières premières végétales. Comme nous l'avons vu précédemment, les matières premières végétales sont souvent déficientes en certains acides aminés essentiels dont principalement la méthionine et les deux acides aminés cationiques : lysine et arginine. Bien que les acides aminés soient à la base de l'alimentation des poissons, et d'autant plus des espèces carnivores telles que la truite arc-en-ciel, les mécanismes de leur absorption intestinale et d'échange entre les différents tissus sont aujourd'hui peu connus. Comprendre les mécanismes d'absorption des acides aminés chez la truite est aujourd'hui primordial afin éventuellement d'adapter les formulations des aliments aquacoles pour assurer une meilleure absorption des acides aminés selon la nature des ingrédients considérés.

### Hypothèses de travail

#### *Supplémentation en acides aminés libres*

Comme nous l'avons vu dans la partie 1 de l'introduction de ce manuscrit, les aliments végétaux à destination de la truite sont souvent supplémentés en lysine, méthionine et arginine libres afin de rééquilibrer leurs niveaux par rapport aux aliments contenant des farines de poissons. La supplémentation en acides aminés libres est toutefois insuffisante pour rétablir une croissance similaire à celle observée chez les truites nourries avec des aliments contenant des farines de poisson. Cette différence de croissance pourrait être due à une ou plusieurs caractéristiques des aliments végétaux perturbant la physiologie de la truite que nous avons évoquée dans la partie 1 de cette introduction.

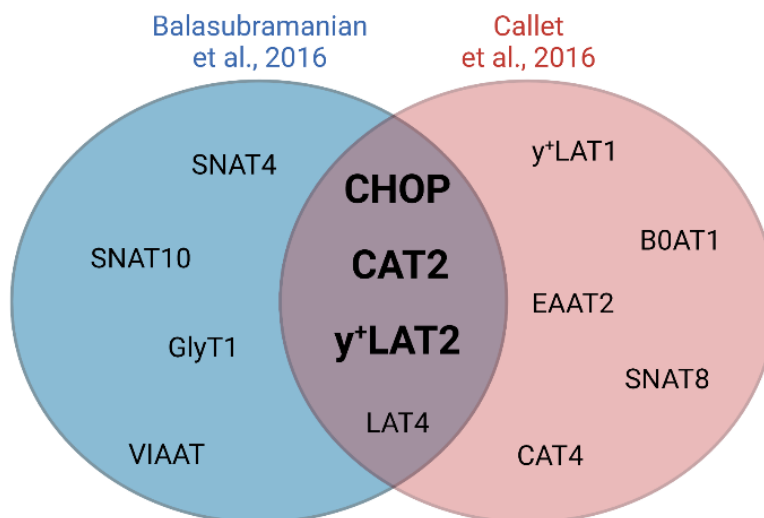
#### *La carence en acides aminés régule-t-elle l'expression des transporteurs d'acides aminés ?*

Nous nous sommes alors intéressés à des données de transcriptomiques issues de 2 études conduites au laboratoire sur l'expression de gènes chez des truites nourries avec des aliments végétaux supplémentés en AAC libres.

La première étude, menée par Balasubramanian et ses collaborateurs <sup>524</sup>, a été menée sur des alevins entiers et dans le foie et le cerveau de juvéniles nourris durant 3 semaines avec un aliment contenant de la farine et de l'huile de poisson ou un aliment végétal supplémenté en arginine et lysine libres. Les analyses transcriptomiques d'alevins entiers et également de foie et de cerveau de truites juvéniles ont permis d'observer une surexpression de CHOP (Figure 40), un des gènes cibles de la voie GCN2 chez les mammifères, chez les poissons nourris avec des régimes à base de plantes. Cette surexpression pourrait alors témoigner qu'une carence en AA est ressentie par les truites bien que les aliments végétaux aient été supplémentés en AA libres.

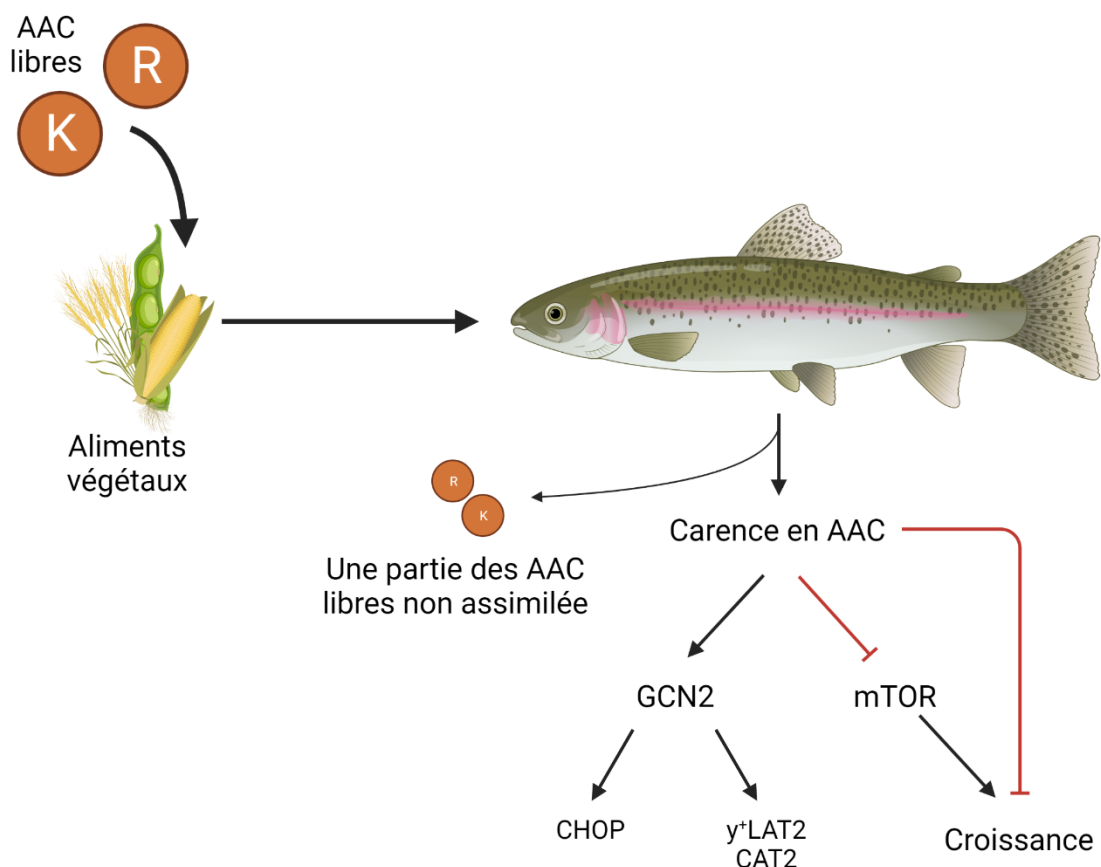
La seconde étude qui a retenu notre attention est celle de Callet et ses collaborateurs qui se sont intéressés à l'expression de gènes chez des alevins entiers de différentes lignées isogéniques de truite présentant des tolérances différentes aux aliments végétaux <sup>525</sup>. Les alevins ont été nourris avec un aliment contenant des farines et huiles de poisson ou un aliment végétal supplémentés en lysine et méthionine libres. Les données transcriptomiques montrent que les alevins de la lignée isogénique AB1h, qui est moins tolérante aux aliments végétaux que la lignée R23h, présentent également une surexpression de CHOP (Figure 40).

De plus les données transcriptomiques de ces 2 études montrent également la surexpression de différents transporteurs d'acides aminés dont SNAT10, GlyT1, VIAAT (Vesicular inhibitory amino acid transporter), B0AT1, EAAT2, SNAT8 ainsi que les transporteurs d'acides aminés cationiques SNAT4, CAT4 et  $\gamma^+$ LAT1 (Figure 40). De manière intéressante, trois autres transporteurs seraient surexprimés de façon commune à ces deux études: LAT4, un transporteur d'acides aminés neutres, ainsi que les transporteurs d'acides aminés cationiques CAT2 et  $\gamma^+$ LAT2 (Figure 40).



**Figure 40. Surexpression de CHOP et de transporteurs d'acides aminés chez des truites nourries avec des aliments végétaux supplémentés en acides aminés cationiques**

CAT2 et  $\gamma^+$ LAT2 étant tous deux, chez les mammifères, des transporteurs de la lysine et de l'arginine, nous supposons que leur surexpression pourrait être due à une carence en lysine et arginine. De plus, ces acides aminés étant ceux qui sont ajoutés sous forme libre aux aliments végétaux, nous émettons l'hypothèse que les acides aminés libres ajoutés aux aliments végétaux seraient inefficacement assimilés par les truites (Figure 41).



**Figure 41. Hypothèse d'un défaut d'absorption des AA libres impactant le métabolisme et la croissance des truites**

Suivant cette hypothèse, une réduction de la quantité d'AAC absorbés pourrait activer la voie GCN2 qui induirait alors la surexpression d'y<sup>+</sup>LAT2 et CAT2 (Figure 41).

En outre, cet effet pourrait s'accompagner d'une diminution de l'activation de la voie mTOR chez la truite et donc être responsable, au moins en partie, du défaut de croissance observé chez des poissons nourris avec des aliments constitués de protéines végétales. En effet, l'arginine, qui est un activateur connu de mTOR chez les mammifères, serait alors en quantité insuffisante pour stimuler les processus anaboliques contrôlés par mTOR (Figure 41).

### Approche du projet

Afin de répondre à ces questions, il s'avérait dans un premier temps indispensable d'approfondir nos connaissances sur la régulation de l'expression des transporteurs d'acides aminés cationiques par la carence en acides aminés et plus spécifiquement en lysine et arginine. Cependant les transporteurs d'acides aminés ayant été peu étudiés chez la truite à ce jour, il était nécessaire, d'identifier les gènes orthologues des TAACs humains exprimés chez la truite.

De plus, l'étude des effets spécifiques de la carence en acides aminés sur l'expression des TAACs étant difficilement réalisable à l'aide d'expérimentations *in vivo*, nous avons décidé

d'utiliser une approche *in vitro* en utilisant des lignées cellulaires de truite. Les cultures primaires de cellules sont déjà utilisées dans les études de nutrition des poissons et ont permis, comme nous l'avons vu dans la partie précédente, d'étudier des fonctions cellulaires chez la truite telles que l'autophagie et la voie mTOR en permettant de se prémunir des régulations systémiques opérées dans les expérimentations *in vivo*. Toutefois, cette approche présente certains inconvénients dont une durée de vie limitée des cellules qui restreint les expérimentations possibles dans ces cellules. De plus, la culture primaire nécessite le sacrifice de poissons afin d'isoler les cellules d'intérêt. A l'inverse, les lignées cellulaires, qui par définition sont des cellules immortalisées, peuvent être stockées et cultivées indéfiniment. Leur utilisation ne nécessite donc pas de mise à mort d'un poisson pour chaque expérimentation diminuant l'utilisation d'animaux pour les expérimentations en accord avec la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner). Cependant, les processus d'immortalisations des lignées cellulaires impactant notamment le métabolisme de ces cellules ainsi que leurs voies de signalisation, il était important d'évaluer au préalable la pertinence de l'utilisation de lignées cellulaires comme modèle pour l'étude du métabolisme des AA chez la truite arc-en-ciel.

Pour répondre aux questions posées dans cette thèse, nous avons alors dû choisir parmi les lignées cellulaires de poissons établies précédemment. En effet, il existe, à ce jour, plus de 720 lignées cellulaires issues de 167 espèces de poissons différentes. Parmi ces lignées, 209 (soit 29 %) ont été générées à partir de cellules provenant des 15 espèces de poissons les plus produites en aquaculture dans le monde, dont la truite arc-en-ciel qui est l'espèce comptant le nombre de lignées cellulaires le plus important (données non publiées). Ainsi, nous avons sélectionné 3 lignées cellulaires différentes, deux provenant d'hépatocytes (les lignées RTH-149<sup>526</sup> et RTL-W1<sup>527</sup>) et une issue de l'immortalisation d'entérocytes (la lignée RTgutGC<sup>528</sup>) nous permettant, à partir des résultats obtenus, d'extrapoler ceux-ci aux fonctions cellulaires de l'intestin et du foie, deux organes jouant un rôle majeur dans l'absorption et la métabolisation des AA respectivement.

Malgré l'existence de toutes ces lignées cellulaires de poissons d'intérêt agronomique dont certaines ont été générés dès les années 1960<sup>529</sup>, elles n'ont à notre connaissance pas été utilisées pour étudier des questions relatives à la nutrition des poissons. C'est pourquoi nous avons débuté notre étude par la caractérisation des voies de signalisation dépendantes des AA de ces différentes lignées, à commencer par la lignée RTH-149.

## Principaux objectifs

Les quatre objectifs principaux de cette thèse étaient premièrement de valider l'utilisation de lignées cellulaires de truites dans le cadre d'une problématique liée à la nutrition, deuxièmement d'identifier les différents TAACs exprimés chez la truite arc-en-ciel et d'étudier les régulations de leur expression par la carence en acides aminés et finalement observer les effets des carences en lysine et/ou arginine sur la physiologie cellulaire des lignées précédemment citées.

## Enjeux de l'étude

Le premier enjeu de cette étude est de proposer un nouvel outil pour l'étude de la nutrition des poissons : les lignées cellulaires de truite. L'utilisation de lignées cellulaires permettra d'identifier les effets de différents nutriments et molécules sur la physiologie des cellules de truites et de comprendre plus finement les dérégulations moléculaires induites par les aliments végétaux. En outre, la combinaison de l'utilisation de lignées cellulaires avec des techniques d'édition du génome permettra d'approfondir encore nos connaissances sur la biologie cellulaire de la truite.

Le second enjeu de cette étude est d'offrir une première vue d'ensemble des transporteurs d'acides aminés cationiques présents chez la truite arc-en-ciel et de déterminer si la régulation de leur expression est induite par des carences en acides aminés. Cette première caractérisation de l'expression des transporteurs d'acides aminés cationiques permettra dans le futur d'identifier les transporteurs les plus sujets aux dérégulations induites par des carences en acides aminés et donc d'en étudier les mécanismes d'absorption et d'activations ainsi que leur rôle cellulaire afin d'étendre nos connaissances sur leur fonctionnement. Une compréhension plus fine de l'absorption des acides aminés pourrait aider à adapter les formulations des aliments piscicoles à l'instar de la proposition de formulation d'aliment qui découle des résultats obtenus lors de cette thèse et qui est discutée dans la dernière partie de ce manuscrit.





# RESULTATS



## Résultats

Les résultats obtenus lors de cette thèse ont été le sujet de deux articles. Le premier article a été publié dans la revue *Cells* en 2020. Le second, quant à lui, sera soumis prochainement.

### Premier article

**Guillaume Morin**, Karine Pinel, Karine Dias, Iban Seiliez, and Florian Beaumatin. 2020. "RTH-149 Cell Line, a Useful Tool to Decipher Molecular Mechanisms Related to Fish Nutrition" *Cells* 9, no. 8: 1754. <https://doi.org/10.3390/cells9081754>

### Second article

**Guillaume Morin**, Karine Pinel, Karine Dias, Chloé Wayman, Iban Seiliez, and Florian Beaumatin. «Rainbow trout cell lines, a pertinent model for the study of nutritional-induced disorders: Focus on Cationic Amino Acid Transporters, GCN2 and mTOR pathways revealed putative dysregulations caused by plant proteins”.

### Communication orale

**Guillaume Morin**, Karine Pinel, Karine Dias, Iban Seiliez and Florian Beaumatin. “Vegetal-based diets induced molecular dysregulation in carnivorous fish : focus on amino acid transporters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cell lines”. **Aquaculture Europe 2020**.

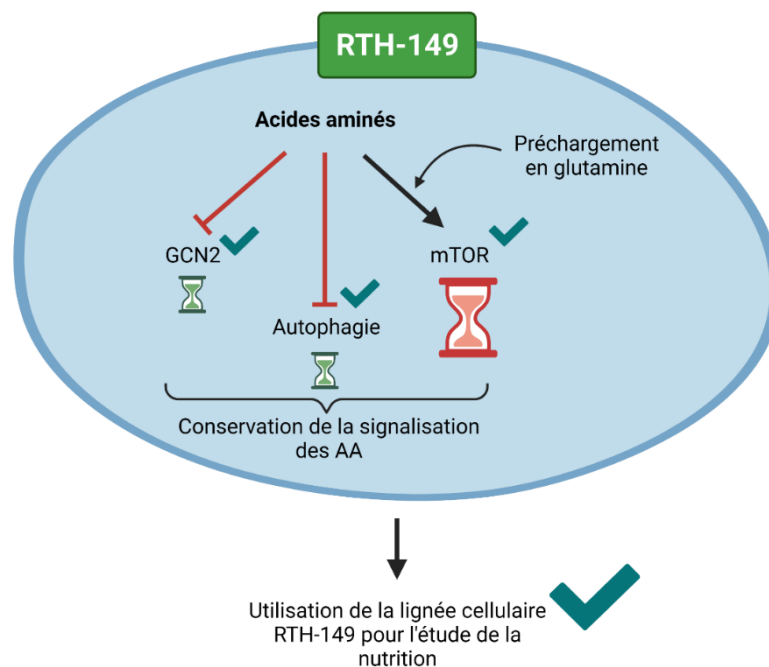


Premier article : La lignée cellulaire RTH-149, un outil pertinent pour décrypter les mécanismes moléculaires relatifs à la nutrition des poissons.

## Objectif

L'objectif de cette étude était d'étudier, dans la lignée cellulaire RTH-149, les réponses des voies de signalisation mTOR et GCN2 ainsi que de la macroautophagie à la disponibilité en acides aminés, afin de déterminer leur degré de conservation dans cette lignée cellulaire. Il s'agissait ainsi d'évaluer la pertinence de l'utilisation de lignées cellulaires de poissons en tant que nouvel outil pour répondre à des questions portant sur la nutrition et le métabolisme.

## Principaux résultats



- Les réponses à la carence en acides aminés des voies mTOR, GCN2 et la macroautophagie sont globalement conservées.
- L'activation maximale de mTOR par les acides aminés est cependant beaucoup plus longue (2 h) comparé aux modèles mammifères (20 min).
- L'activation de mTOR par les acides aminés essentiels seuls est très faible mais augmentée par le pré-chargement en glutamine.

## Conclusion

Nous avons démontré dans cet article que la signalisation cellulaire relative aux acides aminés est conservée dans la lignée cellulaire RTH-149, justifiant son utilisation pour l'étude de la nutrition des poissons. Toutefois, bien que ces voies soient conservées, nous avons mis en évidence des différences concernant l'activation de mTOR qui pourraient être caractéristiques de la truite arc-en-ciel.



Article

# RTH-149 Cell Line, a Useful Tool to Decipher Molecular Mechanisms Related to Fish Nutrition

Guillaume Morin <sup>†</sup>, Karine Pinel <sup>†</sup>, Karine Dias, Iban Seiliez  and Florian Beaumatin <sup>\*</sup> 

Université de Pau et des Pays de l'Adour, E2S UPPA, INRAE, NUMEA, 64310 Saint-Pée-sur-Nivelle, France; guillaume.morin@inrae.fr (G.M.); karine.pinel@inrae.fr (K.P.); karine.dias@inrae.fr (K.D.); iban.seiliez@inrae.fr (I.S.)

<sup>\*</sup> Correspondence: florian.beaumatin@inrae.fr

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

Received: 22 June 2020; Accepted: 20 July 2020; Published: 22 July 2020



**Abstract:** Nowadays, aquaculture provides more than 50% of fish consumed worldwide but faces new issues that challenge its sustainability. One of them relies on the replacement of fish meal (FM) in aquaculture feeds by other protein sources without deeply affecting the whole organism's homeostasis. Multiple strategies have already been tested using *in vivo* approaches, but they hardly managed to cope with the multifactorial problems related to the complexities of fish biology together with new feed formulations. In this context, rainbow trout (RT) is particularly concerned by these problems, since, as a carnivorous fish, dietary proteins provide the amino acids required to supply most of its energetic metabolism. Surprisingly, we noticed that *in vitro* approaches considering RT cell lines as models to study RT amino acid metabolism were never previously used. Therefore, we decided to investigate if, and how, three major pathways described, in other species, to be regulated by amino acid and to control cellular homeostasis were functional in a RT cell line called RTH-149—namely, the mechanistic Target Of Rapamycin (mTOR), autophagy and the general control nonderepressible 2 (GCN2) pathways. Our results not only demonstrated that these three pathways were functional in RTH-149 cells, but they also highlighted some RT specificities with respect to the time response, amino acid dependencies and the activation levels of their downstream targets. Altogether, this article demonstrated, for the first time, that RT cell lines could represent an interesting alternative of *in vivo* experimentations for the study of fish nutrition-related questions.

**Keywords:** aquaculture; rainbow trout; RTH-149 cell line; nutrition; amino acids; autophagy; mTOR; GCN2 pathway; cell homeostasis

## 1. Introduction

By 2050, the global population is expected to reach an unprecedented and alarming density. Among concerns raised by this increase, solutions need to be found to feed more than nine billion humans with affordable and nutritious foods produced with respect to the environment [1]. In this context, many expectations are placed in the aquaculture field. Indeed, aquaculture provides already more than half of the fish for human consumption every year, contributing to feeding a global population with a food widely recognized for its benefits in health. Nonetheless, new economic and ecological constraints jeopardize the sustainability of aquaculture fish production. In fact, the scarcity and the expensiveness of raw ingredients used to feed farmed fish—namely, fish meal (FM) and fish oil (FO), no longer allow affordable livestock farm fish activity [2]. Thus, one of the most important objectives of this field is to replace FM and FO from fish feed by other protein and lipid sources. So far, multiple alternatives are evaluated (e.g., plant, yeast or insect-based diet formulations) for their properties to preserve fish growth performances together with the quality of fish products [3–5].



To date, none of these strategies have fulfilled all the criteria required when a total replacement of FM and FO is considered. To better understand the outcomes of these replacements, numerous studies were performed over the last decades showing the decreases of feed efficiencies and/or feed intakes together with their related physiological dysregulations according to the diet formulations and fish species considered [6]. From now on, a comprehensive understanding of the molecular mechanisms dysregulated by these new diets is deeply required (1) to identify molecular and cellular markers that reflect the nutritive state of the fish when fed with specific ingredients and (2) to understand which metabolic pathway is essential for the cell growth and proliferation in fish of agronomic interests. This statement is particularly true when considering rainbow trout (RT) aquaculture. Indeed, RT, a carnivorous strict fish from the Salmonidae family, is described to have a metabolism that essentially relies on amino acids, brought until now by proteins contained in FM. Thus, due to FM replacement, farmed RT now see their growth performances considerably affected if no FM is supplied in their diets, as exemplified by studies using meals formulated with 100% of plant protein sources [7]. If some hypotheses are proposed to explain the growth retardation observed—among which, an unbalanced amino acid composition of new protein sources—evidences, notably at molecular levels, a lack to turn these hypotheses into principles.

Cell culture, an approach raised more than 70 years ago, is widely used in laboratories and certainly covers most topics in biology. If a primary cell culture was initially developed, rapidly, cell lines were established from different species [8–10]. The relative handling ease of cell lines combined with the reduction of animal experimentations, in accordance with the three R rules (for replacement, reduction and refinement) proposed by Russell and Burch in 1959 [11], prompted scientists to use these living biological materials as new models to study the interactions between their processes of interest and the cellular environmental conditions. Since these pioneering works, the collection of cell lines has constantly grown, in quantity and variety, to reach more than 100,000 cell lines established to date [12]. Surprisingly, and knowing that ray-finned fish represent almost 50% of the vertebrate species, only 700 fish cell lines have been established so far, with RTG-2 cells, a gonadal-derived RT cell line, as the first fish cell line [13]. Currently, the RT cell line collection, also recently called “RT Invitromatic” [14], represents almost 8% of fish cell lines generated so far and is daily used to address questions in various research fields, with the exception of nutrition. Indeed, to our knowledge, none of the studies performed so far with RT cell lines aim to decipher the molecular mechanisms related to nutrition, and the very existence, as well as the function, in these cells of the main nutrient-sensing signaling routes is still unknown. Of these, three pathways, described to be regulated by amino acids to maintain the cellular homeostasis in various species, deserve particular attention in the context of RT nutrition, which strongly relies on amino acid supplies: the general control nonderepressible 2 (GCN2), macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) and the mechanistic Target Of Rapamycin (mTOR) pathways.

mTOR is a serine/threonine kinase described to form a multimeric protein complex called mTORC1 that is specifically activated by nutrients such as amino acids (for review, [15]). Indeed, at least four amino acids have been shown to specifically induce mTOR activation: two essential amino acids (EAA)—namely, leucine and methionine—and two conditionally essential amino acids (glutamine and arginine). Once activated, mTORC1 transduces an anabolic signal by phosphorylating its downstream targets, among which are found the Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4EBP1) and the ribosomal protein S6 kinase beta-1 (S6K) [16], which stimulates cell growth and proliferation. Moreover, through its activity, mTORC1 does not solely regulate anabolism, but it also represses catabolism, since it inhibits one of the most important intracellular degradation pathways, called autophagy. Indeed, upon starvation conditions, mTORC1 gets inactive and can no longer inhibit the initiation step of autophagy [17]. Thus, cytoplasmic materials are engulfed in double-membrane vesicles called autophagosomes. Then, autophagosomes fuse with lysosomes to degrade and recycle their contents, providing new intracellular substrates essential to cope longer with starvation. This whole process, genetically controlled by AuTophagy-related (ATG) genes, has been shown to play a crucial

role in keeping cellular and organism homeostasis, while its dysregulation, notably by unbalanced dietaries, leads to pathological disorders [18]. Finally, amino acid starvation is also known to promote the activation of the integrated stress response (ISR) pathway [19], mainly through the activation of the GCN2 kinase and, to a lesser extent, via the activation of the unfolded protein response (UPR) pathway. In both cases, the depletion of amino acids leads to the eukaryotic initiation factor 2  $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ )-dependent activating transcription factor 4 (ATF4) activation. This process represses the general protein synthesis and promotes the transcription of genes related to amino acid biosynthesis and catabolic pathways, including *ddit3* for DNA damage inducible transcript 3 (also commonly called, and hereafter referred to as, *chop* for the C/EBP homology protein), *asns* (Asparagine synthetase), *map1lc3b* (microtubule associated protein 1 light chain 3 $\beta$  (hereafter referred to as *lc3*) and *sqstm1* (sequestosome 1, also known as *p62*) autophagy genes.

Thus, and prior to assessing the outcomes of the use of specific nutrients on the metabolism of the RT cell lines, it appeared essential to characterize, as described in other species, these three pathways for (1) their capacity to be induced or repressed by starvation, (2) their related kinetics and (3) their specific regulation by amino acid availabilities. To do so, a series of experimentations were conducted on the RTH-149 cell line, a RT hepatoma-derived cell line studied for decades [20] in various topics. Moreover, the RTH-149 cell line seems particularly adapted to studies related to nutrition, since liver is described as a highly metabolic organ with the highest amino acid consumption rate.

In this work, we demonstrate that RTH-149 cells display functional GCN2, autophagy and mTOR pathways. Moreover, we assessed the time course of the activation of each pathway to identify the key time points at which the molecular markers implicated in these pathways reflected the most their activation states. Finally, this study opens up exciting new perspectives for the use of this cellular model by describing, for the first time, the usefulness of the RTH-149 cell line as a relevant model to address nutrition-related questions and to study the nutrient sensing signaling pathways from a comparative and evolutionary aspect.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Cell Culture and Treatments

RTH-149 rainbow trout hepatoma cells (ATCC<sup>®</sup> CRL-1710, LGC standards, Molsheim, France) were grown at 18 °C and pH 7.4 in minimum essential medium (MEM) containing L-glutamine (#61100-053) supplemented with the MEM nonessential amino acid (NEAA) solution (#11140-50), 10% fetal bovine serum (#10270-106), 10-mM sodium pyruvate (#11360-070), 100-units/mL penicillin and 100- $\mu$ g/mL streptomycin (#14065-056), all provided by Gibco (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA), and 25-mM hepes (#BP299-1, Fisher Bioreagents, Fisher scientific SAS, Illkirch Graffenstaden, France). This complete medium (CM), hereafter also referred to the control condition (CTRL), was replaced twice a week, and cells were passaged at 80–90% of confluence. Prior to experiments, cells were counted with a Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience LLC, Lawrence, MA, USA) and plated in 6-cm-diameter dishes at a density of 400,000 cells per dish for Western blot analysis and 500,000 for real-time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis before incubation at 18 °C. After 2 days, cells were washed twice with PBS prior treatments, according to experiments. For RT-qPCR analysis, Hank's balanced salt solution (HBSS) (#14025-092, Gibco) supplemented with 25-mM hepes was used as the starvation medium. Amino acid treatment was composed of starvation medium supplemented (AA+) or not (AA-) with the MEM amino acid solution (#11130-036, Gibco) containing all essential amino acids (EAA), the MEM NEAA solution (#11140-050, Gibco) and L-glutamine (#250030-081, Gibco). For Western blot analysis, the starvation medium defined above was supplemented with EAA or NEAA and L-glutamine or all three (AA). Halofuginone hydrobromide (HF) (#32481, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) [21], an inhibitor of prolyl tRNA synthetase, was added to the CM to induce the GCN2 pathway at 10, 100 or 1000 nM where indicated. Treatment times were chosen in accordance with the different kinetic experiments presented hereafter. Hence, for Western blot analysis of the

mTOR pathway, cells were starved for 3 h and treated by amino acids for 1.5 or 2 h. Besides the time course experiments, all RT-qPCR analyses were performed using cells treated for 24 h.

### 2.2. Protein Extraction and Western Blot Analysis

Cells were washed twice in ice-cold PBS and lysed using RIPA buffer (#89901, Thermo Scientific) supplemented with Halt protease and a phosphatase inhibitor cocktail (#78442, Thermo Scientific). Protein samples were conserved on ice for 30 min before centrifugation at  $12,000\times g$  at 4 °C. The concentration of protein samples was determined using the Bicinchoninic Acid Kit (#BCA1-1KT, Sigma-Aldrich). Protein samples were mixed with Laemmli buffer and subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), transferred on polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (#IPFL00010, Merk Millipore, Burlington, MA, USA) and, finally, immunoblotted using the following antibodies: anti-ribosomal protein S6 (#2217; Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA), anti-phospho-S6 (Ser235/Ser236, #4856; Cell Signaling Technologies), anti-4EBP1 (#9452; Cell Signaling Technologies), anti-phospho-4EBP1 (Thr37/Thr46, #9459; Cell Signaling Technologies), anti-microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B (LC3B) (#2775; Cell Signaling Technologies) and anti- $\beta$ -tubulin (#2146; Cell Signaling Technologies). Membranes were incubated with IRDye secondary antibody (#926-68071, LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA) after washes.  $\beta$ -tubulin was used as the loading control and was, as for total proteins, immunoblotted after membrane stripping. Signal acquisition was performed by infrared fluorescence with the Odyssey<sup>®</sup> Imaging System (LI-COR, Inc.) and quantified using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

### 2.3. Autophagy Flux Assay

Autophagy flux assay is one of the gold standard technics developed to assess autophagy [22]. Briefly, this technic relies on LC3, a cytosolic protein (LC3-I) that, upon autophagy induction, is conjugated to phosphatidylethanolamine (LC3-II). This conversion, described to be necessary for autophagosome formation, is used to measure the induction of autophagy in the presence of lysosomal inhibitors to prevent LC3-II degradation by hydrolases. The autophagy flux assay was therefore estimated by measuring the amount of LC3-II detected by Western blot in the presence or absence of a lysosomal inhibitor. The more the LC3-II level increases in the presence of the inhibitor, the higher the autophagy flux is supposed to be. Therefore, when indicated, cells were treated for the indicated times and media in the presence or absence of 10  $\mu$ M chloroquine (CQ) (#C6628, Sigma-Aldrich) prior to proceeding to the protein extraction and Western blots analysis directed against the LC3B protein and tubulin as a loading control. Quantifications of LC3-II/tubulin ratios were then normalized to the ratio corresponding to the time point showing the highest autophagy flux (to arbitrarily define a 100% autophagy flux induction) according to the treatment considered.

### 2.4. RNA Extraction and RT-qPCR Analyses

Cells were washed twice with PBS prior to RNA extraction and purification using a RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's protocol and stored at  $-80$  °C. RNA concentration and integrity were determined using a Nanodrop<sup>®</sup> ND1000 spectrophotometer. cDNAs were synthesized from 1  $\mu$ g of RNA samples using Superscript III RNaseH<sup>-</sup>-reversetranscriptase kit (#18080-093, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with random hexamers (#C1101, Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. After a first step of denaturation (5 min at 65 °C), the retro-transcriptions of RNAs were performed (5 min at 25 °C, 1 h at 55 °C and inactivation during 15 min at 70 °C) using a thermocycler. The real-time quantitative PCR reactions were performed in triplicate, comprising 3- $\mu$ L Light Cycler 480 SYBR<sup>®</sup> Green 1 Master, 0.76  $\mu$ L of nuclease-free water (P1195, Promega), 2  $\mu$ L of diluted cDNA at 1/40 or 1/80 and 0.12  $\mu$ L of gene-specific primer (10  $\mu$ M) (listed in Table 1) on the Roche Light Cycler 480 system (Roche, Bâle, Switzerland). Primers used for RT-qPCR analyses, validated in previous studies, are listed in Table 1 [23–27]. The RT-qPCR protocol was initiated at 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles of a three-step amplification program (15 s at

95 °C, 10 s at 60 °C and 15 s at 72 °C). Melting curves were systematically monitored at the end of the last amplification cycle to confirm the specificity of the amplification reaction. Each PCR assay included negative controls (RT- and cDNA-free samples). Elongation factor 1 $\alpha$  (*ef1*) was used for the normalization, as it was found to be the most constant and accurate across the different housekeeping genes tested (*actin*, *gapdh* and *18S*) and not significantly different among all the conditions tested (data not shown). The gene expression levels were presented as the relative quotient (RQ) calculated using the  $\Delta\Delta$ CT method.

**Table 1.** List of real-time quantitative PCR (RT-qPCR) primers used in this study.

Genes	Forward Primer	Reverse Primer
<i>asns</i>	5'-CTGCACACGGTCTGGAGCTG-3'	5'-GGATCTCGTCTGGGATCAGGTT-3'
<i>chop</i>	5'-CGACAATGTCCAACAACCTG-3'	5'-ACGAGGAGAACGAGGTGCTA-3'
<i>xbp1</i>	5'-TGCAACCAAGCCAATTCTTC-3'	5'-GCGAGAACTTCGTCTTCCAG-3'
<i>edem1</i>	5'-GAACATCCAAACGGGACAGT-3'	5'-TGAGAAGAGGGAGGGAGTCA-3'
<i>lc3b</i>	5'-GAAACAGTTTGACCTGCGTGAA-3'	5'-TCTCTCAATGATGACCCGAATCT-3'
<i>sqstm1</i>	5'-AGCCCACTGGGTATCGATGT-3'	5'-GGTCACGTGAGTCCATTCCT-3'
<i>atg4b</i>	5'-TATGCGCTTCGAAAGTTGTC-3'	5'-CAGGATCGTTGGGGTTCTGC-3'
<i>atg12</i>	5'-GATGGAGCCAATGAACAGC-3'	5'-GCGTTGAACTGAAAAGGGCTAA-3'
<i>atp6v1a</i>	5'-CTGTTTAAATTTCTGAAGATCTAGCC-3'	5'-GATCTCTCCCACCAGCTCAC-3'
<i>ctsd</i>	5'-CAGACATCGCTGCTTGCTT-3'	5'-CAGGATGCCGTCAAACCTCG-3'
<i>ef1</i>	5'-TCCTCTGGTTCGTTTCGCTG-3'	5'-ACCCGAGGGACATCCTGTG-3'

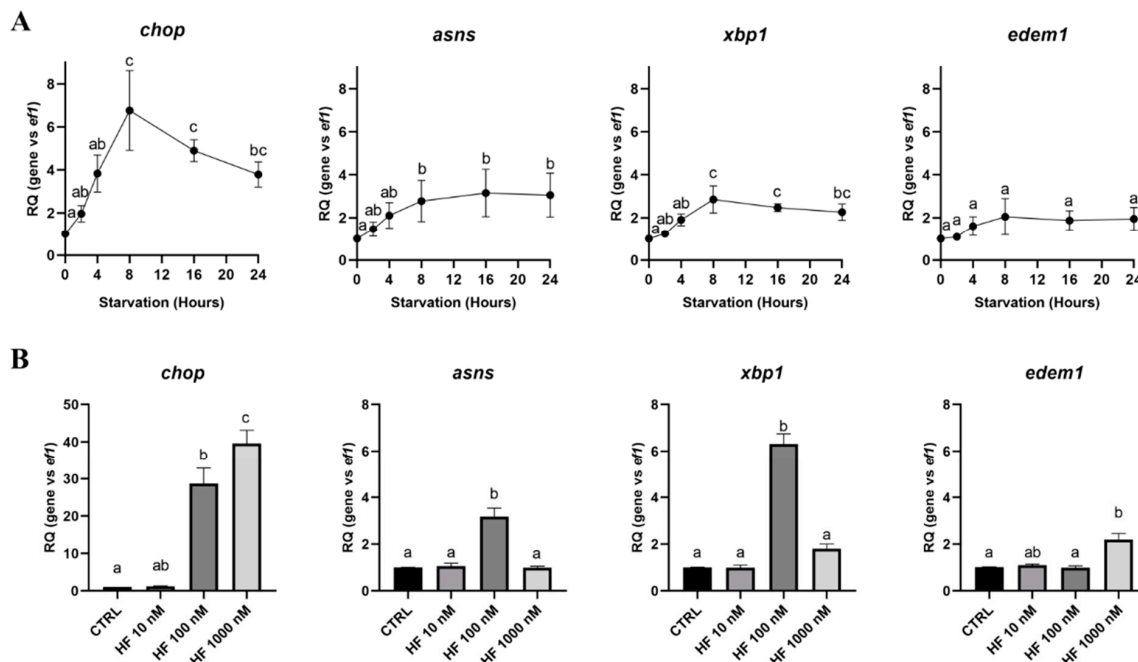
### 2.5. Statistical Analysis

All presented values are means  $\pm$  S.E.M. In each figure legend is indicated as the number of biological replicates (N). Normality was tested with the Shapiro-Wilk test for each condition independently ( $p > 0.05$ ). Then, they were analyzed using a Student's *t*-test or one-way ANOVA, with multiple comparisons performed with Tukey's post-hoc test or with Dunnett's post-hoc test when comparing conditions to the control. The test applied is mentioned in each figure legend.

## 3. Results

### 3.1. The GCN 2 Pathway

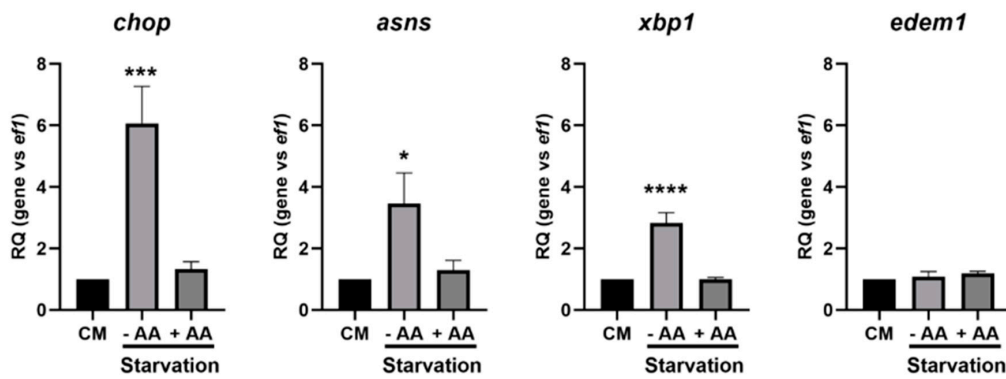
As mentioned previously, the GCN2 pathway is part of the integrated stress response (ISR) pathway induced following endoplasmic reticulum (ER) stress. Numerous stresses can activate ISR—among which, amino acid deficiency is certainly one of the most characterized. Therefore, we sought to evaluate if RTH-149 cells are prone to activate this pathway upon amino acid and serum deprivation, hereafter referred to as starvation, by assessing the time course of the gene expression described to be transcriptionally regulated by the ISR (Figure 1A).



**Figure 1.** Expression of the integrated stress response (ISR) pathway target genes induced by starvation and halofuginone hydrobromide (HF) in RTH-149 cells. **(A)** Cells were starved for the indicated times prior to proceed to RNA extraction and real-time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis of the ISR target genes. **(B)** Cells were grown in the control condition (CTRL) supplemented or not with the indicated concentration of HF. RNA was extracted 24 h following the treatments, and a RT-qPCR analysis of the ISR target genes was performed. Results are presented as the relative quotient (RQ) normalized to the  $T = 0$  h time point **(A)** or control condition **(B)**. **(A,B)** Data are presented as means  $\pm$  SEM,  $N = 4$ . Conditions showing results statistically different from each other are presented using a different letter ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA Tukey's post-hoc test).

Interestingly, we noticed that the expression of the *chop* (*ddit3*), *asns* and *xbp1* genes reached a maximum following 8 h of starvation and remained upregulated until 24 h, while *edem1*, a target of the IRE1-activated form of Xbp1 (Xbp1 spliced variant) remained constant all along the starvation. To further characterize this pathway, HF, a pharmacological activator of the GCN2 pathway, was used to mimic amino acid starvation. The use of HF, at different concentrations in RTH-149 cells grown in the CTRL condition, confirmed the involvement of Gcn2 in the specific regulation of the genes previously observed upon starvation (Figure 1B). We observed that 100 nM of HF were sufficient to upregulate the *chop*, *asns* and *xbp1* genes. Interestingly, and later discussed, when the HF concentration was increased (1000 nM), *asns* and *xbp1* upregulations were no longer observed, while *chop* was further upregulated. Finally, we confirmed the amino acid-specific regulation of the *chop*, *asns* and *xbp1* genes observed upon starvation by assessing the mRNA levels of these genes in cells grown in CM or starvation conditions supplemented or not with amino acids (Figure 2).

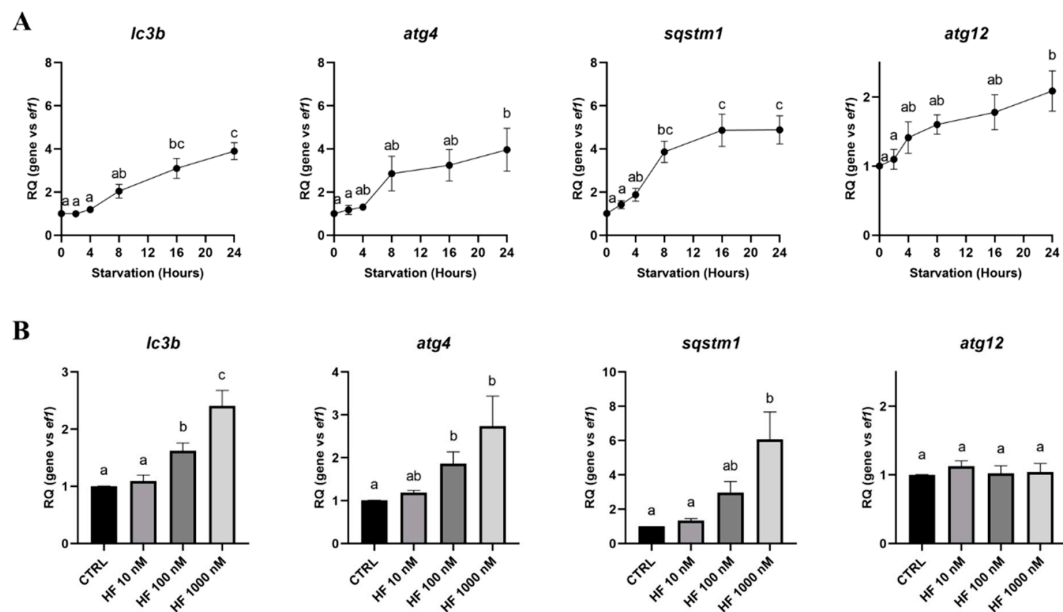
The gene expression analysis clearly revealed that starvation-induced *chop*, *asns* and *xbp1* upregulations were directly linked to amino acid availability, since no upregulation was observed for those genes when the amino acids were supplemented in the starvation condition. Beside that these results show the conservation of the GCN2 pathway in RTH-149 cells, they also demonstrate that the GCN2 pathway is canonically activated by amino acid withdrawal.



**Figure 2.** Amino acid-dependent regulation of the starvation-induced ISR gene overexpressions in RTH-149 cells. Cells were grown for 24 h in either complete medium (CM) or starvation medium supplemented (+AA) or not (–AA) with amino acids prior to proceed to RNA extraction and a RT-qPCR analysis of the ISR target genes. Results are presented as the relative quotient (RQ) normalized to the CM. Data are presented as mean values ± SEM, N = 3. Conditions showing results statistically different from the control condition (CM) are presented as \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  and \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ , one-way ANOVA Dunnett’s post-hoc test.

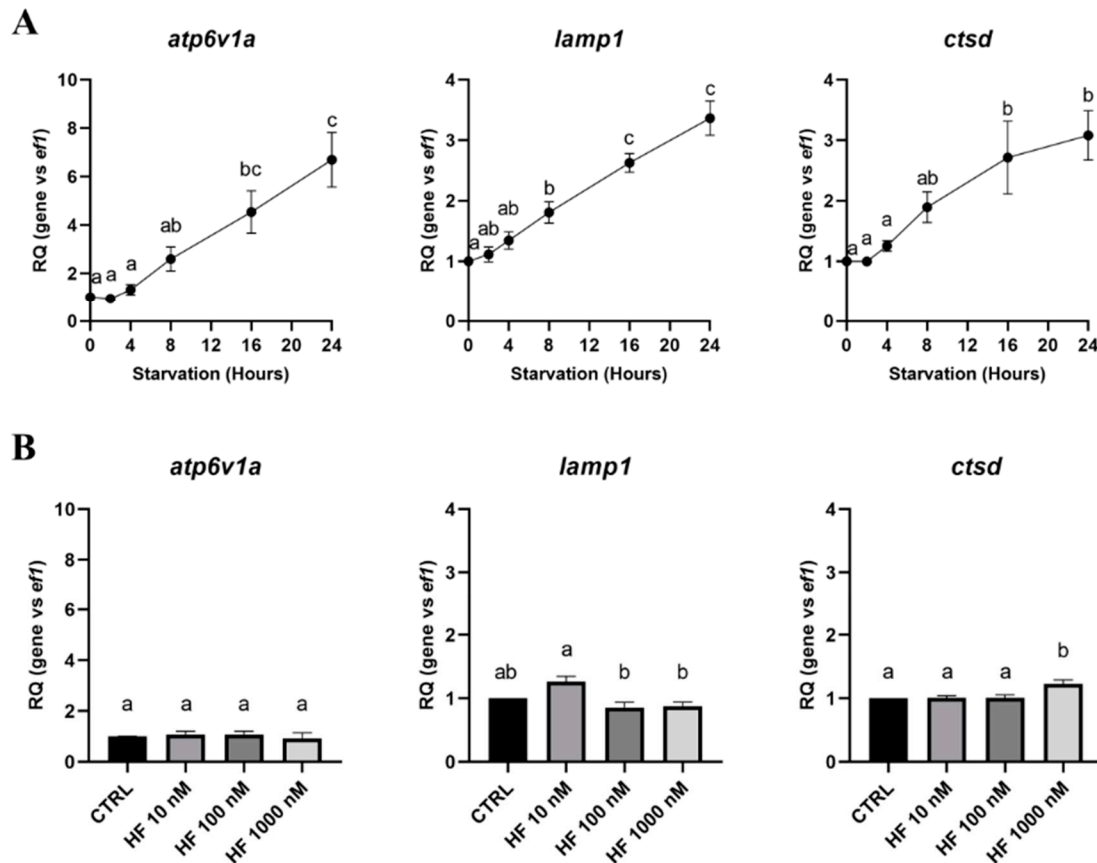
### 3.2. Autophagy

As mentioned previously, autophagy is an intracellular degradation process that is stimulated upon starvation conditions. This stimulation is controlled at different transcriptional, translational and post-translational levels. We first sought to determine the transcriptional time course of specific *atg* genes—namely, *lc3b*, *atg4*, *sqstm1* and *atg12* (Figure 3A).



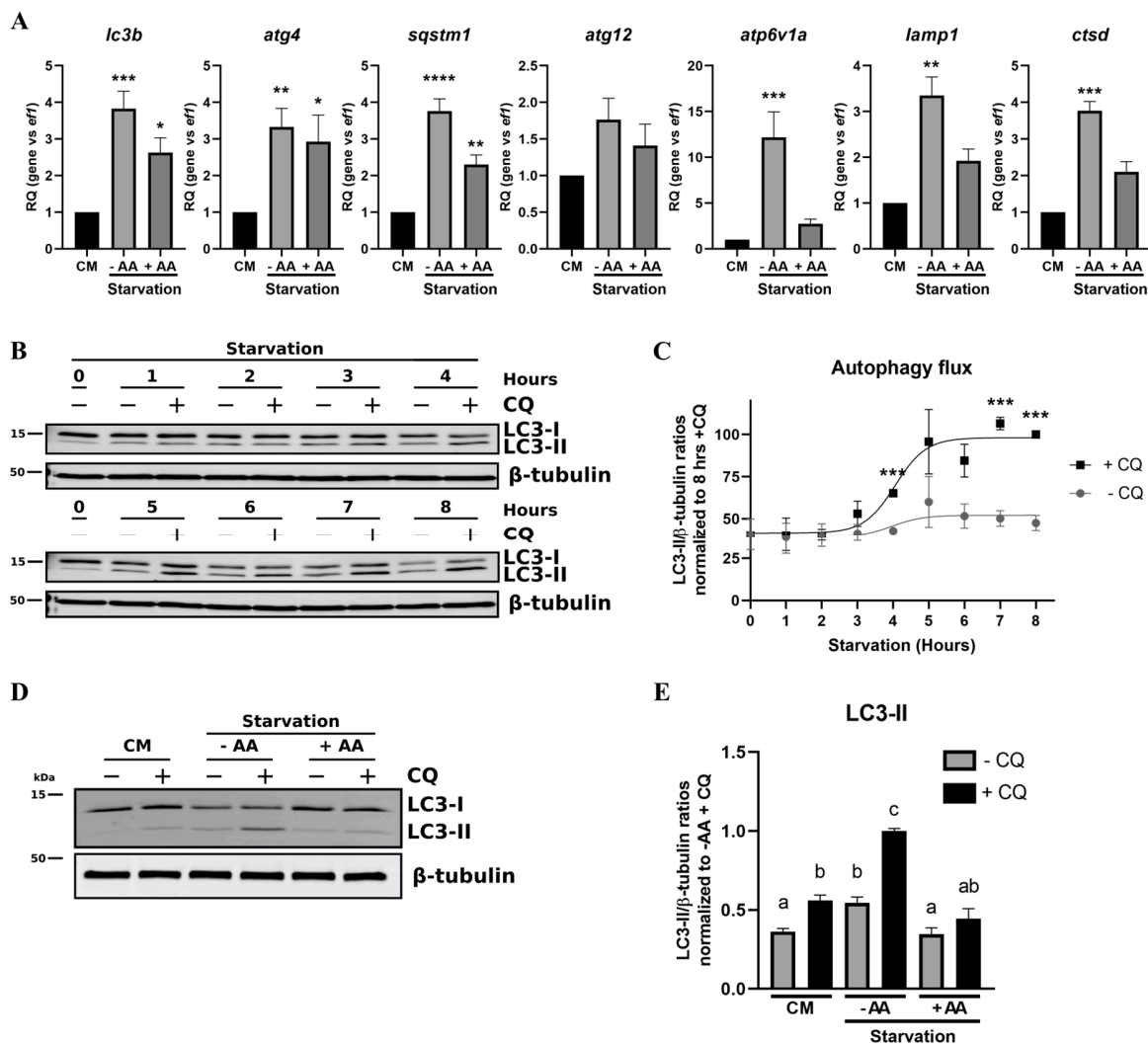
**Figure 3.** Expression of the *atg* genes induced by starvation and HF in RTH-149 cells. (A) Cells were starved during the indicated times prior to proceeding to the RNA extraction and RT-qPCR analysis of the autophagy genes. (B) Cells were grown for 24 h in the control medium (CTRL) supplemented or not with the indicated concentration of HF. Then, RNA extraction and RT-qPCR analysis of the *atg* genes were performed. Results are presented as the relative quotient (RQ) normalized to the T = 0 h time point (A) or the control condition (B). Data are presented as means ± SEM, N = 4. Conditions showing results statistically different from each other are presented using a different letter ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA Tukey’s post-hoc test).

If all genes tested showed a significant increase following 24 h of starvation, the time courses were slightly different between each other. Indeed, *sqstm1* expression is the first to be significantly upregulated (8 h), while it takes 16 h of starvation to detect *lc3b* upregulation and 24 h for the *atg4* and *atg12* genes. Moreover, the treatments of the RTH-149 cells with HF (Figure 3B) showed that *lc3b*, *atg4* and *sqstm1*, but not *atg12*, were upregulated following the GCN2 pathway activation. Then, knowing that autophagy requires functional lysosomes to be completed, we also analyzed the expression of lysosomal markers upon starvation and the specific requirements of an active GCN2 pathway (Figure 4).



**Figure 4.** Expression of lysosomal markers induced by starvation and HF in RTH-149 cells. (A) Cells were starved during the indicated times prior to proceeding to the RNA extraction and RT-qPCR analysis of the lysosomal genes. (B) Cells were grown for 24 h in the control medium (CTRL) supplemented or not with the indicated concentration of HF. Then, RNA extraction and RT-qPCR analysis of the lysosomal genes were performed. Results are presented as the relative quotient (RQ) normalized to the  $T = 0$  h time point (A) or the control condition (B). Data are presented as means  $\pm$  SEM,  $N = 4$ . Conditions showing results statistically different from each other are presented using a different letter ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA Tukey's post-hoc test).

Whatever their final localization, such as the lysosomal membrane for the V-type proton ATPase catalytic subunit A (Atp6v1a) and the lysosome-associated membrane glycoprotein 1 (Lamp1) or the lysosomal lumen for cathepsin D (Ctsd), all the lysosomal markers tested showed a strong increase, with a maximum between 16 and 24 h of starvation, according to the gene considered (Figure 4A). However, we observed that the *atp6v1a*, *lamp1* and *ctsd* gene expressions were not, or very slightly, affected by HF-induced GCN2 activation. (Figure 4B). So, to better understand if amino acids control autophagy in RTH-149 cells, we therefore analyzed how autophagy and lysosomal genes were regulated in cells grown in the control or starvation conditions supplemented or not with amino acids (Figure 5A).



**Figure 5.** Amino acid-dependent regulation of starvation-induced autophagy in RTH-149 cells. (A) Cells were grown for 24 h in either complete medium (CM) or starvation medium supplemented (+AA) or not (−AA) with amino acids prior to proceeding to the RNA extraction and RT-qPCR analysis of the autophagy and lysosomal genes. Results are presented as the relative quotient (RQ) normalized to the CM. Data are presented as means ± SEM, N = 3. Conditions showing results statistically different from the control condition (CM) are presented as \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  and \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ , one-way ANOVA Dunnett’s post-hoc test. (B) Cells were starved for the indicated time prior to proceeding to the protein extraction and Western blot analysis using antibodies directed against LC3B and β-tubulin as a loading control. (C) Quantifications of the LC3-II and β-tubulin levels from the Western blots were performed using ImageJ. Results are presented as ratios of LC3-II on β-tubulin levels normalized to the 8 h of starvation with the CQ condition. Data are presented as mean values ± SEM, N = 3. For each time point, results were compared between +CQ vs. −CQ. Statistical differences are shown as \*\*\*:  $p < 0.001$ , Student’s *t*-test. (D) Cells were grown for 5 h in either complete medium (CM) or starvation medium supplemented (+AA) or not (−AA) with amino acids and 10 μM of CQ (−/+ CQ) prior to proceeding to the protein extraction and Western blot analysis using antibodies directed against LC3B and β-tubulin as a loading control. (E) Quantifications of the LC3-II and β-tubulin levels were made using ImageJ software. Results are presented as ratios of LC3-II on β-tubulin levels normalized to starvation without amino acids and with the CQ (−AA +CQ) condition. Data are presented as means ± SEM, N = 5. Conditions showing results statistically different from each other are presented using a different letter ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA Tukey’s post-hoc test).

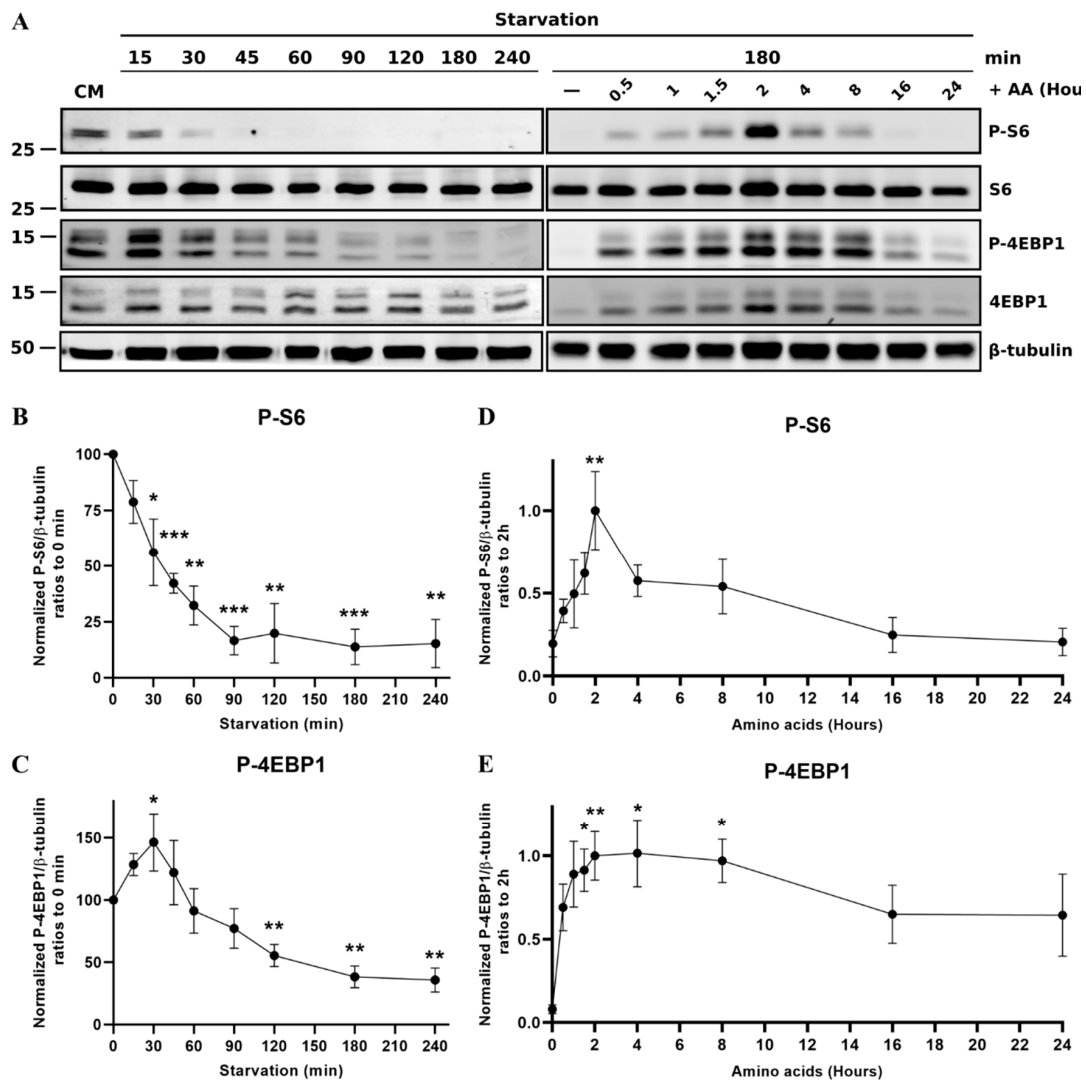


Interestingly, we noticed that, if starvation induced an upregulation of all the markers tested, the supplementation of the starvation medium with amino acids showed minor effects on the autophagy genes, while the lysosomal markers were no longer upregulated (Figure 5A). In light of these results, it appeared essential to assess, at the protein level, how the autophagy flux is induced in RTH-149 cells and how it is regulated by amino acids. Therefore, we first initiated a set of experiments to define the time point at which autophagy induction can be detected (Figure 5B). A Western blot analysis performed against the Lc3b protein revealed an accumulation of LC3-II in the presence of CQ from 4 h until 8 h of starvation (Figure 5C), suggesting that the autophagy flux is efficiently induced following at least 4 h of starvation. Based on these results, we then conducted experiments in which RTH-149 cells were grown for 5 h in control or starvation conditions supplemented or not with amino acids and CQ (Figure 5D,E). The LC3b protein detected by Western blot clearly showed that the accumulation of LC3-II observed upon starvation in the presence of CQ was considerably decreased when amino acids were added to the starvation medium. Quantifications of the LC3-II levels confirmed that the presence of amino acids in the starvation medium significantly restored an autophagy flux similar to a control condition. Altogether, these results demonstrate that the autophagy pathway is conserved and tightly regulated by amino acids in RTH-149 cells.

### 3.3. *mTOR*

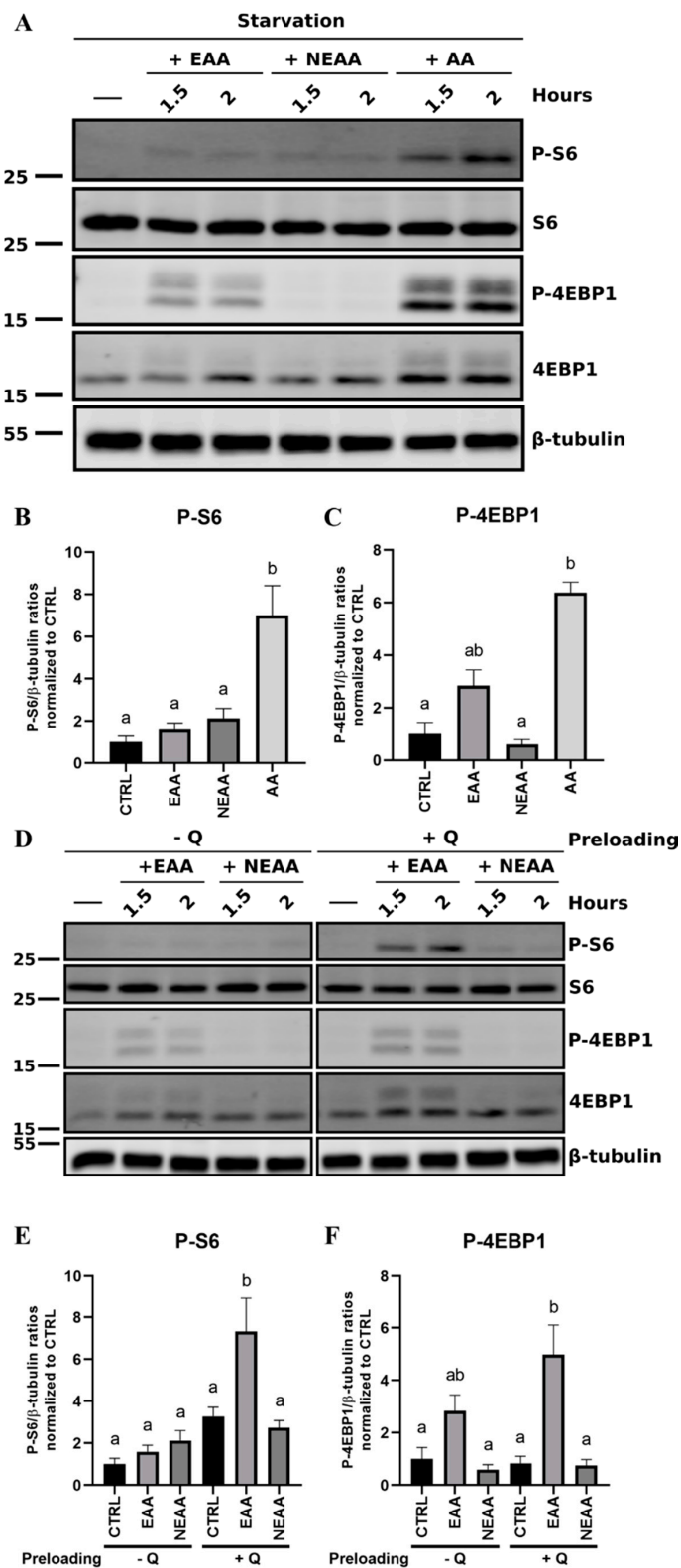
The mTOR pathway is another major cellular pathway that is described to respond to amino acid availability. In contrast with the GCN2 and autophagy pathways, this pathway is inactivated upon starvation and activated in the presence of intracellular amino acids to keep cellular homeostasis. Thus, we sought to analyze the rate at which mTOR is inactivated upon starvation, as well as its specific kinetic of activation by amino acids by conducting a Western blot analysis directed against the phospho-4EBP1 and phospho-S6 proteins. For this, we used protein extracts from RTH-149 cells starved for different time points or starved prior to being stimulated back with amino acids for the indicated time (Figure 6).

If the dephosphorylation of S6 appeared to start following only 15 min of starvation to finally become undetectable after 60 min, surprisingly, the level of phospho-4EBP1 increased in the first instance before finally decreasing (Figure 6A, left panel). Quantifications of the dephosphorylation rates observed upon starvation for the S6 and 4EBP1 proteins revealed that, if the S6 phosphorylation levels continuously decreased to a minimum state observed following 90 min of starvation (Figure 6B), for unknown reasons, the 4EBP1 phosphorylation level significantly increased after 30 min of starvation prior to becoming significantly dephosphorylated after 2 h (Figure 6C). In light of these results, and to observe the activation of the mTOR by amino acids, the cells were first starved for 3 h, the starvation time required for S6 and 4EBP1 to display the lowest phosphorylation, prior to being stimulated with amino acids for the indicated time. This set of experiments allowed a fine detection of the phosphorylation induced by amino acid treatments of these targets (Figure 6A, right panel). Thus, signals of the phospho-S6 and phospho-4EBP1 proteins were detected early following amino acid stimulation (30 min), but quantifications revealed different kinetics between each target (Figure 6D,E). Indeed, S6 phosphorylation is significant and maximal only after 2 h of stimulation, while 4EBP1 becomes significantly faster and longer phosphorylated (from one hour and a half to 8 h of amino acid stimulation). According to these results, the following experimentations were conducted with the optimized protocol, meaning a starvation of cells for 3 h prior a stimulation with amino acids for 1.5 or 2 h.



**Figure 6.** Regulation of the mechanistic Target Of Rapamycin (mTOR) pathway activity following starvation or stimulation with amino acids in RTH-149 cells. (A) Left panel: Cells were starved for the indicated time. Right panel: Cells were starved for 3 h prior to being treated using the starvation medium supplemented with amino acids for the indicated time. Following the protein extractions, Western blots were performed using antibodies directed against phospho-S6, total S6, phospho-4EBP1 and total 4EBP1 proteins and β-tubulin as a loading control. (B–E) Quantifications were performed using ImageJ software, and ratios between the indicated phosphorylated protein levels and β-tubulin were calculated prior to being normalized to  $T = 0$  h (B,C) or  $T = 2$  h (D,E). Data are presented as means  $\pm$  SEM,  $N = 3$ . Conditions showing results statistically different from the 0 h time point are presented as \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  and \*\*\*:  $p < 0.001$ , one-way ANOVA Dunnett’s post-hoc test.

Thereafter, we sought to evaluate how the mTOR could be specifically activated by two independent groups of amino acids: EAA (containing arginine) or nonessential amino acids (NEAA) supplemented with glutamine (Q) (Figure 7A). Astonishingly, when treated independently with these two pools of amino acids, no or low phosphorylation of S6 and 4EBP1 were detected compared to the phosphorylation levels observed and quantified with the total amino acid treatments (Figure 7B,C). Nonetheless, when the RTH-149 cells were preloaded with glutamine prior to repeating the stimulation with EAA or NEAA, the mTOR was only activated by EAA, as observed by a Western blot analysis (Figure 7D) and their respective quantifications (Figure 7E,F). Altogether, these results demonstrate that RTH-149 cells display a functional mTOR pathway that can sense the availability of amino acids.



**Figure 7.** Regulation of essential and nonessential amino acids on mTOR activation in RTH-149 cells. (A) Cells were starved during 3 h prior to being treated with the starvation medium supplemented either with total (AA), essential (EAA) or nonessential amino acids (NEAA) during the indicated time. Following protein extractions, Western blots were performed using antibodies directed against phospho-S6, total S6, phospho-4EBP1 and total 4EBP1 proteins and  $\beta$ -tubulin as a loading control. (B,C) Quantifications were performed using ImageJ software, and ratios between the indicated

phosphorylated protein levels and  $\beta$ -tubulin were calculated prior to being normalized to the CTRL condition at 2 h. Data are presented as means  $\pm$  SEM,  $N = 3$ . Conditions showing results statistically different from each other are presented using a different letter ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA Tukey's post-hoc test). (D) Experiments were performed as in (A), except that cells were starved in the presence or not of glutamine (-/+Q) prior 1.5 or 2 h-treatments with EAA or NEAA. (E,F) Quantifications and analyses of 2 h-treatments were made as described in (B,C). Data are presented as means  $\pm$  SEM,  $N = 3$ . Conditions showing results statistically different from each other are presented using a different letter ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA Tukey's post-hoc test).

#### 4. Discussion

In recent years, the use of the primary cultures of myoblasts, adipocytes or hepatocytes increased significantly to study molecular mechanisms related to the nutrition of fish of agronomic interests [28–35]. Although this approach led to significant progress in the field, it also revealed its weaknesses. Indeed, beside that the society is more than ever pushing to restrict animal experimentations, primary cell cultures do not allow yet (or only to a very limited extent) a functional genomic analysis and, thus, limits our understandings of specific gene functions.

In the present study, we sought to investigate the usefulness of a RT cell line to address nutrition-related questions by focusing our work on three major pathways shown to regulate cell homeostasis through their regulation by amino acids. Our work clearly demonstrates that RTH-149 cells display functional GCN2, autophagy and mTOR pathways. Indeed, the results obtained clearly demonstrate that starvation can be sensed by RTH-149 cells, which then induce the activation of GCN2 and drive the expression of ISR-related genes in an amino acid-dependent manner. In detail, the results showed that a high concentration of HF (1000 nM) strongly upregulates *chop* but represses the induction of other ISR-related genes. This result corroborates previous findings from different species demonstrating that Chop overexpression contributes to a negative feedback loop responsible for attenuating the starvation-induced GCN2 response [36]. Furthermore, similarities in the regulation of the autophagy pathways were observed in RTH-149 cells compared to other species. For example, the regulations of *sqstm1*, *atg4* and *lc3b* observed in RTH-149 cells were already described in a mouse cell line to be induced following starvation in a GCN2/ATF4-dependent manner [37]. To the same extent, the kinetic of the starvation-induced autophagy measured in RTH-149 cells almost perfectly matches with the one measured in starved mouse embryonic fibroblast (MEF) cells [38]. Finally, the results obtained in RTH-149 cells related to the amino acid-induced mTOR activation are also consistent with those obtained in other species. Indeed, in RTH-149 cells, the mTOR appeared to be strongly activated by EAA when the cells were preloaded with glutamine. This observation would indicate that RTH-149 cells sense amino acids and activate the mTOR following mechanisms shared between trout, mice and human cell lines [39,40] Altogether, experiments conducted so far in RTH-149 cells tend to demonstrate that molecular mechanisms leading to GCN2, autophagy and mTOR activation have been conserved throughout evolution.

Nonetheless, if the results obtained in the RTH-149 cell line backup the main results observed in other species and, also, in previous studies performed in primary RT cell cultures [41–43], our data also highlights some particularities that RTH-149 cells display for these three pathways. For instance, we observed that *atg12* was not upregulated following the HF treatment, indicating that *atg12* is likely not a target of the GCN2 pathway in RTH-149 cells, while it is in MEF cells [37]. Furthermore, we observed that the overexpression of *atg* genes upon starvation was not repressed in the presence of amino acids in RTH-149 cells, in contrast to observations previously made in primary RT myoblasts [41]. To better understand these differences in the regulation of *atg* genes, future studies will have to be conducted to determine, for instance, if this could be related to the tissue from which the cell line derived or related to the transformation/immortalization process. Finally, despite the increase of phosphorylation of 4EBP1 observed in the earlier time points of starvation, which has not been reported so far in other species, we observed that the mTOR pathway reacts more slowly to starvation, or to a stimulation with amino acids, than the responses observed in other species. Indeed, when it takes

less than 20 min for the mammalian mTOR pathway to be activated by amino acids [44], in RTH-149 cells, we observed a significant increase in the phosphorylation levels of S6 and 4EBP1 following 2 h of stimulation. On one hand, an explanation for this delayed response could be that, since rainbow trout have evolved to grow in cold water (24 °C or higher temperatures being lethal for trout), the whole process could be slowed down by the growing temperature routinely used for cell cultures (18 °C). On the other hand, we observed that the kinetics of the activation of the autophagy process in RTH-149 cells is comparable with those observed in mammalian cells. Altogether, these observations likely point to intrinsic specificities of the RTH-149 cells and, finally, draw the attention of future studies to the need to characterize the time responses of these pathways in other cell lines, or primary cell cultures, to avoid jumping to conclusions on the effects of a specific nutrient or stress. Moreover, the results obtained on the autophagy flux in starved RTH-149 cells demonstrated, one more time, the complexity of autophagy, which is regulated at multiple levels and by different stresses, and strengthened the need to follow guidelines to assess autophagy [22]. Indeed, if we observed that *atg* gene expressions were not regulated by the amino acid availability, the autophagic flux assay clearly showed a repression of the starvation-induced autophagy in the presence of amino acids. Independently, each result could lead to opposite conclusions, but, according to the literature, from different species previously mentioned and to the different time courses measured for the mTOR and autophagy in our study, this characterization of the autophagy response in RTH-149 cells likely supports the canonical model for which the mTOR regulates autophagy via the amino acid-sensing pathway.

Altogether, our study supports, for the first time, the use of RTH-149 cells in nutrition-related topics. Indeed, it presents a full set of protocols, and it identifies numbers of key molecular markers together with their specific time-dependent activations that could be of great interest for future experimentations aiming to better understand molecular mechanisms involved in, and controlling, fish nutrition. The use of RT cell lines, through nutritional approaches, will certainly help to develop new feed formulations using alternative protein sources rather than FM. For instance, vegetal proteins are well-described to lack some EAA (e.g., methionine, lysine and threonine) [45] that are required to be supplemented to the diet as free amino acids to cover, theoretically, the metabolic needs of fish. For instance, numerous studies previously performed *in vivo* evaluated if a supplementation of the missing amino acids could be effective on trout growth and, if so, at which level of supplementation [46]. Therefore, it is now well-described that EAA supplementation in plant-based diets prevent, but only partially, the growth retardation observed in fish fed with regular plant-based diets. From now on, new feedstuffs are being studied to replace FM, such as yeast- and insect-based diets, but, even if they theoretically display proteins well-balanced for EAA, the demonstration that their general amino acid profiles meet the metabolic fish needs is not yet confirmed. In this context, *in vitro* approaches using RT cell lines will address these questions, for instance, by mimicking the amino acid composition of the alternative protein source to grow cells and look at the cellular outcomes prior to proceeding to *in vivo* validations usually considered as being heavier and time-consuming.

Finally, considering the abundance of cell lines in the RT invitromatic, we believe that the use of cell lines to study fish nutrition and metabolism will be of great interest in the close future, especially with the recent advances in gene invalidation technics, such as CRISPR/cas9. Definitively, the combination of such approaches will therefore allow to understand deeper the relationships between nutrients and fish homeostasis and will certainly help to design new feed formulations for the development of an aquaculture that is sustainable and eco-responsible.

**Author Contributions:** Conceptualization, F.B. and I.S.; methodology, F.B., I.S., G.M. and K.P.; validation, F.B., I.S., G.M. and K.P.; formal analysis, K.D., G.M. and K.P.; investigation, K.D., G.M. and K.P.; resources, F.B. and I.S.; data curation, G.M. and K.P.; writing—original draft preparation, F.B.; writing—review and editing, F.B., I.S., K.D., G.M. and K.P.; visualization, F.B., G.M. and K.P.; supervision, F.B. and I.S.; project administration, F.B. and I.S. and funding acquisition, F.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the ANR JCJC (grant number ANR19-CE20-0003-01) and the “Université de Pau et des Pays de l’Adour” through a junior chair project supported by the Energy Environment Solutions (E2S UPPA).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. FAO. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020: Sustainability in Action*; The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA); FAO: Rome, Italy, 2020; ISBN 978-92-5-132692-3.
2. Naylor, R.L.; Hardy, R.W.; Bureau, D.P.; Chiu, A.; Elliott, M.; Farrell, A.P.; Forster, I.; Gatlin, D.M.; Goldberg, R.J.; Hua, K.; et al. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 15103–15110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kaushik, S.J.; Covès, D.; Dutto, G.; Blanc, D. Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* **2004**, *230*, 391–404. [[CrossRef](#)]
4. Vilhelmsson, O.T.; Martin, S.A.M.; Médale, F.; Kaushik, S.J.; Houlihan, D.F. Dietary plant-protein substitution affects hepatic metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nutr.* **2004**, *92*, 71–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Roques, S.; Deborde, C.; Richard, N.; Sergent, L.; Kurz, F.; Skiba-Cassy, S.; Fauconneau, B.; Moing, A. Characterizing alternative feeds for rainbow trout (O-mykiss) by H-1 NMR metabolomics. *Metabolomics* **2018**, *14*, 155. [[CrossRef](#)]
6. Daniel, N. A review on replacing fish meal in aqua feeds using plant protein sources. *Int. J. Fish. Aquat. Stud.* **2018**, *6*, 164–179.
7. de Francesco, M.; Parisi, G.; Medale, F.; Lupi, P.; Kaushik, S.J.; Poli, B.M. 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* **2004**, *236*, 413–429. [[CrossRef](#)]
8. Sanford, K.K.; Earle, W.R.; Likely, G.D. The growth in vitro of single isolated tissue cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **1948**, *9*, 229–246. [[PubMed](#)]
9. Scherer, W.F.; Syverton, J.T.; Gey, G.O. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.* **1953**, *97*, 695–710. [[CrossRef](#)]
10. Madin, S.H.; Andriese, P.C.; Darby, N.B. The in vitro cultivation of tissues of domestic and laboratory animals. *Am. J. Vet. Res.* **1957**, *18*, 932–941.
11. The Principles of Humane Experimental Technique. *Med. J. Aust.* **1960**, *1*, 500. [[CrossRef](#)]
12. Bairoch, A. The Cellosaurus, a Cell-Line Knowledge Resource. *J. Biomol. Tech.* **2018**, *29*, 25–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Wolf, K.; Quimby, M.C. Established eurythermic line of fish cells in vitro. *Science* **1962**, *135*, 1065–1066. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Bols, N.C.; Pham, P.H.; Dayeh, V.R.; Lee, L.E.J. Invitromatics, invitrome, and invitroomics: Introduction of three new terms for in vitro biology and illustration of their use with the cell lines from rainbow trout. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **2017**, *53*, 383–405. [[CrossRef](#)]
15. Kim, J.; Guan, K.-L. mTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth. *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 63–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Hara, K.; Yonezawa, K.; Weng, Q.P.; Kozłowski, M.T.; Belham, C.; Avruch, J. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 14484–14494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Hosokawa, N.; Hara, T.; Kaizuka, T.; Kishi, C.; Takamura, A.; Miura, Y.; Iemura, S.; Natsume, T.; Takehana, K.; Yamada, N.; et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* **2009**, *20*, 1981–1991. [[CrossRef](#)]
18. Saha, S.; Panigrahi, D.P.; Patil, S.; Bhutia, S.K. Autophagy in health and disease: A comprehensive review. *Biomed. Pharm.* **2018**, *104*, 485–495. [[CrossRef](#)]
19. Pakos-Zebrucka, K.; Koryga, I.; Mnich, K.; Ljujic, M.; Samali, A.; Gorman, A.M. The integrated stress response. *EMBO Rep.* **2016**, *17*, 1374–1395. [[CrossRef](#)]
20. Lannan, C.N.; Winton, J.R.; Fryer, J.L. Fish cell lines: Establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In Vitro* **1984**, *20*, 671–676. [[CrossRef](#)]

21. Ravishankar, B.; Liu, H.; Shinde, R.; Chaudhary, K.; Xiao, W.; Bradley, J.; Koritzinsky, M.; Madaio, M.P.; McGaha, T.L. The amino acid sensor GCN2 inhibits inflammatory responses to apoptotic cells promoting tolerance and suppressing systemic autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 10774–10779. [[CrossRef](#)]
22. Klionsky, D.J.; Abdelmohsen, K.; Abe, A.; Abedin, M.J.; Abeliovich, H.; Acevedo Arozena, A.; Adachi, H.; Adams, C.M.; Adams, P.D.; Adeli, K.; et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **2016**, *12*, 1–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Alami-Durante, H.; Medale, F.; Cluzeaud, M.; Kaushik, S.J. Skeletal muscle growth dynamics and expression of related genes in white and red muscles of rainbow trout fed diets with graded levels of a mixture of plant protein sources as substitutes for fishmeal. *Aquaculture* **2010**, *303*, 50–58. [[CrossRef](#)]
24. Belghit, I.; Skiba-Cassy, S.; Geurden, I.; Dias, K.; Surget, A.; Kaushik, S.; Panserat, S.; Seiliez, I. Dietary methionine availability affects the main factors involved in muscle protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nutr.* **2014**, *112*, 493–503. [[CrossRef](#)]
25. Lansard, M.; Panserat, S.; Plagnes-Juan, E.; Seiliez, I.; Skiba-Cassy, S. Integration of insulin and amino acid signals that regulate hepatic metabolism-related gene expression in rainbow trout: Role of TOR. *Amino Acids* **2010**, *39*, 801–810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Seiliez, I.; Gutierrez, J.; Salmerón, C.; Skiba-Cassy, S.; Chauvin, C.; Dias, K.; Kaushik, S.; Tesseraud, S.; Panserat, S. An in vivo and in vitro assessment of autophagy-related gene expression in muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. Part. B: Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *157*, 258–266. [[CrossRef](#)]
27. Seiliez, I.; Belghit, I.; Gao, Y.; Skiba-Cassy, S.; Dias, K.; Cluzeaud, M.; Rémond, D.; Hafnaoui, N.; Salin, B.; Camougrand, N.; et al. Looking at the metabolic consequences of the colchicine-based in vivo autophagic flux assay. *Autophagy* **2016**, *12*, 343–356. [[CrossRef](#)]
28. Segner, H.; Blair, J.; Wirtz, G.; Miller, M. Cultured Trout Liver-Cells-Utilization of Substrates and Response to Hormones. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Anim* **1994**, *30A*, 306–311. [[CrossRef](#)]
29. Froehlich, J.M.; Seiliez, I.; Gabillard, J.-C.; Biga, P.R. Preparation of Primary Myogenic Precursor Cell/Myoblast Cultures from Basal Vertebrate Lineages. *J. Vis. Exp.* **2014**, e51354. [[CrossRef](#)]
30. Pereira, C.; Vijayan, M.; Moon, T. In-Vitro Hepatocyte Metabolism of Alanine and Glucose and the Response to Insulin in Fed and Fasted Rainbow-Trout. *J. Exp. Zool.* **1995**, *271*, 425–431. [[CrossRef](#)]
31. Buzzi, M.; Henderson, R.J.; Sargent, J.R. The desaturation and elongation of linolenic acid and eicosapentaenoic acid by hepatocytes and liver microsomes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing fish oil or olive oil. *Biochim. Biophys. Acta-Lipids Lipid Metab.* **1996**, *1299*, 235–244. [[CrossRef](#)]
32. Bower, N.I.; Johnston, I.A. Paralogs of Atlantic salmon myoblast determination factor genes are distinctly regulated in proliferating and differentiating myogenic cells. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2010**, *298*, R1615–R1626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Garcia de la Serrana, D.; Codina, M.; Capilla, E.; Jimenez-Amilburu, V.; Navarro, I.; Du, S.-J.; Johnston, I.A.; Gutierrez, J. Characterisation and expression of myogenesis regulatory factors during in vitro myoblast development and in vivo fasting in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Comp. Biochem. Physiol. A-Mol. Integr. Physiol.* **2014**, *167*, 90–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Cleveland, B.M. In vitro and in vivo effects of phytoestrogens on protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) white muscle. *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharm.* **2014**, *165*, 9–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Cleveland, B.M.; Weber, G.M. Effects of insulin-like growth factor-I, insulin, and leucine on protein turnover and ubiquitin ligase expression in rainbow trout primary myocytes. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2010**, *298*, R341–R350. [[CrossRef](#)]
36. Su, N.; Kilberg, M.S. 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.* **2008**, *283*, 35106–35117. [[CrossRef](#)]
37. B'chir, W.; Maurin, A.-C.; Carraro, V.; Averous, J.; Jousse, C.; Muranishi, Y.; Parry, L.; Stepien, G.; Fafournoux, P.; Bruhat, A. The eIF2 alpha/ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 7683–7699. [[CrossRef](#)]

38. Kaizuka, T.; Morishita, H.; Hama, Y.; Tsukamoto, S.; Matsui, T.; Toyota, Y.; Kodama, A.; Ishihara, T.; Mizushima, T.; Mizushima, N. An Autophagic Flux Probe that Releases an Internal Control. *Mol. Cell* **2016**, *64*, 835–849. [[CrossRef](#)]
39. Nicklin, P.; Bergman, P.; Zhang, B.; Triantafellow, E.; Wang, H.; Nyfeler, B.; Yang, H.; Hild, M.; Kung, C.; Wilson, C.; et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* **2009**, *136*, 521–534. [[CrossRef](#)]
40. 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. mTORC1 Activation Requires DRAM-1 by Facilitating Lysosomal Amino Acid Efflux. *Mol. Cell* **2019**, *76*, 163–176.e8. [[CrossRef](#)]
41. Seiliez, I.; Gabillard, J.-C.; Rflade, M.; Sadoul, B.; Dias, K.; Averous, J.; Tesseraud, S.; Skiba, S.; Panserat, S. Amino acids downregulate the expression of several autophagy-related genes in rainbow trout myoblasts. *Autophagy* **2012**, *8*, 364–375. [[CrossRef](#)]
42. Seiliez, I.; Gabillard, J.-C.; Skiba-Cassy, S.; Garcia-Serrana, D.; Gutiérrez, J.; Kaushik, S.; Panserat, S.; Tesseraud, S. An in vivo and in vitro assessment of TOR signaling cascade in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2008**, *295*, R329–R335. [[CrossRef](#)]
43. Lansard, M.; Panserat, S.; Plagnes-Juan, E.; Dias, K.; Seiliez, I.; Skiba-Cassy, S. L-leucine, L-methionine, and L-lysine are involved in the regulation of intermediary metabolism-related gene expression in rainbow trout hepatocytes. *J. Nutr.* **2011**, *141*, 75–80. [[CrossRef](#)]
44. Manifava, M.; Smith, M.; Rotondo, S.; Walker, S.; Niewczas, I.; Zoncu, R.; Clark, J.; Ktistakis, N.T. Dynamics of mTORC1 activation in response to amino acids. *Elife* **2016**, *5*, e19960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Gorissen, S.H.M.; Crombag, J.J.R.; Senden, J.M.G.; Waterval, W.A.H.; Bierau, J.; Verdijk, L.B.; van Loon, L.J.C. Protein content and amino acid composition of commercially available plant-based protein isolates. *Amino Acids* **2018**, *50*, 1685–1695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ketola, H.G. Requirement for dietary lysine and arginine by fry of rainbow trout. *J. Anim. Sci.* **1983**, *56*, 101–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



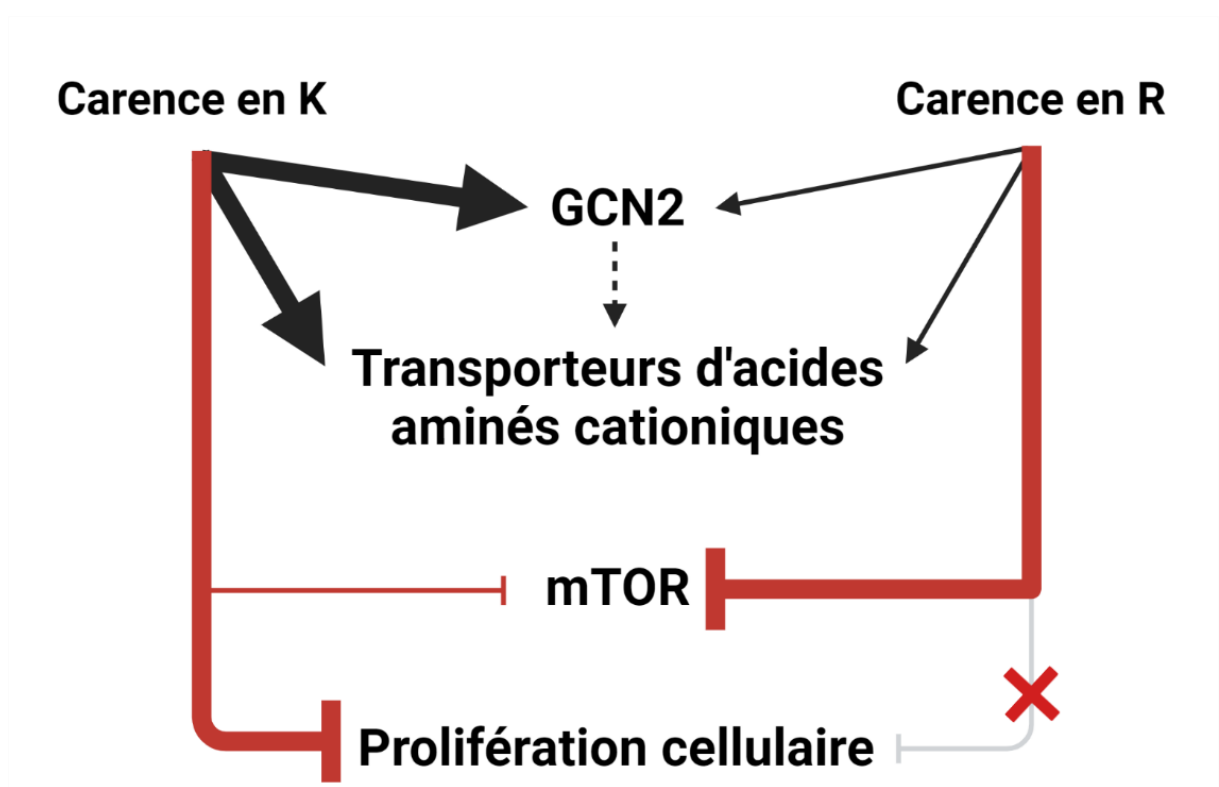


Second article : Les lignées cellulaires de truite, un modèle pertinent pour l'étude des régulations nutritionnelles : Focus sur les transporteurs d'acides aminés cationiques, les voies mTOR et GCN2

### Objectifs

Ce second article avait différents objectifs. Le premier était d'identifier, chez la truite arc-en-ciel, les gènes orthologues des différents transporteurs d'acides aminés cationiques connus chez les mammifères. Le second objectif était de déterminer si la carence en acides aminés induit la surexpression de certains des transporteurs d'acides aminés cationiques identifiés et si cette régulation était dépendante de la voie GCN2. Le dernier objectif, quant à lui, était d'évaluer les effets des carences en AAC seuls sur la signalisation cellulaire relative aux acides aminés, l'expression des transporteurs d'acides aminés cationiques et la prolifération des 3 lignées cellulaires étudiées.

### Principaux résultats



- Nous avons identifié chez la truite les gènes homologues de tous les transporteurs d'acides aminés cationiques connus chez les mammifères.
- La carence en acides aminés induit la surexpression de certains transporteurs d'acides aminés cationiques potentiellement *via* la voie GCN2.

- La carence spécifique en lysine et/ou arginine induit également la surexpression des transporteurs d'acides aminés cationiques parmi lesquels figurent principalement  $\gamma^+$ LAT2 et certains transporteurs de la sous famille des CATs.
- Nous avons démontré, pour la première fois dans un modèle poisson, que l'arginine est un activateur de la voie mTOR mais aussi que la lysine contribuerait également, faiblement mais significativement, à l'activation de cette voie.
- Enfin, et de façon surprenante, nous avons pu observer que la carence en arginine n'impacte pas la prolifération des cellules, contrairement à la carence en lysine.

## *Conclusion*

Suite à l'analyse des données transcriptomiques de 2 études indépendantes, nous avons observé une surexpression de CHOP, un marqueur de l'ISR, et de 2 TAACs,  $\gamma^+$ LAT2 et CAT2, chez des truites nourries avec des aliments végétaux malgré la supplémentation de ceux-ci avec des AAC libres. Nous émettions alors l'hypothèse que la surexpression de ces TAACs était induite via la voie GCN2 par une carence en AAC ressentie par les truites malgré leur ajout sous forme libre et que cela pourrait se traduire par un retard de croissance.

Après avoir identifié les différents orthologues des transporteurs d'acides aminés cationiques chez la truite, nous avons premièrement démontré que l'expression de certains d'entre eux dont  $\gamma^+$ LAT2 et des TAACs homologues de CAT2, est bien induite lors d'une carence en acides aminés. De plus la surexpression de ces TAACs induite par un activateur pharmacologique de GCN2 suggère fortement que la carence en AA induit la surexpression de ces TAACs via la voie GCN2. Finalement, nos résultats démontrent également que la carence en AAC est suffisante pour induire l'activation de la voie GCN2 ainsi que la surexpression des TAACS mais également pour réduire l'activation de la voie mTOR et la prolifération cellulaire. Ainsi, l'ensemble de nos résultats supportent notre hypothèse selon laquelle la supplémentation en AAC libres des aliments végétaux ne serait pas suffisante pour répondre aux besoins de la truite et induirait une carence qui provoquerait la surexpression des TAACs et réduirait la croissance des truites.

1 **Rainbow trout cell lines, a pertinent model for the study of nutritional-induced dysregulations:**  
2 **Focus on Cationic Amino Acid Transporters, GCN2 and mTOR pathways**

3 Guillaume Morin<sup>1</sup>, Karine Pinel<sup>1</sup>, Karine Dias<sup>1</sup>, Chloé Wayman<sup>1</sup>, Iban Seilliez<sup>1</sup> & Florian Beaumatin<sup>1,\*</sup>

4 <sup>1</sup>: Université de Pau et des Pays de l'Adour, E2S UPPA, INRAE, NUMEA, Saint-Pée-sur-Nivelle, France

5 \*: Correspondence: [florian.beaumatin@inrae.fr](mailto:florian.beaumatin@inrae.fr)  
6

7 **Abstract**

8 Amino acid transporters (AAT) control the cellular entry, or exit, of amino acids (AA), according to their  
9 nature and concentration, prior to ensure their multiple functions as building blocks for protein  
10 synthesis but also as precursors for most metabolic pathways and as signaling molecules. Thus, AAT  
11 significantly contribute to maintain cellular homeostasis which can therefore be lost following  
12 dysregulations of their expressions. Such dysregulations can be caused by several factors, notably by  
13 diets unbalanced in AA. In this study, we took advantage of the metabolic feature of rainbow trout  
14 cells, described to mainly rely on AA to sustain their needs, to study the AA-dependent dysregulations  
15 with a particular focus on cationic AAT (CAAT) as well as two major AA-sensing pathways called GCN2  
16 for General Control Nonderepressible 2 and the mechanistic Target Of Rapamycin (mTOR) pathways.  
17 Results obtained clearly evidenced more than 40 putative CAAT genes in trout genome, among which  
18 27 were found to be expressed in trout tissues while interestingly, the 3 cell lines tested expressed the  
19 same set of CAAT genes. Moreover, results demonstrated that part of these genes can be subjected to  
20 AA and CAA dependent regulations, certainly through GCN2-dependent mechanisms. Moreover, they  
21 highlighted the differences in GCN2 and mTOR pathway activations together with strong outcomes on  
22 cellular proliferation capacities with respect for the nature of the CAA considered. Altogether, through  
23 the use of RT cell lines, these results clearly demonstrated the dysregulations induced by diets  
24 unbalanced in their AA composition and brought insightful knowledge that could serve the aquaculture  
25 field as well as medical science.

26 **Key words**

27 Amino acid transporters, Nutrition, Metabolism, mTOR, GCN2, fish cell lines

28 **Introduction**

29 In most organisms, if not all, AA constitute basic, but crucial, molecules for life. The past decades have  
30 demonstrated that AA functions are not only supported by their roles as building blocks for protein  
31 synthesis but also by their abilities fueling numerous metabolic pathways as well as their capacities to  
32 control homeostasis as signaling molecules. Indeed, while most of the 20 natural proteinogenic AA  
33 serves as precursors for energy, nucleotide, lipid and glucose metabolisms [1], a significant proportion  
34 also bears signaling functions [2], directly [3,4] or indirectly through their related secondary  
35 metabolites [5,6]. For instance, the production of nitric oxide from arginine, a cationic AA (CAA),  
36 induces, among multiple signaling events, smooth muscle cells relaxation regulating vasodilatation  
37 events to maintain body temperature. Therefore, and beside the conventional classification of AA into  
38 essential (EAA), non-essential (NEAA) and conditionally essential (CEAA) AA, established on nutritional  
39 requirements determined only with respect for growth performances and/or nitrogen balance of  
40 species, the term "functional" AA has been recently introduced. It is defined as "those AA that  
41 participate in and regulate key metabolic pathways to improve health, survival, growth, development,  
42 lactation, and reproduction of the organisms" [7]. Thus, this new concept reshuffles the deck and shed  
43 new light on the countless functions supported by AA, whatever their direct outcomes on growth

44 performances, including, but not limiting to neurological, digestive, hormonal, anti-oxidant, immune  
45 or metabolic functions.

46 Conscious of the massive input of AA on cellular homeostasis and organism physiology, much efforts  
47 have been made by the scientific community to understand the molecular mechanisms controlling AA  
48 functions in cells. Among these, the absorption of AA has received a particular attention since it  
49 constitutes the first limiting step for an AA to get functional [8]. If amino acid transporters (AAT) were  
50 initially described and classified into 16 different systems [9] according to the nature of the AA  
51 transported (Neutral; Cationic or Anionic AA) together with their dependencies onto environmental  
52 conditions (e.g. pH or sodium), with technical advances made in molecular and genomic analysis, the  
53 landscape of AAT appeared to be even more complex since a greater number of AAT were identified  
54 in genome species [2]. For instance, more than 60 AAT genes, nowadays grouped in the super gene  
55 family of SoLute Carriers (SLC) based on sequence homologies, were identified in humans  
56 ([www.bioparadigms.org](http://www.bioparadigms.org)). When compared to the number of natural AA to uptake, this impressive  
57 number of different AAT witnesses the challenges required to maintain AA homeostasis in an organism  
58 especially when considering that all the organ or cell types do not display the same needs. Indeed,  
59 beside the need to fine tune, qualitatively and quantitatively, the AA fluxes across biological  
60 membranes, the large number of AAT also allows tissue specific expression as well as different  
61 intracellular location of AAT (such as mitochondria, plasma membrane or lysosomes) to finally support  
62 specific or ubiquitous cellular functions mentioned above. Accordingly, it is therefore no surprising that  
63 even a unique dysregulation of a said AAT expression can induce cellular disorders. Whether these  
64 dysregulations lead to a defect, or conversely, to a stimulation of AA absorption/excretion, most of  
65 them are associated with pathologies such as aminoaciduria, obesity, diabetes, tumorigenesis or  
66 cardiovascular diseases to name but a few. This exemplifies even more the complexities of the  
67 underlying mechanisms required to tightly control AAT expressions and functions in an organism to  
68 finally preserve homeostasis and keep cellular disorders at bay.

69 Among the concerns linked to the drifts of modern society leading to the above-mentioned  
70 pathologies, nutrition has received particular attention in recent years. Indeed, several studies have  
71 highlighted the need to reduce meat consumption [10] in order, for instance, to prevent the onset of  
72 cancers and cardiovascular diseases. As a consequence, veganism is a growing practice for which plant-  
73 based diets fully replace the consumption of any animal-derived products. If such practice has already  
74 shown to bring multiple benefits for human health [11], it should be followed according to specific  
75 “rules” established to notably attempt to overcome the so called “low quality protein” of plant based  
76 diets together with low plant protein digestibility. Indeed, it is known that, compared to animal  
77 proteins, plant proteins display an unbalanced AA composition for which methionine, lysine, arginine  
78 and threonine are frequently underrepresented, which could be amplified by the decrease of protein  
79 digestion caused by antinutritional factors brought in plant-based diets [12]. Therefore, if such  
80 negative criteria are no longer a matter of debate for human health, their contribution to metabolic  
81 dysregulations remains to clarify [13]. Interestingly, the replacement of animal proteins by plant  
82 proteins is not a topic restricted to human nutrition since it is, for ecological and economic reasons,  
83 also the main goal of the aquaculture of carnivorous fish. Indeed, the replacement of fishmeal (FM) by  
84 other protein sources in aquafeeds, among which plant proteins appear as the most convenient  
85 alternative, to preserve natural resources currently threatened by overfishing activities. Nonetheless,  
86 such replacement is not without consequences in fish biology since disorders are observed in  
87 carnivorous fish, such as Rainbow trout (RT - *Oncorhynchus mykiss*), fed 100% plant-based diets among  
88 which growth retardation and diabetes-like phenotypes. Since the metabolism of carnivorous fish  
89 mainly relies on dietary protein (45% of dietary protein required compared to the 15% in human food),  
90 and so on AA, part of the disorders observed are suspected to be caused by the “low quality” of plant

91 proteins. Therefore the use of RT could represent a new model to shed more light on the molecular  
92 mechanisms related to AA-induced dysregulations which could be tricky to consider at first sight in  
93 mammal models. For instance, following a careful analysis of transcriptomic sets of results performed  
94 in RT fed regular or plant-based diets published in two independent studies [14,15] , we noticed that  
95 *chop*, a target of the General Control Nonderepressible 2 (GCN2) pathway, previously described to get  
96 activated upon AA restriction conditions, was dysregulated in the latter group, together with 2 cationic  
97 AAT (CAAT) namely *cat2* (encoded by SLC7A2 gene) and *y+lat2* (a heterodimeric CAA exchanger  
98 encoded by SLC3A2 and SLC7A1 genes). Thus, we wondered if these dysregulations could reflect that  
99 plant-based diets do not cover well the metabolic requirements of fish with respect for CAA, despite  
100 being supplemented in their purified forms (according to the nutrients requirement established in fish  
101 [16]), or if they are due to other mechanisms of dysregulations. The former hypothesis was however  
102 supported by the fact i) the AA restriction-induced GCN2 activation is conserved and active in rainbow  
103 trout cells [17], ii) the activation of this pathway is described to derepress AAT expression, notably  
104 CAT1 (encoded by SLC7A1 gene) a homologue of CAT2, to favor AA absorption upon AA limiting  
105 conditions [18].

106 Therefore, investigations were performed in order to determine whether specific CAA restriction could  
107 affect transcriptional regulations of CAAT as well as two key AA-sensing pathways such as GCN2 and  
108 the mechanistic Target Of Rapamycin (mTOR) pathways known to control cellular homeostasis and  
109 proliferation. For such purpose, and in order to not bias the study, 2 important points had to be  
110 considered. First, it was essential to identify and characterize the whole sub-family of CAAT gene in  
111 trout, since, to the best of our knowledge, only a few CAAT were previously studied in RT. The aim was  
112 therefore to get a comprehensive understanding of the specific AA/CAA-dependent regulations of the  
113 CAAT in RT, to deepen our knowledge on the biology of RT, and by extension to other species, together  
114 with better characterizing underlying mechanisms responsible for plant-based diet induced disorders.  
115 Then, it seems particularly crucial to avoid post-prandial crosstalk in the AA-dependent AAT regulations  
116 since hormones and cytokines are known regulators of AAT expression. So, the use of RT cell lines  
117 appeared much convenient, besides important ethical considerations, because the use of *in vitro*  
118 approaches allow to perfectly control cellular environment by specifically depleting growing media  
119 with AA or CAA on-demand. Therefore, a full set of experimentations (including *in silico*, RTqPCR and  
120 western blot analysis as well as cell proliferation assays) has been conducted in 3 different cell lines  
121 available from the very rich RT invitrome [19]. One of these, RTgutGC cells, originate from the intestine,  
122 the main organ responsible for nutrient absorption (RTgutGC cells), while the 2 others are hepatic  
123 derived cell lines (RTH-149 and RTL-W1 cells), the liver being described as the most metabolically active  
124 organ. Results obtained clearly identified the family of CAAT expressed in adult trout tissues as well as  
125 demonstrated that part of these CAAT can be subjected to AA and CAA dependent regulations,  
126 certainly through GCN2-dependent mechanisms. Moreover, results obtained showed differences in  
127 GCN2 and mTOR pathway activations together with strong outcomes on cellular proliferation  
128 capacities with respect for the nature of the CAA considered. Last, but certainly not least, the use of  
129 the *in vitro* approach, through the characterization of 3 independent RT cell lines, revealed features  
130 that, beyond insightful knowledge gathered for agronomy, could also serve medical science, as later  
131 discussed.

132

## 133 **Materials and methods**

### 134 *Cell culture and treatments*

135 Experiments were performed in hepatic cell lines RTH-149 (ATCC® CRL-1710, LGC standards, Molsheim,  
136 France) and RTL-W1 as well as in the intestinal cell line RTgutGC. RTH-149 cells were grown at 18 °C  
137 and pH 7.4 in complete medium (CM) as described in our previous paper (Morin et al., 2020). RTgutGC  
138 and RTL-W1 cells were grown in Leibovitz's L-15 Medium containing essential (EAA), non-essential  
139 amino acids (NEAA) and sodium pyruvate from (11415-049) from Gibco (Thermo Fisher scientific,  
140 Waltham, MA, USA). This L-15 medium was supplemented with 100-units/mL penicillin and 100-µg/mL  
141 streptomycin (Gibco, #140656-056), 25 mM hepes (#BP299-1, Fisher Bioreagents, Fisher scientific SAS,  
142 Illkirch Graffenstaden, France) and 10 % fetal bovine serum (Gibco, #10270-106). This medium is  
143 hereafter referred as CM for experiments in RTgutGC and RTL-W1 cells.

144 Medium was replaced twice a week and cells were passaged at 80-90 % of confluence. Biological  
145 replicates for each experiments were performed with different passages. Prior to experiments, cells  
146 counted with Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience LLC, MA, USA) and plated in 6 cm diameter dishes  
147 for western blot (WB) and real time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis and in 12 well plates  
148 (#83.3921) from Sarstedt (Sarstedt, Marnay, France) for cell proliferation assays. RTH-149 and RTgutGC  
149 were plated at a density of 400,000 cells for WB and 500,000 cells for RTq-PCR whereas RTL-W1 were  
150 seeded at 700,000 cells for RT-qPCR. For cell proliferation assays, cells were plated at a density of  
151 70,000 for RTH-149, 40 000 for RTgutGC and 100 000 for RTL-W1 per wells in 3 technical replicates per  
152 condition and time point. Two days after seeding, cells were washed twice with PBS prior treatment  
153 according to experiments. In RT-qPCR experiments assessing effect of amino acids on gene  
154 transcription, cells were treated with CM or Hank's balanced salt solution (HBSS) (#14025-092, Gibco)  
155 supplemented with 25 mM hepes, supplemented (+AA) or not (-AA) with MEM amino acid solution  
156 containing all EAA (#11130-036), NEAA solution (#11140-050) and L-glutamine (#250030-081, Gibco).  
157 Halofuginone hydrobromide (HF) (#32481, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), a pharmacological  
158 inhibitor of prolyl-tRNA synthetase was added to CM at indicated concentrations to activate the GCN2  
159 pathway or not (CTRL). To assess the effects of arginine (R) and lysine (K) starvations on gene  
160 expression, we used R and K deprived MEM (#C4230.0500, Genaxxon Biosciences, Ulm, Germany) and  
161 L-15 (#C4061.0500, Genaxxon Biosciences). Both were supplemented with dialyzed FBS (#26400-044,  
162 Gibco), sodium pyruvate, penicillin and streptomycin as for CM. C4230 medium was also supplemented  
163 with 1 g/L D-glucose (#G8270, Sigma-Aldrich) and 25 mM hepes which are not included in this medium.  
164 100mg/L L-Lysine (#L5501, Sigma-Aldrich) was added to both media, L-arginine (#A5006, Sigma-  
165 Aldrich) was added at 84 mg/L in C4230 medium and 420 mg/L in C4061, or not to obtain our  
166 experimental conditions. For WB analysis, RTH-149 and RTgutGC cells were starved for 3 h and 5 h  
167 respectively with starvation medium to inactivate mTOR pathway prior treatments. Cells were treated  
168 with the same media described before for R and K starvation effect on gene expression but without  
169 addition of serum. For cell proliferation assays, C4061 medium supplemented with non-dialyzed serum  
170 (#10270-106, Gibco) was used for the 3 cell lines.

#### 171 *RNA extraction and RT-qPCR analyses*

172 For gene expression analysis experiments, RTH-149 and RTgutGC were treated for 24h and RTL-W1 for  
173 8 h. RNA was extracted and purified, after two wash with PBS, using a RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden,  
174 Germany) according to manufacturer's protocol. RNA concentration and integrity were assessed with  
175 a Nanodrop® ND1000 spectrophotometer. 1 µg of RNA was retrotranscribed using Superscript III  
176 RNaseH-reverse transcriptase kit (#18080-093, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with random primers  
177 (#C1101, Promega, Madison, WI, USA). Using a thermocycler, a first step of denaturation was  
178 performed (5 min at 65 °C) followed by RNA retro-transcription (5 min at 25 °C, 1 h at 55 °C) and  
179 inactivation at 70 °C during 15 min. RT-qPCR reactions were performed on the Roche Light Cycler 480  
180 system (Roche, Bâle, Switzerland) initiated at 95 °C for 10 min followed by 45 cycles of an amplification

181 program constituted of three phases (15 s at 95 °C, 10 s at 60°C, 15 s at 72 °C). RT-qPCR reactions were  
182 performed in triplicates comprising 2 µL of diluted cDNA at 1/40 for CAAT genes and 1/80 for others,  
183 3 µL of Light Cycler 480 SYBR® Green 1 Master (#, Roche), 0.76 µL of Water, Molecular Biology Grade  
184 (#BP2819-1, Fisher Bioreagents) and 0.12 µL (10 µM) of specific primers to studied genes. Primers for  
185 *ddit3*, *asns*, *xbp1*, *edem1* and *slc7a7* were validated in previous studies (Lansard et al., 2010) (Seiliez et  
186 al., 2016) (Séité et al., 2019) (To et al., 2019) and listed in Table 1. Primers for CAAT genes were newly  
187 designed and listed in Table 1. We searched for the different homolog genes for each known human  
188 CAAT using p-BLAST (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) in rainbow  
189 trout (RT) genome (Omyk\_1.0, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA).  
190 Primers were designed using Primer3 software for each RT paralogue when possible. Validation of  
191 primers was performed by assessing primer efficiencies by RT-qPCR in a pool of mRNA samples from  
192 liver, gut, muscle, kidney and ovary as well as a pool of mRNA from brain and hypophysis for SLC7A4  
193 and SLC7A14 homolog genes. Primers were validated when efficiency was comprised between 1,85  
194 and 2,15 and when RT-PCR product sequence obtained by DNA sequencing (Genewiz, Leipzig,  
195 Germany) corresponded to theoretical sequence of the mRNA targeted. The gene expression levels were  
196 presented as the relative quotient (RQ) calculated using the  $\Delta\Delta CT$  method.

#### 197 *Protein extraction and western blot analysis*

198 Cells were washed twice with ice-cold PBS prior to protein extraction using RIPA buffer (#89901,  
199 Thermo Scientific) supplemented with Halt protease and a phosphatase inhibitor cocktail (#78442,  
200 Thermo Scientific). Prior to centrifugation at 12,000x *g* at 4 °C, proteins samples were conserved on  
201 ice during 30 min. Following protein extraction, determination of protein concentration in samples  
202 were performed using the Bicinchoninic Acid Kit (#BCA1-1KT, Sigma-Aldrich). Protein samples were  
203 mixed with Laemmli buffer and subjected to electrophoresis with sodium dodecyl sulfate  
204 polyacrylamide gel (SDS-PAGE) prior to transfer onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane  
205 (#IFPL00010, Merck Millipore, Burlington, MA, USA). Membranes were finally immunoblotted using  
206 the following primary antibodies directed against  $\beta$ -tubulin as a loading control and mTOR pathway  
207 targets : anti-ribosomal protein S6 (#2217), anti-phospho-S6 (Ser235/Ser236, #4856), anti-phospho-  
208 4EBP1 (Thr37/Thr46, #9459), anti-4EBP1 (#9452) all provided by Cell Signaling Technologies (Danvers,  
209 MA, USA). A part of the experiment analysis was performed using infrared fluorescence as described  
210 in our previous paper (Morin et al., 2020). The other part was analyzed using chemi-luminescence.  
211 Membranes were incubated with HRP-labeled goat anti-rabbit IgG secondary antibody (#31460,  
212 Thermo Fisher Scientific) and washed with PBS prior incubation in Supersignal™ West Pico Plus  
213 Chemiluminescent Substrate (#34580, Thermo Fisher Scientific) following manufacturer's protocol.  
214 Chemiluminescence signal was finally acquired using iBright 1500 imager (Thermo Fisher Scientific).  
215 Immunoblot for total S6, 4EBP1 and  $\beta$ -tubulin were performed after membrane stripping with  
216 Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer (#4630, Thermo Fisher Scientific). All WB data were  
217 quantified using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA). Data are presented as ratio of  
218 phosphorylated protein normalized on  $\beta$ -tubulin.

#### 219 *Cell proliferation assays*

220 Two days after incubation of cells in CM (Day 0) and at different indicated time points cells were  
221 washed with PBS and counted using Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience LLC) and ViaStain™ AOP1  
222 Staining Solution (Nexcelom Bioscience LLC) following manufacturer's indications. Counting was  
223 performed for 3 technical replicates with 3 individual wells for each condition and time point. For each  
224 biological replicate data are presented as the mean of cell numbers counted in technical triplicates  
225 normalized on the cell number counted at Day 0.



## 226 *Statistical analysis*

227 Values presented are means  $\pm$  S.E.M. Number of biological replicates (*N*) is indicated for each  
228 experiment in figure legends. Normality was assessed individually for each condition using Shapiro-  
229 Wilk test ( $P > 0.05$ ). Then differences between conditions were tested using one-way ANOVA-Tuckey's  
230 post-hoc test when data sets passed normality test or Kruskal-Wallis Dunn's post-hoc test. For cell  
231 proliferation assays, one-way ANOVA Dunnett's post-hoc test was used to see differences between R  
232 and K starvation conditions and complete medium condition.

233

## 234 **Results**

### 235 *In silico identification of the whole sub-family of CAAT genes and validation of their expressions in RT* 236 *tissues and cell lines.*

237 As previously mentioned, when compared to mammals, RT undergone 2 supplementary WGD events,  
238 namely the teleost specific- (TGD) and salmonid specific- genome duplication (SGD), during evolution  
239 which were already proved to considerably increase the number of paralogs for a given mammal gene  
240 [20]. Thus, we performed an *in silico analysis* to identify all the CAAT genes present in RT genome on  
241 the basis of protein homology sequences to human CAAT. Interestingly, results presented in Figure 1A,  
242 showed that for each of the 16 human CAAT genes, at least one paralog has been found in RT genome,  
243 with *y+LAT2* displaying up to 5 paralogs. Among the 42 CAAT paralogs identified in RT genome, analysis  
244 also revealed strong disparities in homology sequences with respect for their human counterpart, with  
245 some RT CAAT paralogs being well conserved (e.g. *y+lat1*, *slc7a14* and *y+lat2* paralogs constitute the  
246 Top3 of the most conserved CAAT in RT genome) while others show low sequence conservation, with  
247 *slc3a2* paralogs as the less conserved RT CAAT-related paralogs. Since, it was also shown that all  
248 duplicated genes are not expressed or functional in RT [20], RTqPCR analysis of individual paralog  
249 expression levels were performed in the main RT tissues (including gut, liver, kidney, muscle, brain and  
250 ovary) to evaluate which paralog is found expressed in adult trout (Figure 1B). As a result, and with the  
251 unique exception of ORNT2 transporter (encoded SLC25A2 gene in human), 27 RT CAAT genes were  
252 found to be expressed with at least one paralog of each human CAAT ortholog. It is noteworthy  
253 mention that, according to previous estimation that around 50% of duplicated genes are expressed in  
254 RT trout, the number of paralog found to be expressed in RT tissue is consistent with this value. Finally,  
255 the characterization of the 3 RT cell lines used for this study, namely RTH-149, RTL-W1 and RTgutGC  
256 cells, for their expressions of RT CAAT paralogs were conducted. Since some CAAT are known to be  
257 expressed in a tissue-specific manner, we consistently observed that only a set of CAAT was expressed  
258 in the 3 RT cell lines. Nonetheless, 2 important information were gathered from these analysis. First of  
259 all, none of the 3 *cat2* paralogs expressed in RT tissues were detected in the RTH-149 (Figure 1C),  
260 RTgutGC (Figure 1D) and RTL-W1 (data not shown) cell lines, even in the 2 hepatic derived cell lines  
261 while, in mammals, CAT2 isoform A is supposed to be specifically expressed in the liver. Moreover, a  
262 broader analysis revealed that the 3 cell lines expressed the same and exact CAAT paralogs while they  
263 originate from different tissues (liver and intestine) as well as they were established following either  
264 "natural" immortalization (RTH-149 cell line comes from a RT hepatoma) or independent *ex vivo*  
265 immortalization protocols (RTL-W1 and RTgutGC cells were immortalized through serial passages of  
266 primary cell cultures obtained from 2 independent fish at 2 different times and in 2 different  
267 laboratories. Obviously, the hypothesis that the CAAT paralogs could be expressed following specific  
268 stimulations, not yet tested, cannot be ruled out, but another hypothesis, later discussed, seem to be  
269 also very likely. Altogether, this particular feature of these 3 cell lines offered an opportunity to study  
270 the nutritional regulations subjected to the 16 RT CAAT genes, identified in RT genome for the most

271 part in this present study, in 3 independent cell lines allowing therefore to decipher universal CAAT  
272 regulatory mechanisms from cell line-dependent mechanisms.

273 *Total amino acid starvation induced the de-repression of identical CAAT paralogs in the 3 cell lines*  
274 *tested*

275 As previously mentioned, we hypothesized that plant-based diets do not cover well the AA metabolic  
276 needs of RT despite being supplemented with AA to re-balance the lack of certain AA in plant protein  
277 amino acid compositions. This would therefore lead to the activation of the AA-sensing GCN2 pathway  
278 known to promote the repression of general protein synthesis together with the upregulation of GCN2-  
279 target genes involved notably in AA synthesis and transport. Based on knowledge gathered from the  
280 previous characterization of RTH-149 cells for the AA-induced GCN2 activation, we conducted similar  
281 experiments in RTH-149, RTL-W1 and RTgutGC cells with respect, this time, for the outcomes of total  
282 AA starvation on the expression levels of CAAT paralogs in RT. Results shown in figure 2 (and  
283 supplementary figure S1) confirmed in the 3 cell lines tested that, as previously described in other  
284 organisms, part of RT CAAT paralogs are specifically regulated by AA. Indeed, *4f2hc d*, *cat1 a-b*, *cat3a*  
285 and *cat3d* paralogs showed similar expression profiles in RTH-149 (Figure 2A), RTgutGC (Figure 2B) and  
286 RTL-W1 cells (Supplementary figure 1) for which significant up-regulations were measured upon  
287 starvation condition (-AA) while these up-regulations were abolished (totally or partially) by the unique  
288 supply of total AA. Interestingly, *y+lat2* paralogs b or c showed similar profiles but only RTH-149 and  
289 RTL-W1 cells, suggesting that these 2 paralogs are tightly regulated by AA availability in liver-derived  
290 cell lines and by extent in RT liver. Finally, when other RT CAAT paralogs were assessed (supplementary  
291 figure S2), only *ornt1 c*, a mitochondrial CAAT notably involved in urea cycle, showed a specific AA-  
292 dependent response in the 3 cell lines tested while other paralogs displayed responses to AA  
293 availability that appeared to be cell line specific. Altogether, these results corroborated previous  
294 observations made in other species and confirmed that, in RT cells, some specific CAAT paralogs are  
295 up-regulated following AA starvation,

296 *GCN2 activation leads to the up-regulation of some RT CAAT paralogs*

297 Based on our working hypothesis for which plant-based diets would induce GCN2 activation through  
298 an unbalanced AA composition, together with first results from this study, the involvement of the  
299 GCN2 pathway in the up-regulation of RT CAAT paralogs was assessed in the 3 cell lines tested. To do  
300 so, cell lines were grown in presence of halofuginone hydrobromide (HF), a GCN2 activator already  
301 described to be effective in RTH-149 cells [17], and then RT CAAT paralogs expression levels were  
302 measured by mean of RTqPCR analysis. Interestingly, all the RT CAAT paralogs previously identified to  
303 be specifically regulated by AA availability were also observed to be significantly up-regulated upon HF  
304 treatments in the 3 cell lines tested (Figure 3, Supplementary Figure S3 and S4). However, 2 different  
305 expression profiles, exemplified by *4f2hc b* and *c* paralogs, were observed, suggesting different  
306 regulatory mechanisms according to the strength of GCN2 activation. Indeed, it was described that  
307 strong GCN2 activation led to a massive up-regulation of *chop* gene therefore involved in a negative  
308 feedback loop in charge to dampen cell survival GCN2 response and finally, according to previous  
309 studies, to promote cell death. In this regard, *4f2hc d*, *cat3a* and *cat3d* paralogs (and *y+lat2 b* when  
310 considering RTH-149 cells response) displayed an up-regulation upon moderate GCN2 activation (100  
311 nM HF) while an increase in HF concentration (1000 nM) led to a repression of this activation. On the  
312 other hand, all other CAAT observed to be positively regulated by HF followed expression levels  
313 gradually increasing with increase in HF concentrations. In the meantime, the HF-induced GCN2  
314 activation pathway was confirmed in the 2 previously uncharacterized cell lines used in this study  
315 (RTgutGC and RTL-W1 cells) by measuring previously established GCN2 target genes in RT, namely  
316 *chop*, *asns*, *xbp1* and *edem1* genes (supplementary Figure S5). Since the 3 cell lines displayed

317 conventional responses to HF treatments, altogether, results obtained clearly demonstrated that RT  
318 CAAT paralogs up-regulated following AA starvation were also prone to be regulated by the AA  
319 starvation-induced GCN2 activation. Moreover, the fact that RT CAAT paralogs displayed different  
320 expression patterns according to the strength of the GCN2 pathway activation constitutes another  
321 observation that could help to refine, *in vivo*, the evaluation of plant-based diets for their abilities to  
322 meet the AA metabolic requirements of RT.

### 323 *Arginine and/or Lysine starvation are enough stimuli to activate GCN2 and promote RT CAAT paralog* 324 *up-regulations*

325 Based on 2 independent observations for which fish fed plant-based diets displayed GCN2 activation  
326 (evidenced by the up-regulation of *chop*) as well as the induction of CAAT paralogs (genes  
327 demonstrated from now on to be up-regulated upon AA starvation and/or GCN2 activation) and  
328 knowing that both diets were supplemented with Arginine (R) and/or Lysine (K), two CAA, we  
329 wondered if, actually, the CAA supplementations mentioned were not covering efficiently fish  
330 metabolic needs, leading to the dysregulations observed for the GCN2 pathway and CAAT paralog  
331 expressions. To address these two related questions, we therefore grown cells in media either  
332 depleted for R or K alone or for both prior analyzing the outcomes of such starvations on the activation  
333 of the GCN2 pathway (Figure 4). Results showed that, although RTH-149 cells activated the GCN2  
334 response in similar ways whether R, K or both CAA were missing (demonstrated by *chop*, *asns* and *xbp1*  
335 gene up-regulations (Figure 4A)), RTgutGC cells were shown to be insensitive to R starvation since only  
336 conditions depleted for K induced GCN2 activation (Figure 4B). Finally, similar starvation conditions  
337 only allowed to detect a very moderate activation of the GCN2 pathway (through *chop* up-regulation)  
338 in RTL-W1 cells deprived of both CAA (Supplementary Figure S6). Altogether, and besides confirming  
339 that RTL-W1 cells are less prone to activate GCN2 when compared to the 2 other cell lines, these  
340 results corroborated initial thoughts for which R and/or K starvation are enough stimuli capable to  
341 activate the GCN2 pathway.

342 Further investigations were therefore conducted to evaluate how RT CAAT paralogs were also  
343 subjected to transcriptional regulations upon single or double CAA restriction conditions. Consistently  
344 with the previous results obtained, we observed that all the RT CAAT paralogs, found to be regulated  
345 upon AA starvation (Figure 2) and/or pharmacological activation of GCN2 (Figure 3), were qualitatively  
346 and quantitatively up-regulated in the 3 cell lines tested with respect for the activation status of the  
347 GCN2 pathway in R, K or both CAA starvation conditions considered (Figure 5 and Supplementary  
348 Figure S7). For instance, in RTH-149 cells deprived from R, a condition observed to induce the activation  
349 of the GCN2 in this cell line, *4f2hc b*, *4f2hc d*, *y+lat2 b*, *cat1 a-b*, *cat3 a* and *cat3 d* expression levels  
350 were all significantly increased when compared to growing conditions containing R and K (Figure 5A).  
351 On the other hand, in RTgutGC cells which showed no sensitivity of the GCN2 pathway for R starvation,  
352 none of these transporters were up-regulated, conversely to up-regulations measured in K starvation  
353 conditions (Figure 5B). Moreover, results obtained in RTL-W1 cells further confirmed these results  
354 (Supplementary Figure S7). Indeed, this cell line showed to display mild GCN2 activation levels upon  
355 AA starvation or HF conditions, weak, but significant, up-regulations of the aforementioned RT CAAT  
356 paralogs were measured with the unique exception of *cat1 a-b* paralogs, eventually reflecting the  
357 relationship between CAAT paralog up-regulations and the strength of GCN2 activation. Finally, when  
358 considering RTH-149 and RTL-W1 cells and among the other CAAT paralogs, only *ornt1 c* paralog,  
359 described to be regulated by AA starvation and HF treatments showed consistent up-regulations with  
360 respect for the GCN2 activation status measured in both cell lines (Supplementary Figure S8).  
361 Altogether, these results clearly established correlations between RT CAAT paralogs, CAA restriction

362 conditions and GCN2 activation, strongly suggesting, if not demonstrating, that part of the RT CAAT  
363 sub-family of genes is regulated by CAA availability in a GCN2 dependent manner.

364 *CAA starvation impaired mTOR pathway activation but only K starvation led to defects in cell*  
365 *proliferation*

366 Since all the results obtained so far corroborated the hypothesis for which plant-based diets,  
367 supplemented with CAA, do not meet CAA metabolic requirements of RT well and because plant-based  
368 diets were also described to induce a growth retardation, outcomes of CAA restriction on RT cell lines  
369 were assessed at molecular and cellular levels. To do so, the mTOR pathway, a key anabolic signaling  
370 pathway controlling organism size and weight through cellular growth and proliferation, received a  
371 particular attention. Indeed, the activation of this serine/threonine kinase, known to promote lipid,  
372 carbohydrate, nucleotide and protein synthesis to sustain cell growth and proliferation, has been  
373 shown to be regulated by AA availability. Conscious that RT relies mainly of AA to sustain its  
374 metabolism, it was a surprise to notice that only leucine and methionine have been studied for their  
375 capacities to activate mTOR in this species while R (as well as glutamine) was also described to regulate  
376 this pathway. Moreover, since different mechanisms, involving notably a CAAT, encoded by SLC38A9  
377 gene, have been proposed to contribute to the R-induced mTOR activation, we wondered how CAA  
378 starvation conditions, and their associated dysregulations, would impact the activation of this  
379 pathway. Considering the differences observed in between RTH-149 and RTgutGC cell lines for their  
380 GCN2 responses following single R or K starvation, mTOR activation levels were assessed in these 2 cell  
381 lines grown in absence of R or K and compared to the levels measured in presence of both CAA (Figure  
382 6). Western blot analysis revealed that, in both cell lines tested, when cells were grown in media  
383 containing all AA, including R and K (+R+K), phosphorylation levels of S6 and 4EBP1 proteins, 2 mTOR  
384 targets, were significantly increased compared to levels measured upon starvation conditions (None)  
385 used prior treatments to inactivate mTOR. Interestingly, RTH-149 cells only deprived of R showed a  
386 marked decrease in Phospho-S6 level and moderate, but still significant, decrease of Phospho-4EBP1  
387 levels indicating that R promotes mTOR activation in RT (Figure 2A). It is important to notice that if  
388 phospho levels of these 2 mTOR activation markers do not drop to levels observed upon starvation  
389 conditions, it could be explained by the presence of other AA known to regulate mTOR activation (such  
390 as leu, met or gln) into the media as well as by differences of the AA-induced phosphorylation and  
391 dephosphorylation kinetics of S6 and 4EBP1 already described in RTH-149 cells. Nonetheless, despite  
392 that unique K starvation of cells induced a very moderate effect on mTOR activation when compared  
393 to R starvation, phosphorylation levels observed were still significantly different from full AA  
394 conditions, suggesting that, in RT species, K could also be sensed by the mTOR regulators. Meanwhile,  
395 experiments were also performed in RTgutGC cells, leading to similar general conclusions for which  
396 the lack of R alone strongly impaired mTOR activation while K starvation had moderate effect on mTOR  
397 activation levels (Figure 2B). Altogether, these results showed, for the first time in trout, that both  
398 CAA are sensed by the mTOR pathway and positively contribute to its activation in different  
399 proportions depending on the CAA and cell lines considered.

400 Finally, based on all the data accumulated so far, we wondered whether such a deprivation of CAA  
401 would not profoundly influence the physiology of the cells, in particular with regard to their capacity  
402 to proliferate, a characteristic displayed by a delay in the growth of fish fed with plant-based diets.  
403 Accordingly, cell proliferation curves were established for 9 days while cells were grown in full AA  
404 containing media depleted or not for R or K. As a result, RTH-149 (Figure 7A), RTgutGC (Figure 7B) and  
405 RTL-W1 cells (Supplementary Figure S9) did not shown any proliferative delay when deprived from R,  
406 compared to cell proliferation measured upon full AA containing media. On the other hand, K  
407 starvation strongly and significantly impaired cell proliferations which were limited to slight increase

408 in proliferation certainly caused by the minimal supply of AA contained in fetal bovine serum. These  
409 observations, later discussed, were particularly stunning since both CAA were described as EAA in RT,  
410 so, as observed upon K starvation, it was expected that R starvation would also induce a cell  
411 proliferation arrest. These results demonstrated that RT cell lines are genetically equipped and  
412 functional for the *de novo* synthesis of arginine, therefore questioning, when extrapolating these  
413 results to RT physiology, about the existence of tissues with sparse *de novo* R synthesis capacities and  
414 therefore responsible for trout growth limitation observed upon nutritional R restriction conditions.

## 415 **Discussion**

416 This study was initiated following the observations that plant-based diets induce dysregulations in RT,  
417 notably of CAAT genes, while these dysregulations could be related to unbalanced plant protein AA  
418 compositions. Therefore, the full set of CAAT genes was identified for the first time in the RT complex  
419 genome, allowing subsequently, the comprehensive identification of expressed CAAT genes in trout  
420 tissues. Consequently, the nutritional regulations of CAAT paralogs according to AA- and CAA specific  
421 availability were determined by means of convenient *in vitro* approaches using 3 independent RT cell  
422 lines. Results undeniably revealed that a sub-set of CAAT genes is subjected to GCN2 pathway  
423 regulations when pharmacologically activated and by AA specific- or CAA specific-starvation  
424 conditions. The study of single CAA starvation conditions, through the use of either R or K depleted  
425 media, demonstrated that cells do not respond in similar ways to R or K starvation in terms of GCN2  
426 activation and mTOR inhibition. Indeed, when K starvation induced GCN2 activation and moderate  
427 mTOR inhibition in all cell lines tested, almost opposite conclusions could be drawn from R starvation  
428 conditions which led to a strong inhibition of mTOR pathway while the GCN2 pathway was not  
429 activated in 2 cell lines out of the 3 tested. Finally, outcomes of R or K single starvation on cellular  
430 proliferation revealed that cells were not affected by R starvation while K starvation almost stopped  
431 cell proliferation. As a whole, this study further deepened our understanding of dysregulations induced  
432 by alternative diets used to feed farmed fish. Indeed, while most studies considered that  
433 supplementing plant-based diets with purified AA is sufficient to cover AA theoretical needs of fish and  
434 therefore explore other likely hypothesis responsible for the plant-based diet induced growth  
435 retardation, the combination of data gathered from this study and others tend to demonstrate that  
436 plant-based diets still need further improvements to definitively close the chapter of AA-induced  
437 dysregulations.

438 For instance, according to results obtained within single CAA starvation conditions, future experiments  
439 determining the best R:K ratio for fish requirement, instead of considering CAA individually, will be of  
440 great interest. Indeed, results obtained tend to demonstrate that R controls more the activation of  
441 anabolic process (notably through mTOR) than K does, while the lack of K would be more prone to  
442 activate catabolic and survival processes (notably through GCN2 pathway). As a consequence, knowing  
443 that R and K compete for their uptake with the same CAAT, not considering R:K ratios in plant-based  
444 diets could result in the loss of homeostasis that is normally preserved following a tight balance between  
445 anabolism and catabolism. This statement is further supported by other negative side effects observed  
446 in fish fed vegetal meals. Indeed, hypercholesterolemia is one of the features harbored by fish fed  
447 vegetal meals [21] while variation of R:K ratios are described in rats to notably regulate  
448 hypercholesterolemia [22]. Moreover, mTOR has been recently shown to be activated by lysosomal  
449 cholesterol through a mechanism involving the AA transporter called SLC38A9 [23] described to be  
450 activated by CAA [24–26]. As a consequence, an unbalanced R:K ratio could fairly contribute to the  
451 dysregulation of lipid metabolism, especially cholesterol synthesis. Another example is related to the  
452 diabetes-like phenotypes of trout fed with vegetal meals. For a long time, trout, like most carnivorous  
453 fish, is described as a poor user of carbohydrate in which excess of dietary carbohydrates lead to a

454 sustained hyperglycemia together with the onset of physiological disorders among which lipid  
455 accumulation in flesh and liver. Many reasons could fairly explain part of this phenotypes, but those  
456 implicating R:K ratios are not to be overlooked. Indeed, bundles of arguments support this hypothesis,  
457 the main of which are listed hereafter. First, R is known to promote glucose-induced insulin secretion  
458 in mammals [27]. Then, in trout, it has been shown that insulin secretion kinetic follows post-prandial  
459 increase of aminoacidemia together with mTOR signaling activation [28], as it is expected to happen  
460 in earlier developmental stages of mammals [29]. Moreover, the observation that the increase in  
461 dietary carbohydrate to protein ratios prompt trout to dysregulations which are accompanied by  
462 mTOR activation defects [30] combined to the fact that vegetal meals worsen the glucose intolerance  
463 of trout, the hypothesis for which unbalanced R:K ratios in plant-based diets substantially contribute  
464 to diabetes-like disorders observed in RT appears even more likely. Moreover, and finally, the  
465 involvement of AAT in insulin secretion and signaling being clearly established in mammals [31],  
466 together with their role in crosstalk between mTOR signaling and insulin sensitivity [32], further  
467 support the hypothesis that plant-based diets induced dysregulations of CAAT might significantly  
468 contribute to the onset of disorders related to glucose metabolism. Altogether, the use of RT cell lines  
469 appears as a credible model to study the outcomes of unbalanced AA composition of low quality  
470 protein, such as plant proteins, on nutritional-induced dysregulations in fish but also in humans since  
471 both species display similar disorders when AA needs are not fully covered.

472 Finally, the use of RT cell lines to decipher molecular events related to fish nutrition, besides to prove  
473 being a powerful tool to identify and study nutritional regulation of trout gene expression, also brought  
474 insightful observations that could be of great interest as a new cellular model for cancer research.  
475 Cancer, one of the most important hotspot in medical science, is the general term used to refer to  
476 different pathologies which all begin with the transformation of “healthy cells” through a complex set  
477 of dysregulations induced by genomic rearrangements and mutations to finally confer excessive  
478 proliferation rates to these abnormal cells. To study such diseases, various organisms have been used  
479 to develop useful models to understand mechanisms dysregulated in cancer cells such as mouse, rat,  
480 dog and pig models. Nonetheless, cancer research is not restricted to mammal models since other  
481 species bring significant knowledge in this active field such as *Schizosaccharomyces pombe* (yeast),  
482 *Drosophila melanogaster* (Fruit fly), *Caenorhabditis elegans* (nematode) and *Danio rerio* (Zebrafish)  
483 [33]. Because RT possesses specific characteristics [34], it is also considered as a potent model to study  
484 cancer especially when taking into account the relative ease to assess, at very high order of magnitude  
485 [35], dose-response of carcinogen agents. Another useful characteristic of RT cells is their relative ease  
486 to spontaneously immortalized *ex vivo* [19] following processes not fully characterized yet. Thus, it is  
487 basically believed that any cell type from trout can be immortalized, which is supported by the fact  
488 that, among more than 700 fish cell lines established from more than 160 different species (Cellosaurus  
489 resource of knowledge, Expassy), RT is by far the most represented species with more than 60 cell lines  
490 (established from more than 16 different tissues) so far, while common carp and zebrafish complete  
491 the podium with 32 and 29 cell lines respectively. Altogether, RT specificities could represent a great  
492 opportunity to decipher the earlier steps leading to cell transformation by means of primary cell  
493 culture immortalization. But, to prove being a good model for cancer research, RT cell line  
494 transformation should share at least some of the main characteristics of human cancer cells. In line  
495 with this, the present study might constitute a former observation demonstrating that, with respect  
496 for CAAT, RT cell lines seem to express the same CAAT genes described to be overexpressed in more  
497 than 900 human cancer cell lines [2,36]. For instance, while hepatocytes are supposed to mainly rely  
498 on CAT2, but not  $\gamma$ -LAT2, for CAA uptake upon physiological conditions, both RTH-149 and RTL-W1 cell  
499 lines showed no expression of CAT2 but a significant expression of  $\gamma$ -LAT2 gene, believed to constitute  
500 the minimal set of AAT expressed in human cancer cells to sustain their proliferation. Moreover, when

501 considering the 3 cell lines independently, it was a surprise to notice that all of them express the same  
502 set of CAAT, even at the level of paralog identities for a given CAAT, while they originate from different  
503 tissues (liver and intestine) from independent animals. Together, and knowing that RTH-149 cells  
504 derived from an hepatoma while RTL-W1 and RTgutGC cells were established from spontaneous  
505 immortalization of primary cells, this is another argument that tend to demonstrate that *ex vivo*  
506 immortalization of RT primary cells follow similar rules of transformation-induced carcinogenesis in  
507 trout, and by extension, when considering CAAT expression, of human cancer cells. Future experiments  
508 to further characterize RT cell lines will certainly allow the identification of more common features  
509 shared between RT cell lines and human cancer cells prior to use RT cell immortalization as a tool to  
510 unravel early molecular events responsible for cell transformation.

511 Altogether, these results not only provide useful knowledge about the biology of trout or even for the  
512 aquaculture field with the improvement of new diet formulations required to sustain carnivorous fish  
513 production, but, more broadly, they also offer new models and topics related to various pathologies  
514 such as hypercholesterolemia, diabetes and cancer.

515

516 **Author Contributions:** “Conceptualization, F.B. and I.S.; methodology, F.B., I.S., G.M. and K.P.; validation, F.B.,  
517 I.S., G.M. and K.P.; formal analysis, K.D., G.M., CW and K.P.; investigation, K.D., G.M., CW and K.P.; resources,  
518 F.B. and I.S.; data curation, G.M.; writing—original draft preparation, F.B.; writing—review and editing, F.B., I.S.,  
519 K.D., G.M., CW and K.P.; visualization, F.B., G.M. and I.S.; supervision, F.B. and I.S.; project administration, F.B.  
520 and I.S.; funding acquisition, F.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript”.

521

522 **Funding:** This research was funded by the ANR JCJC (grant number ANR19-CE20-0003-01) and the “Université de  
523 Pau et des Pays de l’Adour” through a junior chair project supported by the Energy Environment Solutions (E2S  
524 UPPA) as well as the Aquaexcel3.0 project from Horizon Europe.

525

526 **Acknowledgments:** We deeply acknowledge the laboratory of K. Schirmer from the EAWAG institute for the  
527 transfer of RTL-W1 and RTgutGC cell lines.

528 **Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

529

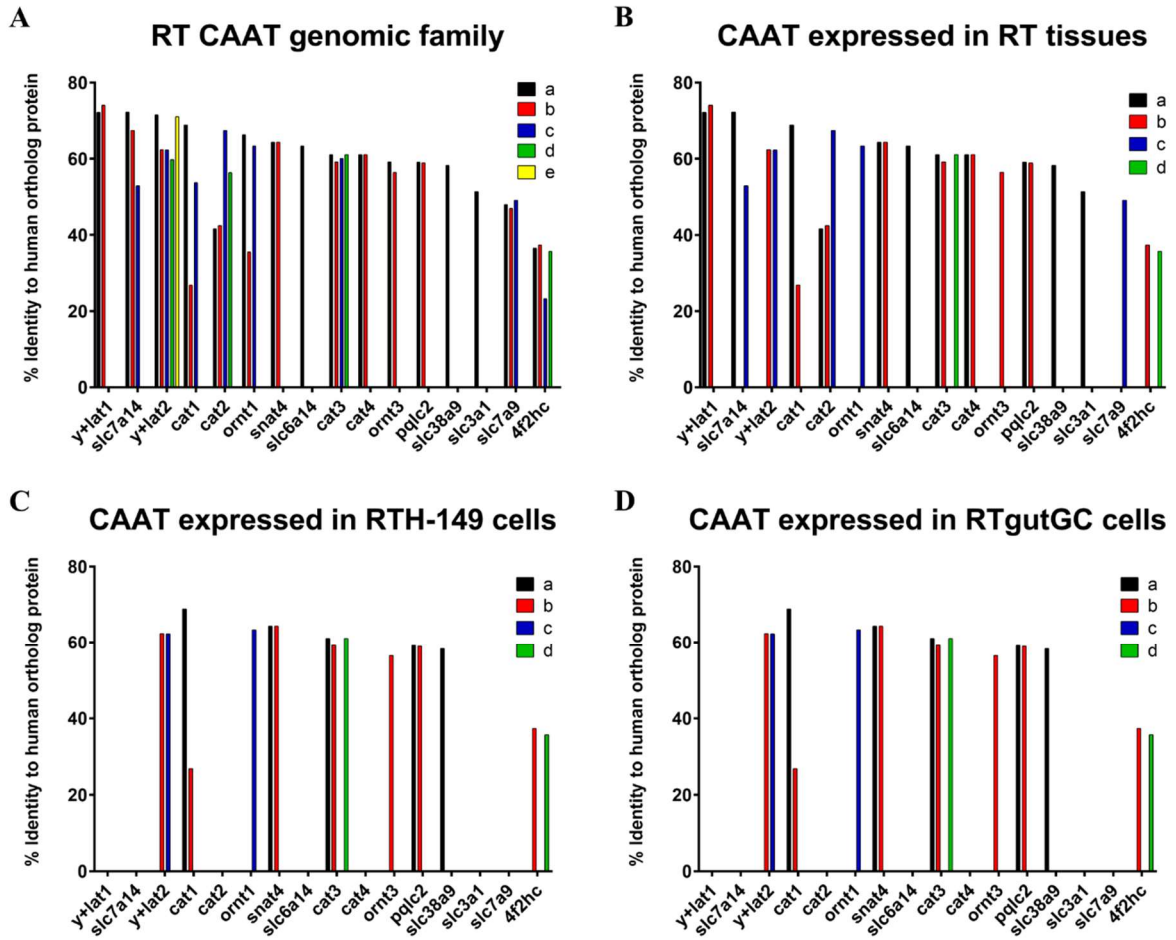
## 530 Bibliography

- 531 1. Krebs, H.A. CHAPTER 5 - The Metabolic Fate of Amino Acids. In *Mammalian Protein*  
532 *Metabolism*; Munro, H.N., Allison, J.B., Eds.; Academic Press, 1964; pp. 125–176 ISBN 978-1-  
533 4832-3209-6.
- 534 2. Bröer, S.; Bröer, A. Amino Acid Homeostasis and Signalling in Mammalian Cells and Organisms.  
535 *Biochem J* **2017**, *474*, 1935–1963, doi:10.1042/BCJ20160822.
- 536 3. Wolfson, R.L.; Chantranupong, L.; Saxton, R.A.; Shen, K.; Scaria, S.M.; Cantor, J.R.; Sabatini, D.M.  
537 Sestrin2 Is a Leucine Sensor for the MTORC1 Pathway. *Science* **2016**, *351*, 43–48,  
538 doi:10.1126/science.aab2674.
- 539 4. Chantranupong, L.; Scaria, S.M.; Saxton, R.A.; Gygi, M.P.; Shen, K.; Wyant, G.A.; Wang, T.;  
540 Harper, J.W.; Gygi, S.P.; Sabatini, D.M. The CASTOR Proteins Are Arginine Sensors for the  
541 MTORC1 Pathway. *Cell* **2016**, *165*, 153–164, doi:10.1016/j.cell.2016.02.035.
- 542 5. Gu, X.; Orozco, J.M.; Saxton, R.A.; Condon, K.J.; Liu, G.Y.; Krawczyk, P.A.; Scaria, S.M.; Harper,  
543 J.W.; Gygi, S.P.; Sabatini, D.M. SAMTOR Is an S-Adenosylmethionine Sensor for the MTORC1  
544 Pathway. *Science* **2017**, *358*, 813–818, doi:10.1126/science.aao3265.
- 545 6. Durán, R.V.; Oppliger, W.; Robitaille, A.M.; Heiserich, L.; Skendaj, R.; Gottlieb, E.; Hall, M.N.  
546 Glutaminolysis Activates Rag-MTORC1 Signaling. *Mol Cell* **2012**, *47*, 349–358,  
547 doi:10.1016/j.molcel.2012.05.043.

- 548 7. Wu, G. Functional Amino Acids in Nutrition and Health. *Amino Acids* **2013**, *45*, 407–411,  
549 doi:10.1007/s00726-013-1500-6.
- 550 8. Kandasamy, P.; Gyimesi, G.; Kanai, Y.; Hediger, M.A. Amino Acid Transporters Revisited: New  
551 Views in Health and Disease. *Trends Biochem Sci* **2018**, *43*, 752–789,  
552 doi:10.1016/j.tibs.2018.05.003.
- 553 9. Christensen, H.N. Role of Amino Acid Transport and Countertransport in Nutrition and  
554 Metabolism. *Physiol Rev* **1990**, *70*, 43–77, doi:10.1152/physrev.1990.70.1.43.
- 555 10. Godfray, H.C.J.; Aveyard, P.; Garnett, T.; Hall, J.W.; Key, T.J.; Lorimer, J.; Pierrehumbert, R.T.;  
556 Scarborough, P.; Springmann, M.; Jebb, S.A. Meat Consumption, Health, and the Environment.  
557 *Science* **2018**, *361*, eaam5324, doi:10.1126/science.aam5324.
- 558 11. Ahnen, R.T.; Jonnalagadda, S.S.; Slavin, J.L. Role of Plant Protein in Nutrition, Wellness, and  
559 Health. *Nutrition Reviews* **2019**, *77*, 735–747, doi:10.1093/nutrit/nuz028.
- 560 12. Sarwar Gilani, G.; Wu Xiao, C.; Cockell, K.A. Impact of Antinutritional Factors in Food Proteins  
561 on the Digestibility of Protein and the Bioavailability of Amino Acids and on Protein Quality. *Br J*  
562 *Nutr* **2012**, *108 Suppl 2*, S315–332, doi:10.1017/S0007114512002371.
- 563 13. Mariotti, F.; Gardner, C.D. Dietary Protein and Amino Acids in Vegetarian Diets—A Review.  
564 *Nutrients* **2019**, *11*, 2661, doi:10.3390/nu11112661.
- 565 14. Balasubramanian, M.N.; Panserat, S.; Dupont-Nivet, M.; Quillet, E.; Montfort, J.; Le Cam, A.;  
566 Medale, F.; Kaushik, S.J.; Geurden, I. Molecular Pathways Associated with the Nutritional  
567 Programming of Plant-Based Diet Acceptance in Rainbow Trout Following an Early Feeding  
568 Exposure. *BMC Genomics* **2016**, *17*, 449, doi:10.1186/s12864-016-2804-1.
- 569 15. Callet, T.; Dupont-Nivet, M.; Cluzeaud, M.; Jaffrezic, F.; Laloë, D.; Kerneis, T.; Labbé, L.; Quillet,  
570 E.; Geurden, I.; Mazurais, D.; et al. Detection of New Pathways Involved in the Acceptance and  
571 the Utilisation of a Plant-Based Diet in Isogenic Lines of Rainbow Trout Fry. *PLoS ONE* **2018**, *13*,  
572 e0201462, doi:10.1371/journal.pone.0201462.
- 573 16. Jobling, M. National Research Council (NRC): Nutrient Requirements of Fish and Shrimp.  
574 *Aquacult Int* **2012**, *20*, 601–602, doi:10.1007/s10499-011-9480-6.
- 575 17. Morin, G.; Pinel, K.; Dias, K.; Seiliez, I.; Beaumatin, F. RTH-149 Cell Line, a Useful Tool to  
576 Decipher Molecular Mechanisms Related to Fish Nutrition. *Cells* **2020**, *9*, 1754,  
577 doi:10.3390/cells9081754.
- 578 18. Hatzoglou, M.; Fernandez, J.; Yaman, I.; Closs, E. Regulation of Cationic Amino Acid Transport:  
579 The Story of the CAT-1 Transporter. *Annu Rev Nutr* **2004**, *24*, 377–399,  
580 doi:10.1146/annurev.nutr.23.011702.073120.
- 581 19. Bols, N.C.; Pham, P.H.; Dayeh, V.R.; Lee, L.E.J. Invitromatics, Invitrome, and Invitroomics:  
582 Introduction of Three New Terms for in Vitro Biology and Illustration of Their Use with the Cell  
583 Lines from Rainbow Trout. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **2017**, *53*, 383–405,  
584 doi:10.1007/s11626-017-0142-5.
- 585 20. Berthelot, C.; Brunet, F.; Chalopin, D.; Juanchich, A.; Bernard, M.; Noël, B.; Bento, P.; Da Silva,  
586 C.; Labadie, K.; Alberti, A.; et al. The Rainbow Trout Genome Provides Novel Insights into  
587 Evolution after Whole-Genome Duplication in Vertebrates. *Nat Commun* **2014**, *5*,  
588 doi:10.1038/ncomms4657.
- 589 21. Zhu, T.; Corraze, G.; Plagnes-Juan, E.; Quillet, E.; Dupont-Nivet, M.; Skiba-Cassy, S. Regulation of  
590 Genes Related to Cholesterol Metabolism in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Fed a Plant-  
591 Based Diet. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*  
592 **2018**, *314*, R58–R70, doi:10.1152/ajpregu.00179.2017.
- 593 22. Vallabha, V.S.; Tapal, A.; Sukhdeo, S.V.; K, G.; Tiku, P.K. Effect of Arginine : Lysine Ratio in Free  
594 Amino Acid and Protein Form on L-NAME Induced Hypertension in Hypercholesterolemic  
595 Wistar Rats. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 73388–73398, doi:10.1039/C6RA13632J.
- 596 23. Castellano, B.M.; Thelen, A.M.; Moldavski, O.; Feltes, M.; van der Welle, R.E.N.; Mydock-  
597 McGrane, L.; Jiang, X.; van Eijkeren, R.J.; Davis, O.B.; Louie, S.M.; et al. Lysosomal Cholesterol  
598 Activates MTORC1 via an SLC38A9-Niemann-Pick C1 Signaling Complex. *Science* **2017**, *355*,  
599 1306–1311, doi:10.1126/science.aag1417.



- 600 24. Wang, S.; Tsun, Z.-Y.; Wolfson, R.L.; Shen, K.; Wyant, G.A.; Plovanich, M.E.; Yuan, E.D.; Jones,  
601 T.D.; Chantranupong, L.; Comb, W.; et al. Lysosomal Amino Acid Transporter SLC38A9 Signals  
602 Arginine Sufficiency to mTORC1. *Science* **2015**, *347*, 188–194, doi:10.1126/science.1257132.
- 603 25. Rebsamen, M.; Pochini, L.; Stasyk, T.; de Araújo, M.E.G.; Galluccio, M.; Kandasamy, R.K.; Snijder,  
604 B.; Fauster, A.; Rudashevskaya, E.L.; Bruckner, M.; et al. SLC38A9 Is a Component of the  
605 Lysosomal Amino Acid Sensing Machinery That Controls mTORC1. *Nature* **2015**, *519*, 477–481,  
606 doi:10.1038/nature14107.
- 607 26. Wyant, G.A.; Abu-Remaileh, M.; Wolfson, R.L.; Chen, W.W.; Freinkman, E.; Danai, L.V.; Vander  
608 Heiden, M.G.; Sabatini, D.M. mTORC1 Activator SLC38A9 Is Required to Efflux Essential Amino  
609 Acids from Lysosomes and Use Protein as a Nutrient. *Cell* **2017**, *171*, 642–654.e12,  
610 doi:10.1016/j.cell.2017.09.046.
- 611 27. Thams, P.; Capito, K. L-Arginine Stimulation of Glucose-Induced Insulin Secretion through  
612 Membrane Depolarization and Independent of Nitric Oxide. *Eur J Endocrinol* **1999**, *140*, 87–93,  
613 doi:10.1530/eje.0.1400087.
- 614 28. Seilliez, I.; Gabillard, J.-C.; Skiba-Cassy, S.; Garcia-Serrana, D.; Gutiérrez, J.; Kaushik, S.; Panserat,  
615 S.; Tesseraud, S. An in Vivo and in Vitro Assessment of TOR Signaling Cascade in Rainbow Trout  
616 (*Oncorhynchus Mykiss*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2008**, *295*, R329–335,  
617 doi:10.1152/ajpregu.00146.2008.
- 618 29. Helman, A.; Cangelosi, A.L.; Davis, J.C.; Pham, Q.; Rothman, A.; Faust, A.L.; Straubhaar, J.R.;  
619 Sabatini, D.M.; Melton, D.A. A Nutrient-Sensing Transition at Birth Triggers Glucose-Responsive  
620 Insulin Secretion. *Cell Metabolism* **2020**, *31*, 1004–1016.e5, doi:10.1016/j.cmet.2020.04.004.
- 621 30. Seilliez, I.; Panserat, S.; Lansard, M.; Polakof, S.; Plagnes-Juan, E.; Surget, A.; Dias, K.; Larquier,  
622 M.; Kaushik, S.; Skiba-Cassy, S. Dietary Carbohydrate-to-Protein Ratio Affects TOR Signaling and  
623 Metabolism-Related Gene Expression in the Liver and Muscle of Rainbow Trout after a Single  
624 Meal. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2011**, *300*, R733–743,  
625 doi:10.1152/ajpregu.00579.2010.
- 626 31. Javed, K.; Fairweather, S.J. Amino Acid Transporters in the Regulation of Insulin Secretion and  
627 Signalling. *Biochem Soc Trans* **2019**, *47*, 571–590, doi:10.1042/BST20180250.
- 628 32. Beaumatin, F.; O'Prey, J.; Barthet, V.J.A.; Zunino, B.; Parvy, J.-P.; Bachmann, A.M.; O'Prey, M.;  
629 Kania, E.; Gonzalez, P.S.; Macintosh, R.; et al. mTORC1 Activation Requires DRAM-1 by  
630 Facilitating Lysosomal Amino Acid Efflux. *Mol. Cell* **2019**, *76*, 163–176.e8,  
631 doi:10.1016/j.molcel.2019.07.021.
- 632 33. Adusumalli, R. Model Organisms in Cancer Research—Powers and Limitations. *Advances in*  
633 *Bioscience and Clinical Medicine* **2021**, *9*, 1–4, doi:10.7575/aiac.abcm.v.9n.2p.1.
- 634 34. Bailey, G.S.; Williams, D.E.; Hendricks, J.D. Fish Models for Environmental Carcinogenesis: The  
635 Rainbow Trout. *Environ Health Perspect* **1996**, *104 Suppl 1*, 5–21, doi:10.1289/ehp.96104s15.
- 636 35. Williams, D.E. The Rainbow Trout Liver Cancer Model: Response to Environmental Chemicals  
637 and Studies on Promotion and Chemoprevention. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*  
638 **2012**, *155*, 121–127, doi:10.1016/j.cbpc.2011.05.013.
- 639 36. Barretina, J.; Caponigro, G.; Stransky, N.; Venkatesan, K.; Margolin, A.A.; Kim, S.; Wilson, C.J.;  
640 Lehár, J.; Kryukov, G.V.; Sonkin, D.; et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia Enables Predictive  
641 Modelling of Anticancer Drug Sensitivity. *Nature* **2012**, *483*, 603–607,  
642 doi:10.1038/nature11003.
- 643
- 644
- 645

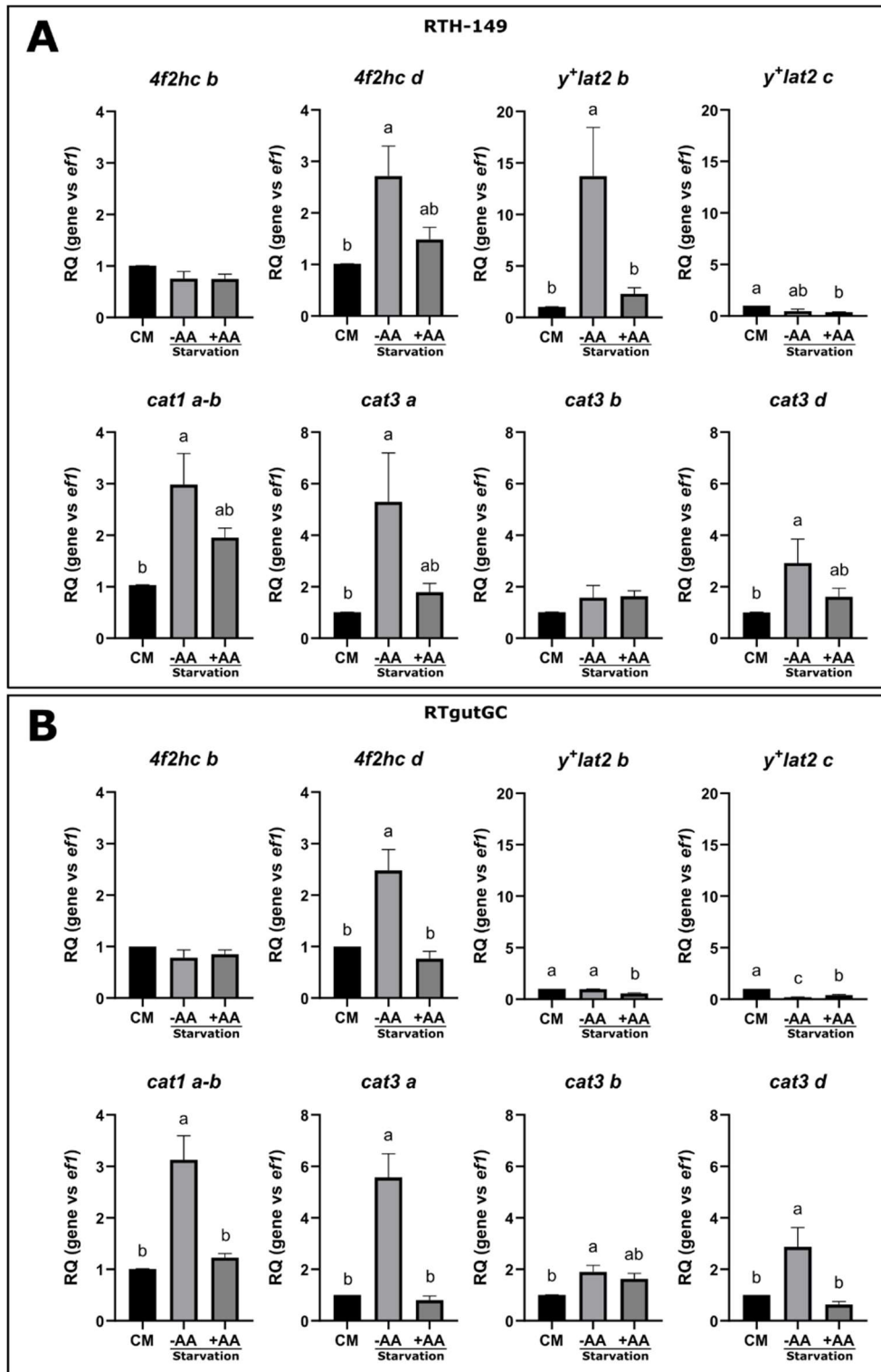


646

647 **Figure 1:** *In silico* identification of CAAT paralogs in RT genome and validation of their expression in RT  
 648 tissues and cell lines.

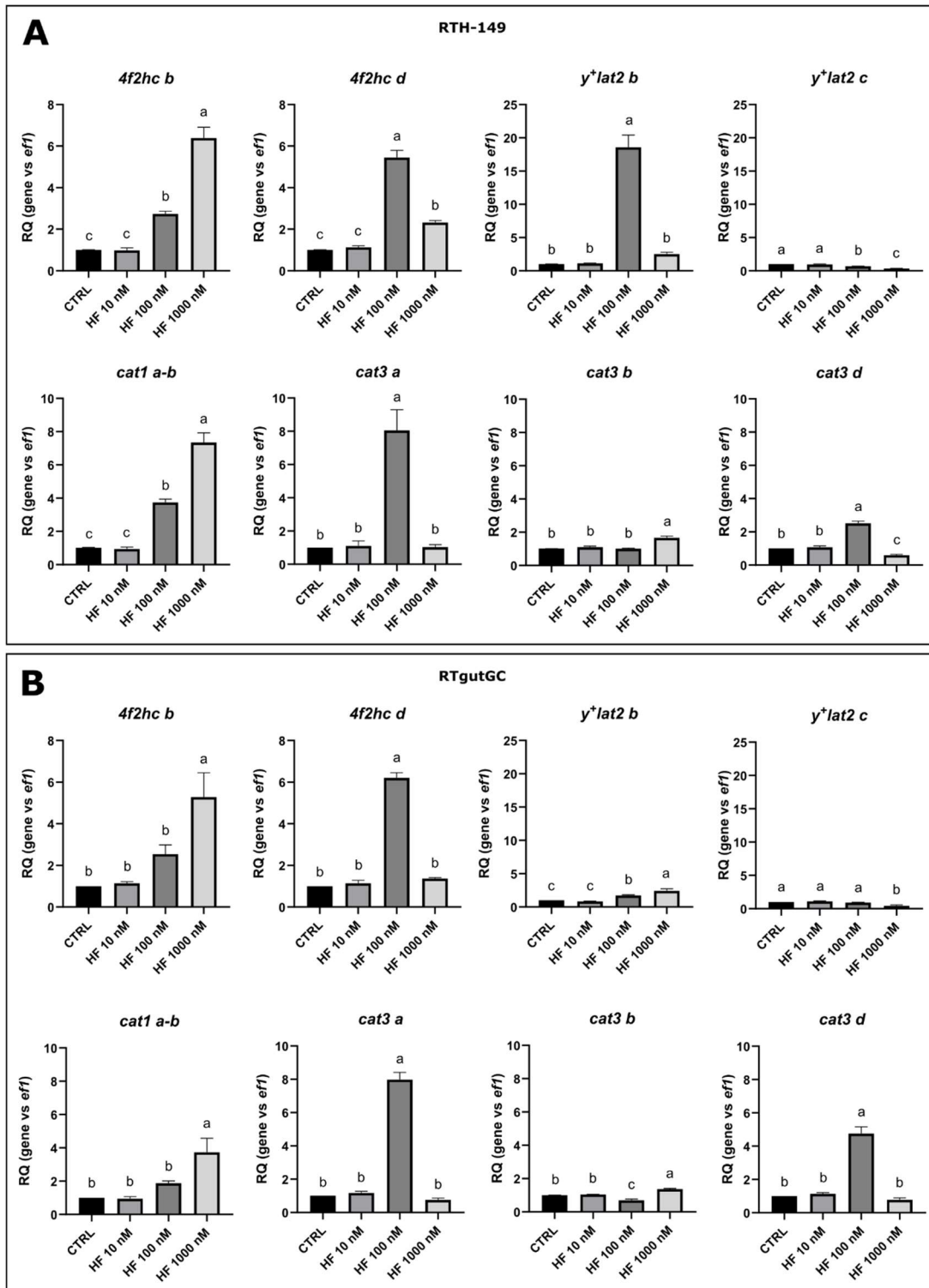
649

650



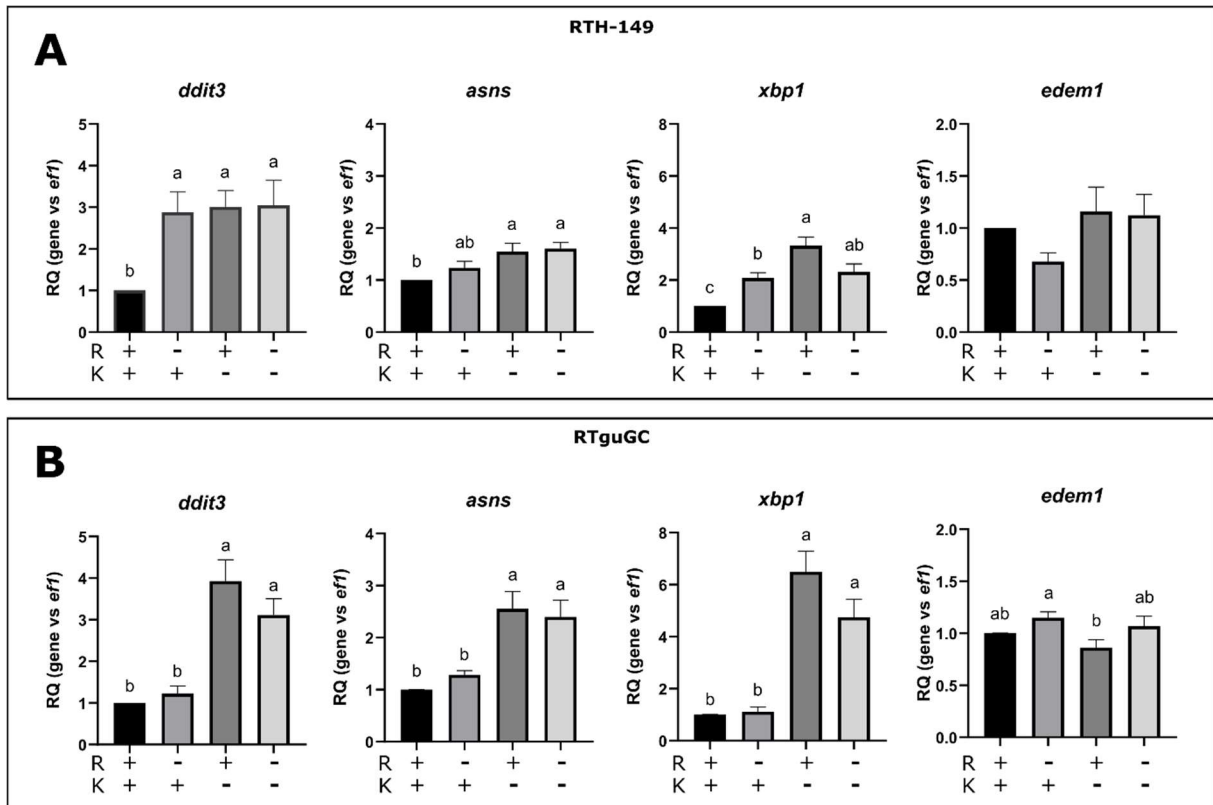
651

652 **Figure 2.** Amino acid dependent regulations of CAT and  $\gamma^+$ LAT transporter genes in RTH-149 and  
 653 RTgutGC cells. RTH-149 (A) and RTgutGC (B) cells were grown for 24 h in either complete medium (CM)  
 654 or in HBSS (starvation) supplemented (+AA) or not (-AA) with amino acids prior to proceed to RNA  
 655 extraction and RT-qPCR analysis of mRNA levels of CAT and  $\gamma^+$ LAT transporter genes. Results are  
 656 represented as relative quotient (RQ) normalized on *ef1 $\alpha$*  mRNA levels compared to CM. Data are  
 657 presented as mean  $\pm$  SEM,  $N = 6$  (A) and  $N = 4$  (B). Conditions showing results statistically different  
 658 from each other are indicated using a different letter ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA Tukey's post-hoc test).



659

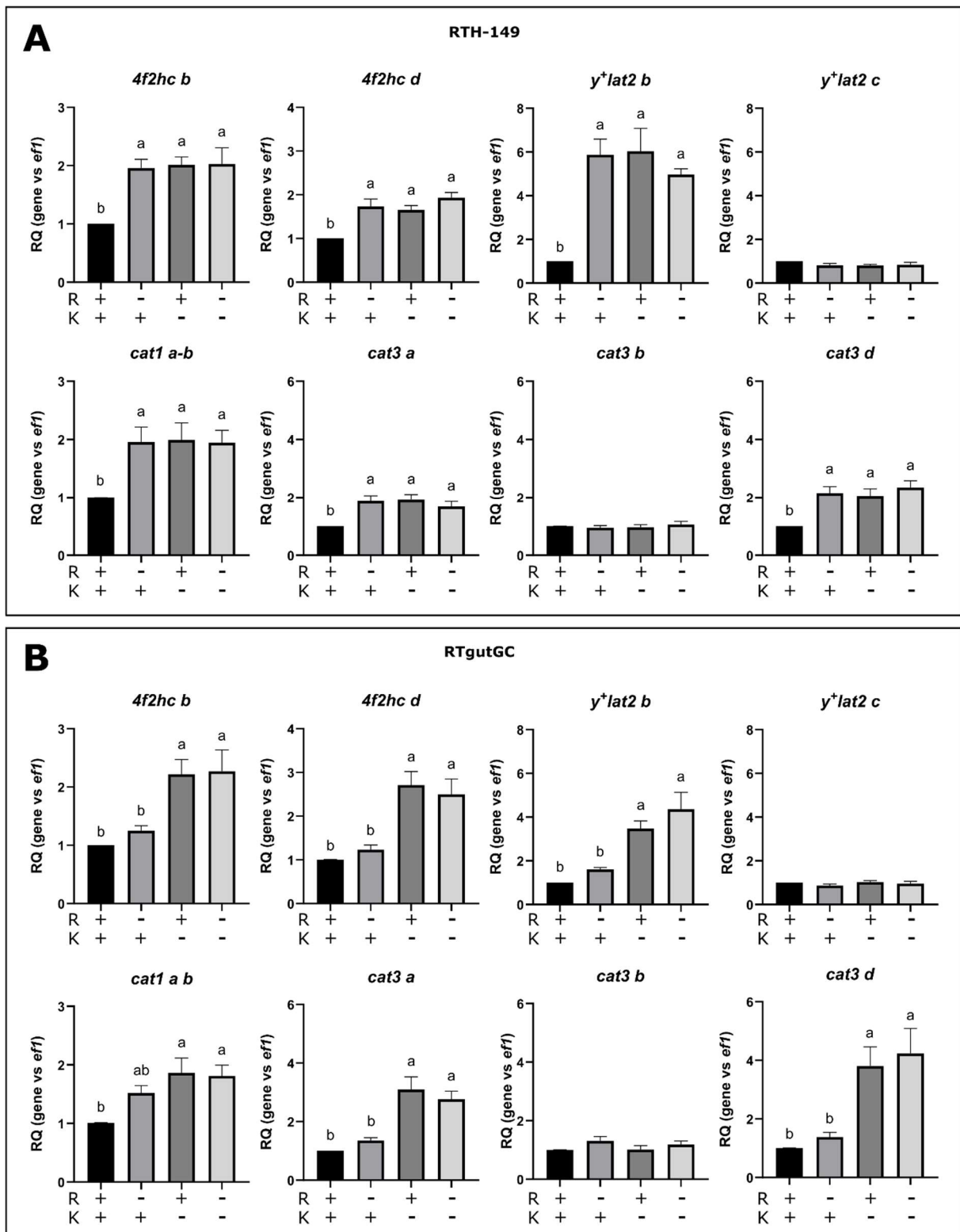
660 **Figure 3:** Expression of CAT and  $\gamma$ LAT transporter genes induced by halofuginone hydrobromide (HF)  
 661 in RTH-149 and RTgutGC cells. RTH-149 (A) and RTgutGC (B) cells were grown for 24 h in complete  
 662 medium supplemented with indicated concentrations of HF or without (CTRL) prior to proceed to RNA  
 663 extraction and RT-qPCR analysis of mRNA levels of CAT and  $\gamma$ LAT transporter genes. Results are  
 664 represented as relative quotient (RQ) normalized on *ef1 $\alpha$*  mRNA levels compared to CTRL. Data are  
 665 presented as mean  $\pm$  SEM,  $N = 4$ . Conditions showing results statistically different from each other are  
 666 indicated using a different letter ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA Tukey's post-hoc test).



667

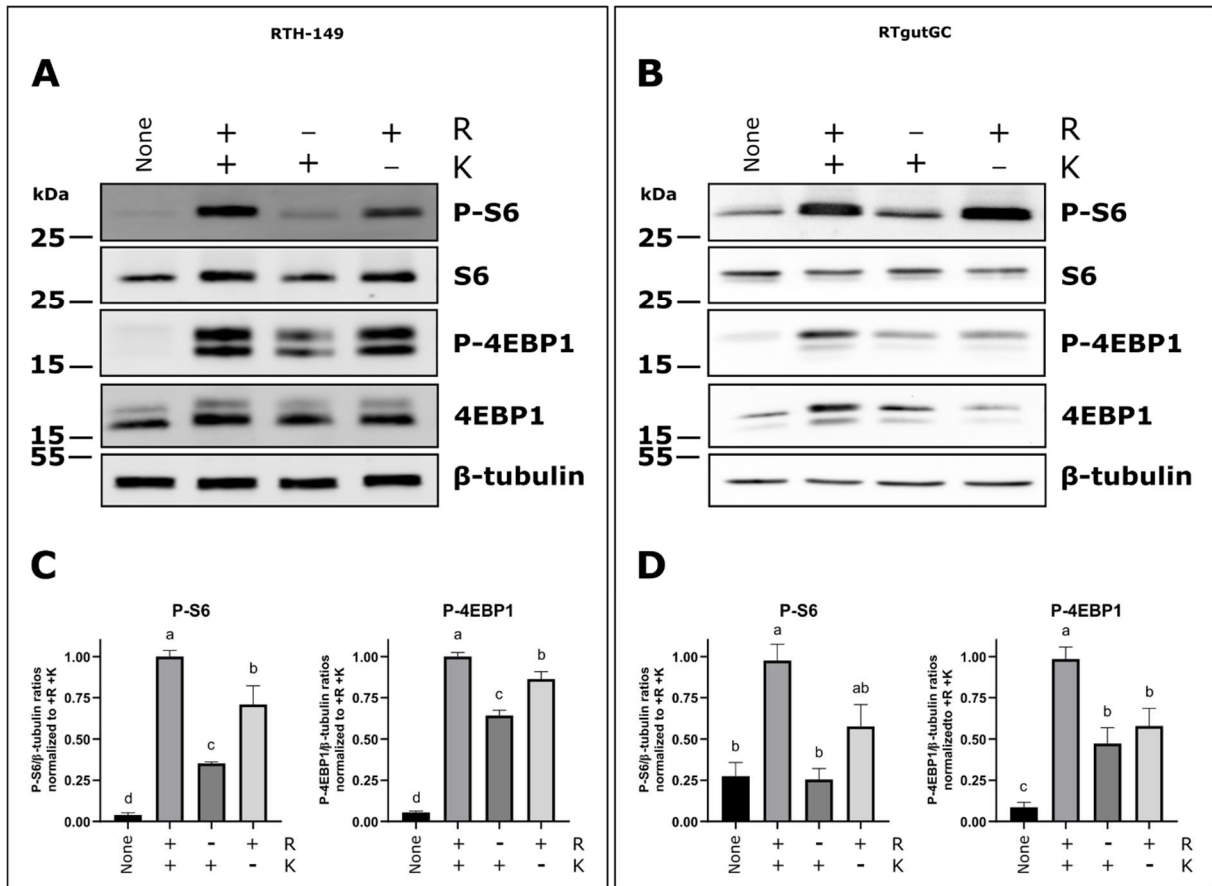
668 **Figure 4.** Expression of the integrated stress response (ISR) pathway target genes by arginine (R) and  
 669 lysine (K) in RTH-149 (A) and RTgutGC cells. RTH-149 (A) and RTgutGC (B) cells were grown for 24 h in  
 670 arginine (R) and lysine (K) deprived medium supplemented (+) or not (-) with R and K prior to proceed  
 671 to RNA extraction and RT-qPCR analysis of mRNA levels of ISR target genes. Results are represented as  
 672 relative quotient (RQ) normalized on *ef1 $\alpha$*  mRNA levels compared to condition with R and K. Data are  
 673 presented as mean  $\pm$  SEM,  $N = 6$ . Conditions showing results statistically different from each other are  
 674 indicated using a different letter ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA Tukey's post-hoc test).

675



676

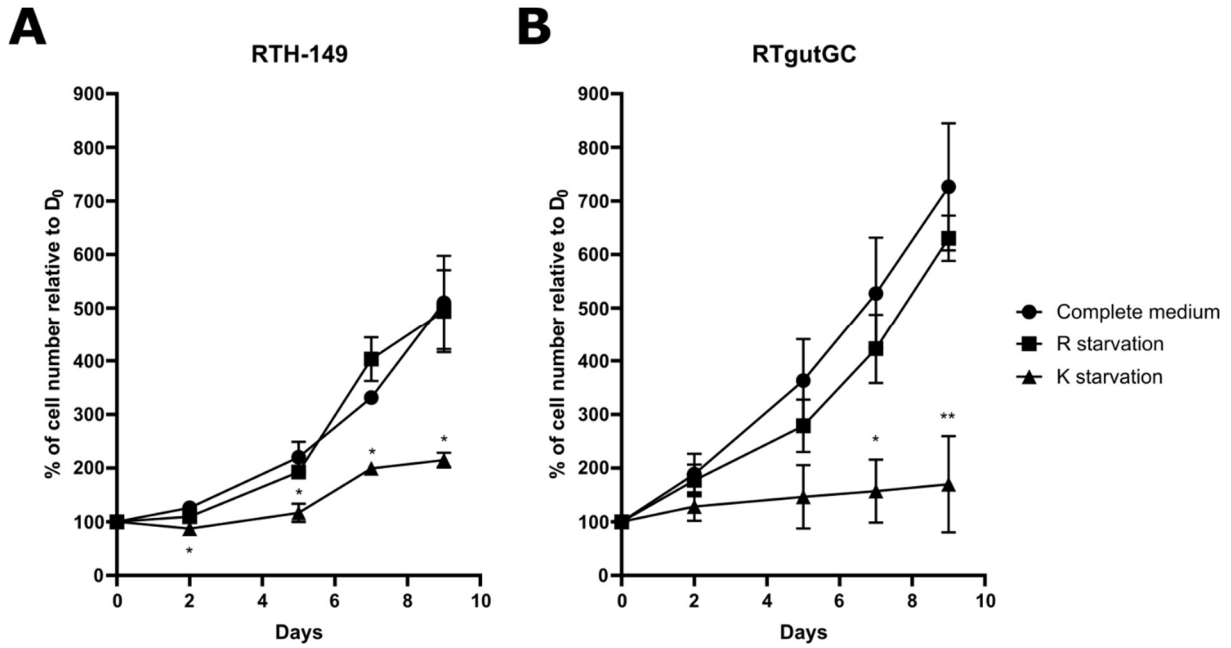
677 **Figure 5:** Arginine and lysine dependent regulations of CAT and  $\gamma^+$ LAT transporter genes in RTH-149  
 678 and RTgutGC cells. RTH-149 (A) and RTgutGC (B) cells were grown for 24 h in arginine (R) and lysine (K)  
 679 deprived medium supplemented (+) or not (-) with R and K prior to proceed to RNA extraction and RT-  
 680 qPCR analysis of mRNA levels of CAT and  $\gamma^+$ LAT transporter genes. Results are represented as relative  
 681 quotient (RQ) normalized on *ef1 $\alpha$*  mRNA levels compared to condition with R and K. Data are presented  
 682 as mean  $\pm$  SEM,  $N = 6$ . Conditions showing results statistically different from each other are indicated  
 683 using a different letter ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA Tukey's post-hoc test).



684

685 **Figure 6.** Arginine and lysine dependent mTOR pathway activation in RTH-149 and RTgutGC cells. RTH-  
 686 149 (A) and RTgutGC (B) cells were starved prior to treatment with medium deprived of arginine (R)  
 687 and lysine (K) supplemented (+) or not (-) with R and K. Western blots were performed using antibodies  
 688 directed against phospho-S6, phospho-4EBP1, total 4EBP1 proteins and  $\beta$ -tubulin as loading control.  
 689 Quantifications of phospho-S6 and phospho-4EBP1 in RTH-149 (C) and RTgutGC (D) cells were  
 690 performed using ImageJ software. Ratio between phosphorylated proteins and  $\beta$ -tubulin were  
 691 calculated before normalization to +R +K condition. Data are presented as mean  $\pm$  SEM,  $N = 3$  (C) and  
 692  $N = 6$  (D). Conditions showing results statistically different from each other are indicated using a  
 693 different letter ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA Tukey's post-hoc test).

694



695

696 **Figure 7:** Effect of arginine or lysine starvation on RTH-149 and RTgutGC cell proliferation. 100 000  
 697 RTH-149 (A) and 40000 RTgutGC (B) cells were seeded per well, into 12 well plates in triplicate for each  
 698 condition and time point. After 2 days, cells were treated with culture medium deprived of arginine  
 699 (R) and lysine (K) supplemented with foetal bovine serum and with R (-K), K (-K) or both (+R +K). Cells  
 700 were counted using Nexcellom K2 cellometer and results are presented as percentage of cell number  
 701 counted for each condition normalized on cell number counted before treatment ( $D_0$ ). Results are  
 702 represented as mean ( $N = 3 \pm SEM$ ). Conditions showing, at each time point, results statistically  
 703 different from complete medium condition are indicated as \* :  $p < 0.05$ ; \*\* :  $p < 0.01$ ; one-way ANOVA  
 704 Dunnett's post-hoc test)

705

706

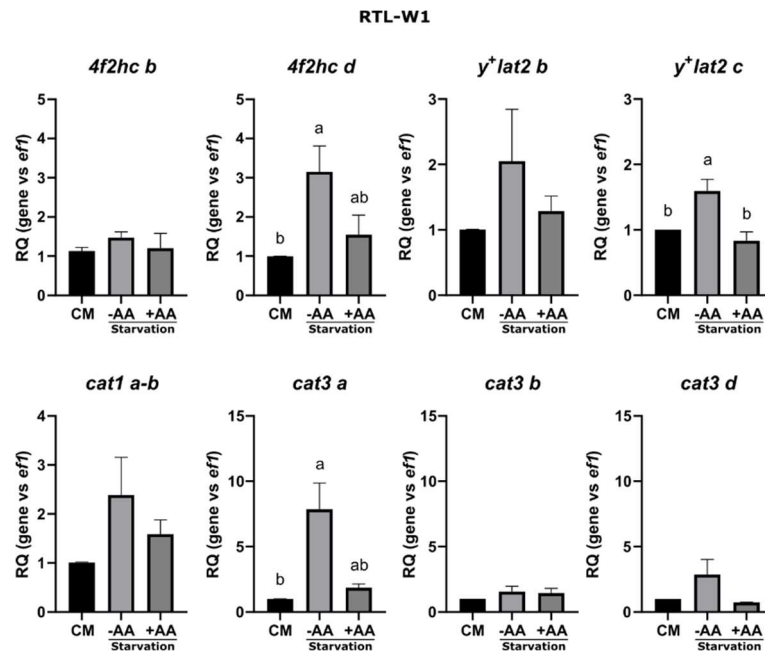


707

## Supplementary Figures

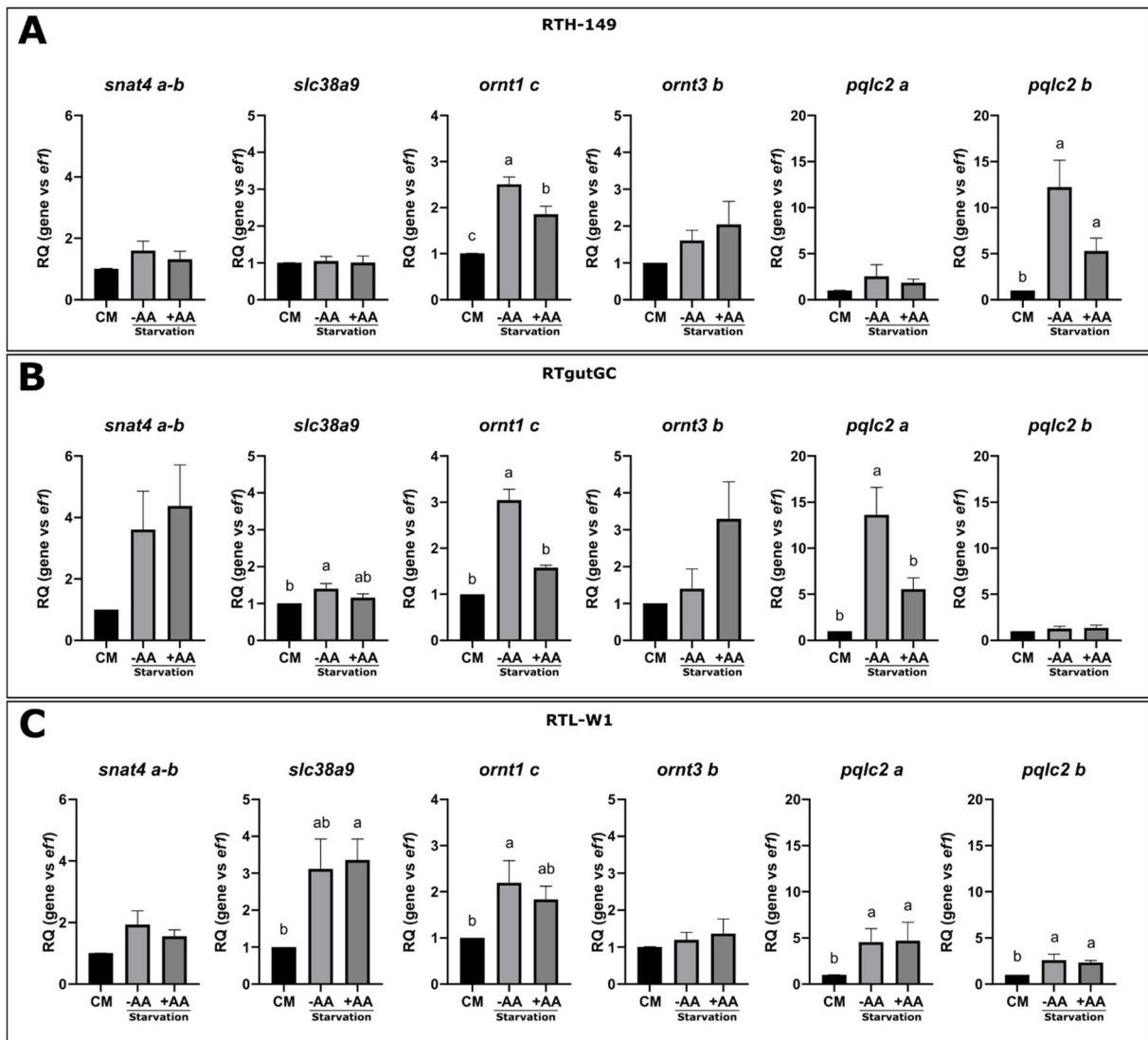
708

709



710 **Figure S1.** Amino acid dependent regulations of CAT and  $\gamma^+$ LAT transporter genes in RTL-W1 cells. RTL-  
 711 W1 cells were grown for 8 h in either complete medium (CM) or in HBSS (starvation) supplemented  
 712 (+AA) or not (-AA) with amino acids prior to proceed to RNA extraction and RT-qPCR analysis of mRNA  
 713 levels of CAT and  $\gamma^+$ LAT transporter genes. Results are represented as relative quotient (RQ) normalized  
 714 on *efl1* mRNA levels compared to CM. Data are presented as mean  $\pm$  SEM,  $N = 5$ . Conditions showing  
 715 results statistically different from each other are indicated using a different letter ( $p < 0.05$ , one-way  
 716 ANOVA Tukey's post-hoc test or Kruskal-Wallis Dunn's post-hoc test).

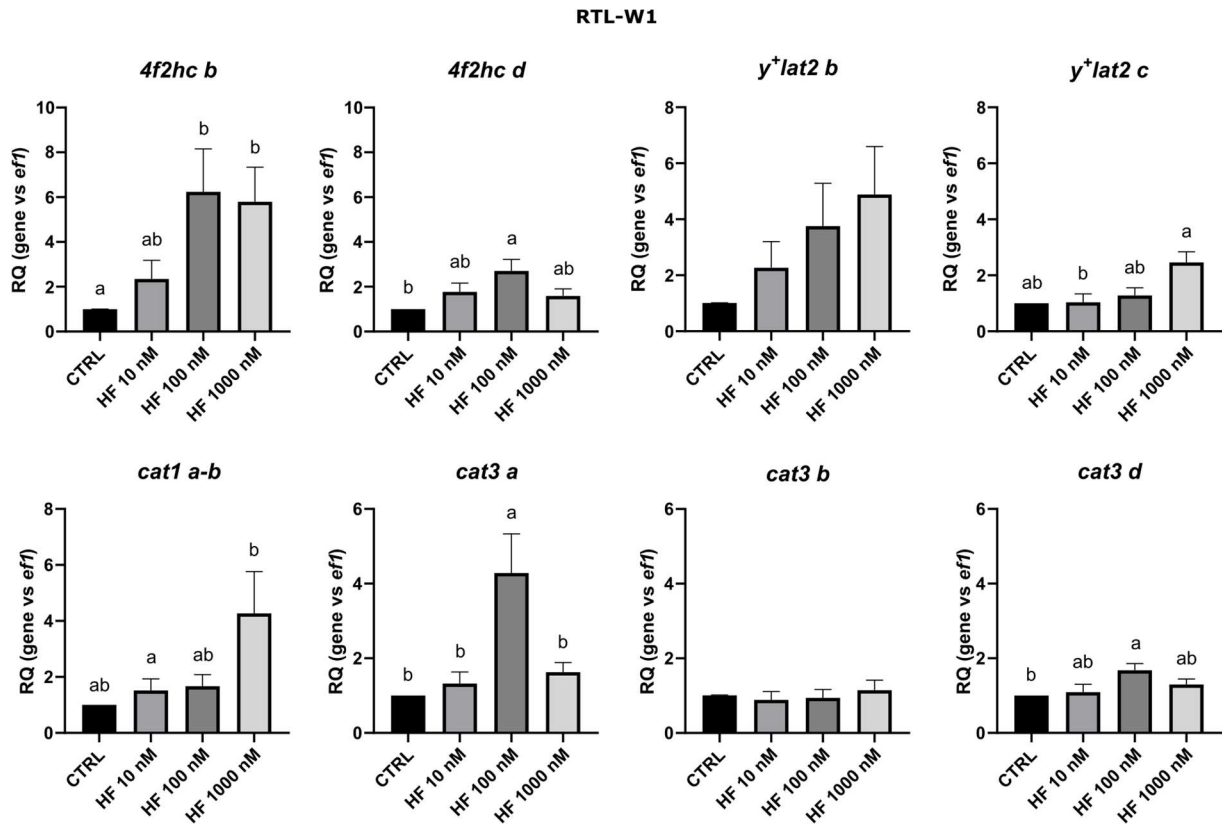
717



719

720 **Figure S2.** Amino acid dependent regulations of other cationic amino acid transporter genes in RTH-  
 721 149, RTgutGC and RTL-W1 cells. RTH-149 (A) and RTgutGC (B) were grown for 24 h and RTL-W1 (C) for  
 722 8 h in either complete medium (CM) or in HBSS (starvation) supplemented (+AA) or not (-AA) with  
 723 amino acids prior to proceed to RNA extraction and RT-qPCR analysis of mRNA levels of cationic amino  
 724 acid transporter genes. Results are represented as relative quotient (RQ) normalized on *ef1 $\alpha$*  mRNA  
 725 levels compared to CM. Data are presented as mean  $\pm$  SEM,  $N = 6$  (A),  $N = 4$  (B) and  $N = 5$  (C). Conditions  
 726 showing results statistically different from each other are indicated using a different letter ( $p < 0.05$ ,  
 727 one-way ANOVA Tukey's post-hoc test or Kruskal-Wallis Dunn's post-hoc test).

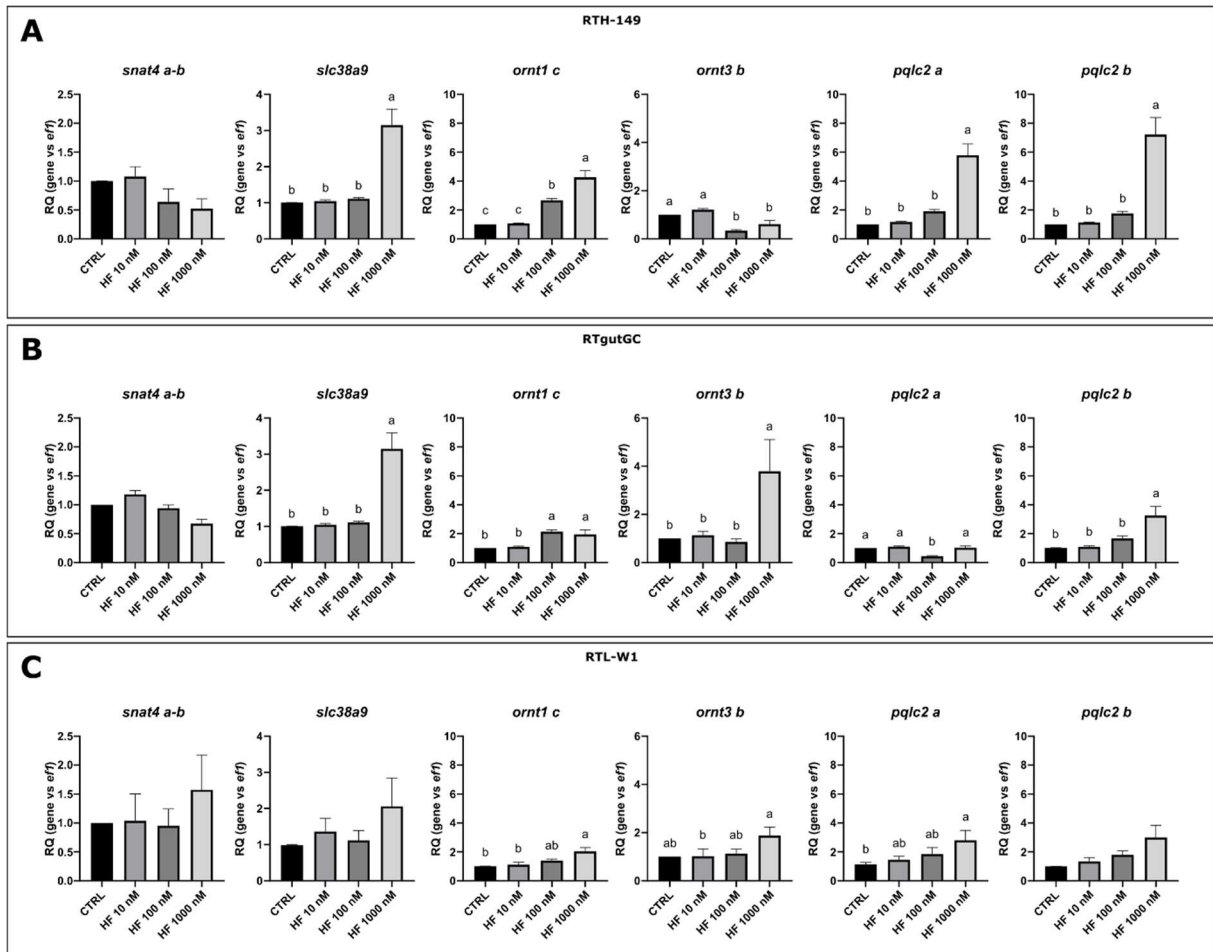
728



730

731 **Figure S3:** Expression of CAT and  $\gamma^+$ LAT transporter genes induced by halofuginone hydrobromide (HF)  
 732 in RTL-W1 cells. RTL-W1 cells were grown for 8 h in complete medium supplemented with indicated  
 733 concentrations of HF or without (CTRL) prior to proceed to RNA extraction and RT-qPCR analysis of  
 734 mRNA levels of CAT and  $\gamma^+$ LAT transporter genes. Results are represented as relative quotient (RQ)  
 735 normalized on *ef1 $\alpha$*  mRNA levels compared to CTRL. Data are presented as mean  $\pm$  SEM,  $N = 6$ .  
 736 Conditions showing results statistically different from each other are indicated using a different letter  
 737 ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA Tukey's post-hoc test or Kruskal-Wallis Dunn's post-hoc test).

738

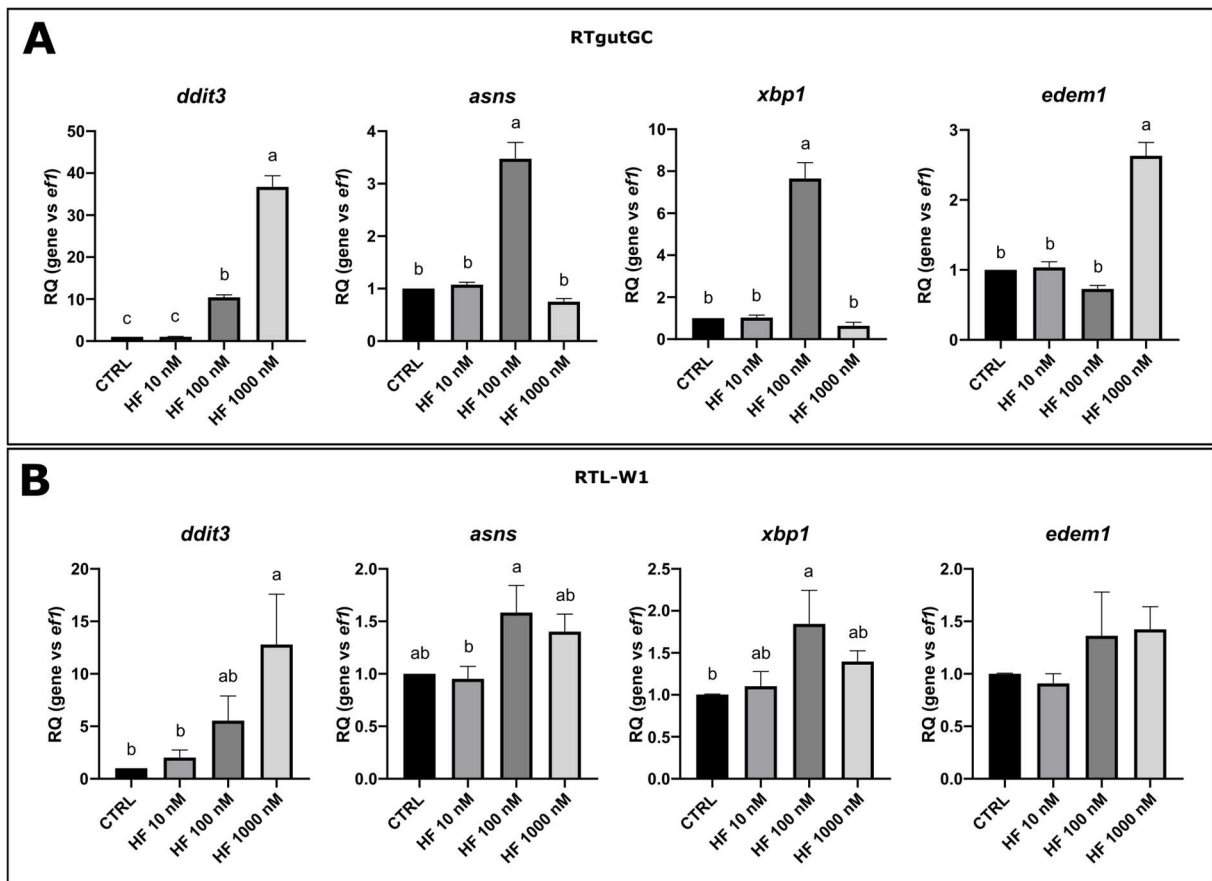


739

740 **Figure S4:** Expression of other cationic amino acid transporter genes induced by halofuginone  
 741 hydrobromide (HF) in RTH-149, RTgutGC and RTL-W1 cells. RTH-149 (A) and RTgutGC (B) cells were  
 742 grown for 24 h and RTL-W1 (C) for 8 h in complete medium supplemented with indicated  
 743 concentrations of HF or without (CTRL) prior to proceed to RNA extraction and RT-qPCR analysis of  
 744 mRNA levels of cationic amino acid transporter genes. Results are represented as relative quotient  
 745 (RQ) normalized on *ef1a* mRNA levels compared to CTRL. Data are presented as mean  $\pm$  SEM,  $N = 4$  (A  
 746 and B) and  $N = 6$  (C). Conditions showing results statistically different from each other are indicated  
 747 using a different letter ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA Tukey's post-hoc test or Kruskal-Wallis Dunn's post-  
 748 hoc test).

749

750

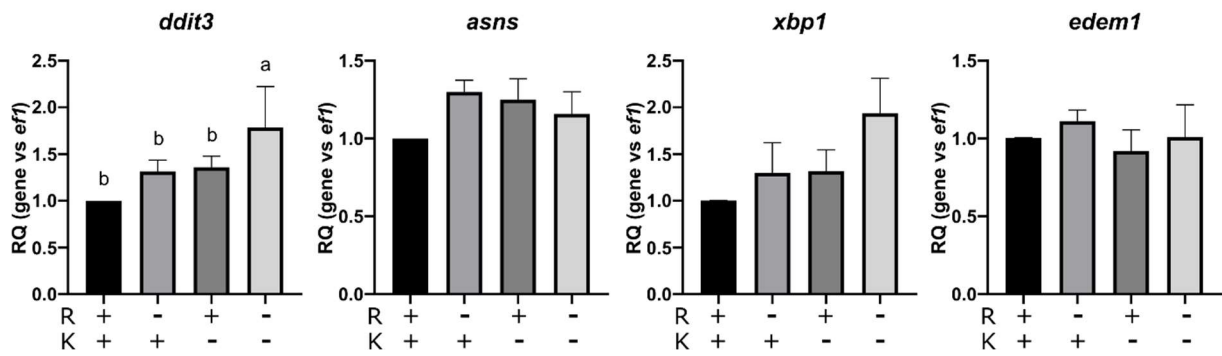


751

752 **Figure S5:** Expression of ISR target genes induced by halofuginone hydrobromide (HF) in RTgutGC and  
 753 RTL-W1 cells. RTgutGC (A) cells were grown for 24 h and RTL-W1 cells (B) for 8 h in complete medium  
 754 supplemented with indicated concentrations of HF or without (CTRL) prior to proceed to RNA  
 755 extraction and RT-qPCR analysis of mRNA levels of ISR target genes. Results are represented as relative  
 756 quotient (RQ) normalized on *efl1α* mRNA levels compared to CTRL. Data are presented as mean ± SEM,  
 757  $N = 4$  (A) and  $N = 5$  (B). Conditions showing results statistically different from each other are indicated  
 758 using a different letter ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA Tukey's post-hoc test or Kruskal-Wallis Dunn's post-  
 759 hoc test).

760

RTL-W1



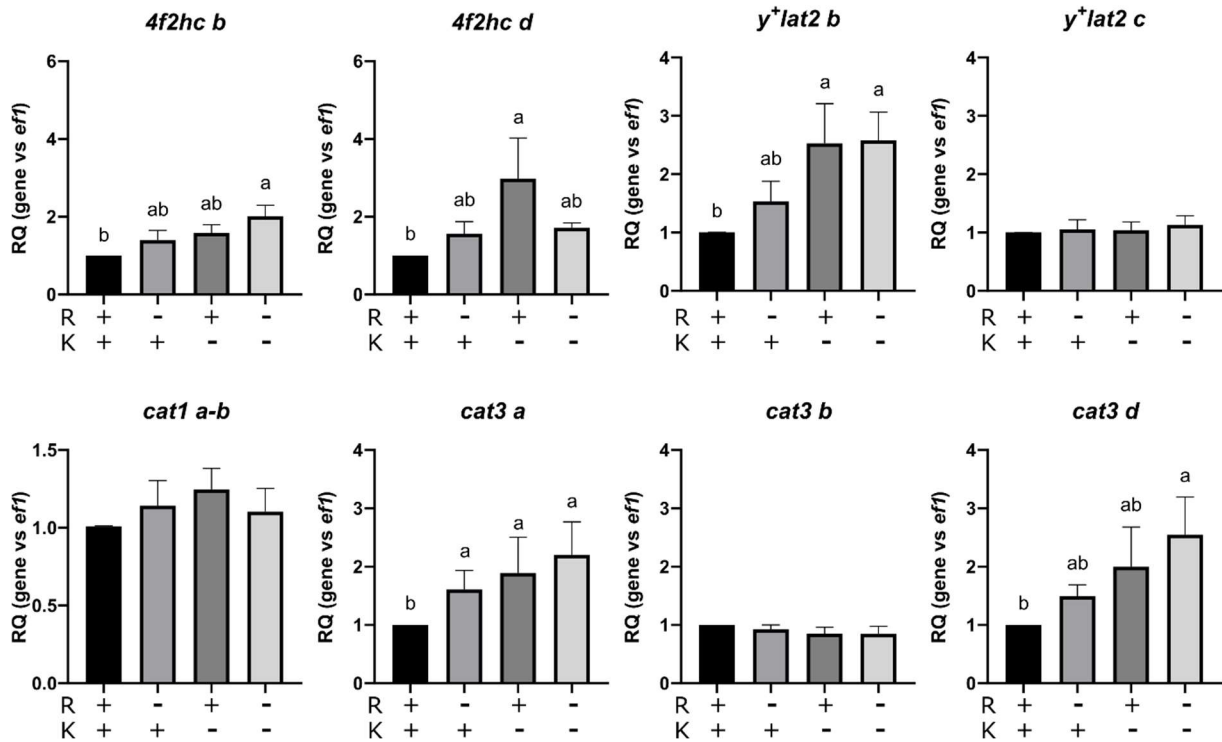
761

762 **Figure S6:** Expression of the integrated stress response (ISR) pathway target genes by arginine (R) and  
 763 lysine (K) in RTL-W1 cells. RTL-W1 cells were grown for 8 h in arginine (R) and lysine (K) deprived  
 764 medium supplemented (+) or not (-) with R and K prior to proceed to RNA extraction and RT-qPCR  
 765 analysis of mRNA levels of ISR target genes. Results are represented as relative quotient (RQ)  
 766 normalized on *ef1 $\alpha$*  mRNA levels compared to condition with R and K. Data are presented as mean  $\pm$   
 767 SEM,  $N = 5$ . Conditions showing results statistically different from each other are indicated using a  
 768 different letter ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA Tukey's post-hoc test or Kruskal-Wallis Dunn's post-hoc  
 769 test).

770

771

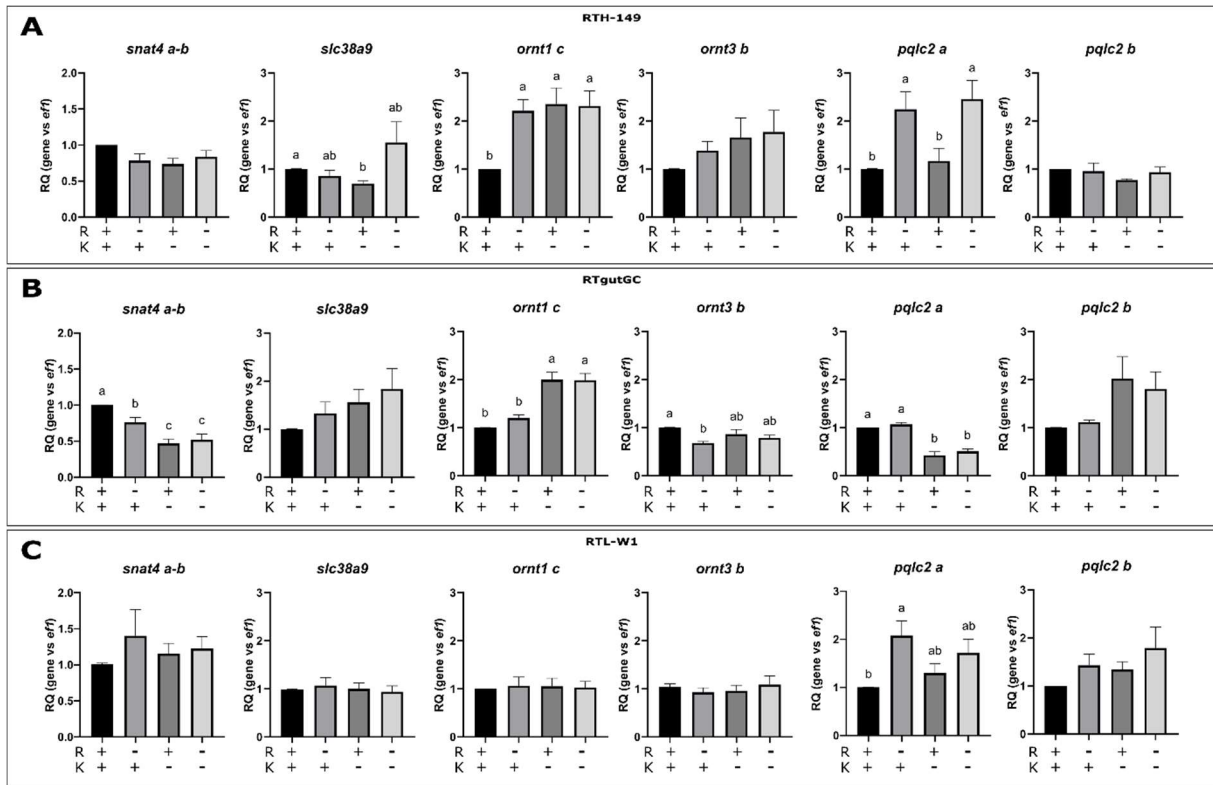
RTL-W1



772

773 **Figure S7:** Arginine and lysine dependent regulations of CAT and  $\gamma^+$ LAT transporter genes in RTL-W1  
 774 cells. RTL-W1 cells were grown for 8 h in arginine (R) and lysine (K) deprived medium supplemented  
 775 (+) or not (-) with R and K prior to proceed to RNA extraction and RT-qPCR analysis of mRNA levels of  
 776 CAT and  $\gamma^+$ LAT transporter genes. Results are represented as relative quotient (RQ) normalized on *ef1 $\alpha$*   
 777 mRNA levels compared to condition with R and K. Data are presented as mean  $\pm$  SEM,  $N = 6$ . Conditions  
 778 showing results statistically different from each other are indicated using a different letter ( $p < 0.05$ ,  
 779 one-way ANOVA Tukey's post-hoc test or Kruskal-Wallis Dunn's post-hoc test).

780

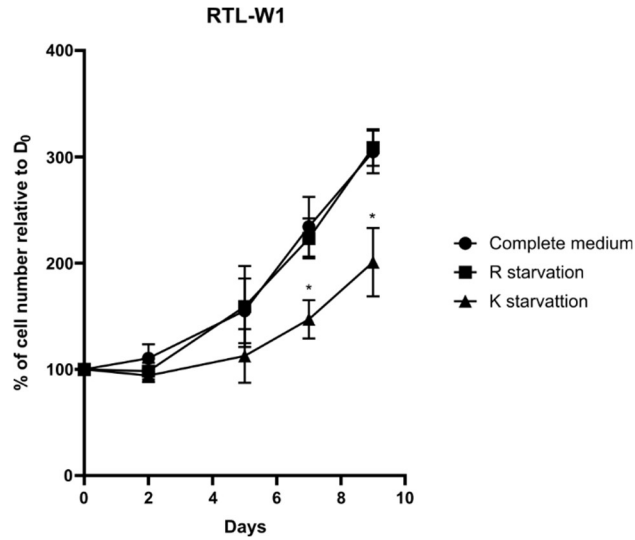


781

782 **Figure S8:** Arginine and lysine dependent regulations of other cationic amino acid transporter genes in  
 783 RTH-149, RTgutGC and RTL-W1 cells. RTH-149 (A) and RTgutGC (B) cells were grown for 24 h and RTL-  
 784 W1 (C) for 8h in arginine (R) and lysine (K) deprived medium supplemented (+) or not (-) with R and K  
 785 prior to proceed to RNA extraction and RT-qPCR analysis of mRNA levels of cationic amino acid  
 786 transporter genes. Results are represented as relative quotient (RQ) normalized on *ef1a* mRNA levels  
 787 compared to condition with R and K. Data are presented as mean  $\pm$  SEM,  $N = 6$  (A and B) and  $N = 5$  (C).  
 788 Conditions showing results statistically different from each other are indicated using a different letter  
 789 ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA Tukey's post-hoc test or Kruskal-Wallis Dunn's post-hoc test).

790





791 **Figure S9:** Effect of arginine or lysine starvation on RTL-W1 cell proliferation. 100 000 RTL-W1 cells  
 792 were seeded per well, into 12 well plates in triplicate for each condition and time point. After 2 days,  
 793 cells were treated with culture medium deprived of arginine (R) and lysine (K) supplemented with  
 794 foetal bovine serum and with R (-K), K (-K) or both (+R +K). Cells were counted using Nexcellom NK2  
 795 cellometer and results are presented as percentage of cell number counted for each condition  
 796 normalized on cell number counted before treatment ( $D_0$ ). Results are represented as mean ( $N = 4 \pm$   
 797 SEM). Conditions showing, at each time point, results statistically different from complete medium  
 798 condition are indicated as \* :  $p < 0.05$ ; \*\* :  $p < 0.01$ ; one-way ANOVA Dunnett's post-hoc test).

799

# DISCUSSION



## A- Les lignées cellulaires de truites un nouveau modèle d'étude pour la nutrition des poissons

### a. Conservation de la signalisation des acides aminés dans les lignées cellulaires de truite

Le premier objectif de cette thèse était de valider l'utilisation d'une lignée cellulaire, les cellules RTH-149, afin d'étudier la signalisation cellulaire relative aux acides aminés et déterminer si celle-ci est conservée au travers des voies GCN2, mTOR et l'autophagie. Le premier article publié dans le cadre de cette thèse montre que, malgré quelques différences avec les modèles mammifères, ces voies sont globalement conservées (Morin et al., 2020). Les réponses cellulaires à la carence sont similaires à ce qui est connu chez les mammifères. En effet, les résultats montrent que les gènes cibles de l'ISR, à savoir CHOP, ASNS et XBP1, sont surexprimés par la carence. Le flux autophagique est également induit lors de la carence tout comme l'expression de certains gènes autophagiques tels que LC3B, SQSTM1 et ATG4 comme ce qui est connu dans les cellules MEF<sup>512</sup>. La carence induit également la déphosphorylation de S6 et 4EBP1 témoignant de l'inactivation de la voie mTOR tout comme dans les cultures primaires de truites<sup>455,457</sup> et les mammifères<sup>421 530</sup>. Ainsi ces trois voies sont bien régulées par la carence dans la lignée cellulaire RTH-149 comme ce qui a pu être observé dans les cultures primaires de truite et chez les mammifères.

Les résultats montrent également que les gènes cibles de l'ISR ne sont pas induits si le milieu de carence contient des acides aminés, démontrant que la surexpression observée dépend bien de la carence en acides aminés, comme ce qui est connu dans les cultures primaires de truite<sup>377</sup> et les mammifères<sup>312,531</sup>. Nous avons également démontré que les carences spécifiques en arginine et lysine semble induire l'activation de la voie GCN2 comme ce qui est connu dans la lignée cellulaire hépatique humaine HepG2<sup>301</sup>. De plus, l'ajout d'halofuginone dans le milieu de culture induit la surexpression de ces mêmes gènes, suggérant fortement que ces gènes sont surexprimés par la voie GCN2 et que les mécanismes d'activation de GCN2 sont conservés dans la lignée cellulaire RTH-149. Contrairement aux gènes cibles de l'ISR, l'ajout des acides aminés aux cellules carencées n'a que très peu d'effet sur la surexpression des gènes autophagiques tout comme les carences spécifiques en arginine et/ou lysine (données non présentées), suggérant que leur expression est peu régulée par la disponibilité en acides aminés et semble plus régulée par la présence de facteurs contenus dans le sérum. Étonnamment, bien que l'expression de ces gènes ne semble pas être régulée par les acides aminés, ils sont surexprimés par la présence d'halofuginone dans le milieu de culture qui active la voie GCN2 en mimant une carence en acides aminés. Ces résultats suggèrent que les gènes autophagiques ont la capacité à être régulés par la voie GCN2 mais que cette régulation ne serait que marginale lors d'une carence totale, notamment induite par l'absence de sérum. De manière intéressante, on remarque qu'ATG12 qui est surexprimé dans les cellules de type MEF<sup>355</sup> et les cultures primaires de myoblastes de truite<sup>521</sup> par la carence en acides aminés ne l'est pas dans les cellules RTH-149. Néanmoins cette absence de surexpression d'*atg12* dans les cellules pourrait être due à nos conditions expérimentales. En effet, une autre étude

réalisée dans des cultures primaires de cellules musculaires de truite montre qu'en condition de carence totale (carence en acides aminés et sérum) similaires à nos expérimentations dans les cellules RTH-149, *atg12* n'est pas surexprimé <sup>532</sup>. Les deux études montrant une surexpression d'*atg12* utilisaient des milieux carencés soit en un acide aminé <sup>355</sup>, soit en sérum <sup>521</sup>. De plus, des résultats obtenus dans les cellules RTH-149 (non publiés) montre qu'une carence en lysine seule induit une surexpression d'*atg12*. Il semble donc que la carence totale empêche la surexpression d'*atg12* soit par l'absence d'un élément du milieu de culture nécessaire à sa surexpression soit en induisant un stress plus marqué aux cellules. Il serait alors intéressant d'observer l'expression d'*atg12* dans les lignées cellulaires de truite traitées avec des milieux carencés spécifiquement en sérum ou en certains acides aminés.

Bien que, l'expression des gènes autophagiques n'est pas régulée par la disponibilité en acides aminés, les acides aminés régulent bien l'autophagie. En effet, l'addition des acides aminés aux cellules carencées annulent complètement l'accumulation de LC3-II dans les cellules RTH-149 et donc l'induction du flux autophagique comme ce qui est connu chez les mammifères <sup>533</sup> et les cellules primaires de truite <sup>521 534</sup>. La voie mTOR jouant un rôle important dans l'inhibition de l'autophagie et étant active dans les mêmes conditions, il est possible que l'inhibition de l'autophagie par l'ajout des AA au milieu de carence soit due à l'activation de mTOR par les AA comme ce qui a été démontré dans des cultures primaires de myoblastes de truite <sup>534</sup>. En effet, cette étude du laboratoire a montré que l'ajout de rapamycine, l'inhibiteur de mTOR, annule l'inhibition du flux autophagique par les AA. Cette inhibition de l'autophagie par mTOR semblerait donc être conservée dans la lignée RTH-149.

Nos résultats démontrent également, pour la première fois à notre connaissance, l'effet de l'arginine sur l'activation de mTOR dans un modèle poisson. En effet, nos résultats démontrent que dans les lignées RTH-149 et RTgutGC, la carence en arginine réduit drastiquement la phosphorylation de S6 et plus modérément la phosphorylation de 4EBP1 démontrant que l'arginine contribue, tout comme chez les mammifères à l'activation de mTOR dans les cellules de truites. La lysine, quant à elle, n'est pas décrite comme un activateur de la voie mTOR. Nous pouvons cependant observer une légère diminution de l'activation de la voie mTOR lors d'une carence en lysine. Il est possible que le manque de lysine, en réduisant le niveau énergétique de la cellule, induise l'activation de l'AMPK, un répresseur connu de mTOR chez les mammifères <sup>453</sup>. Ainsi, la carence en lysine conduirait indirectement à une inhibition de la voie mTOR. Il se peut également que la carence en lysine réduise l'activation de mTOR en réduisant l'activité de SLC38A9 dont l'activité de transport est diminuée par la carence en lysine, bien que son effet soit moindre comparé à celui de l'arginine <sup>207</sup>.

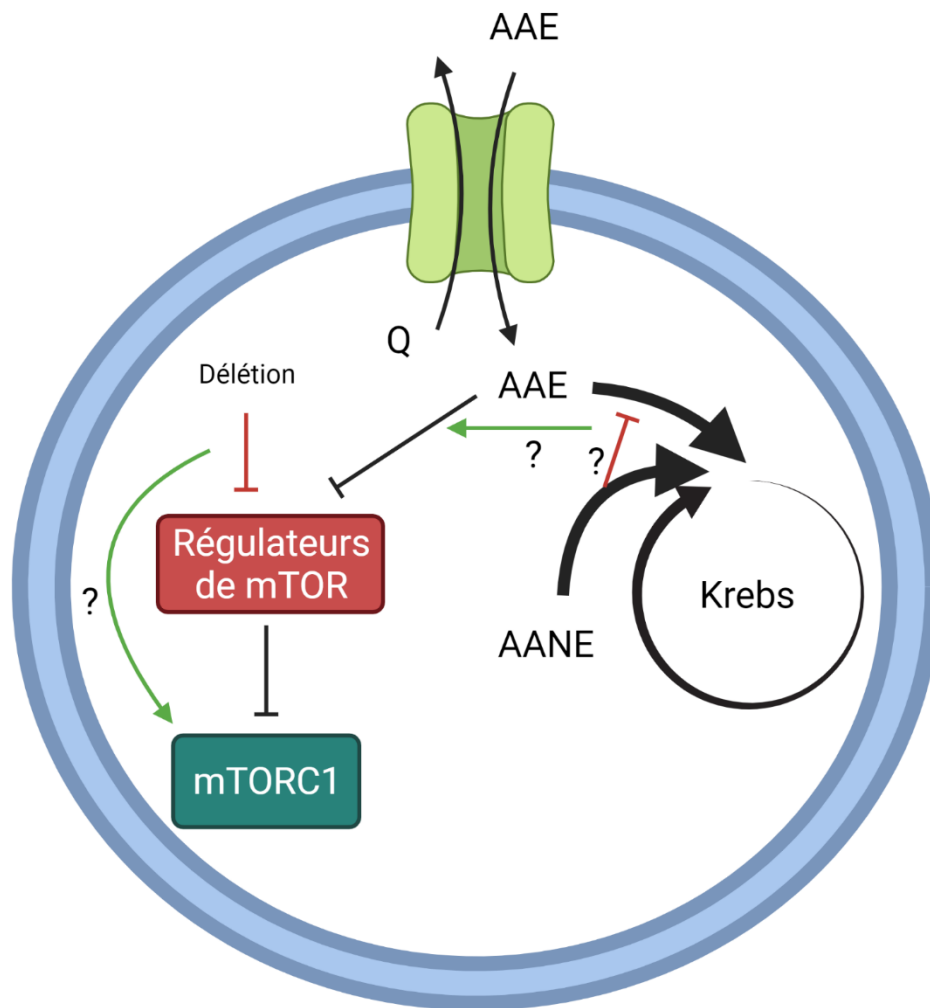
Au-delà de l'effet de la carence en acides aminés sur l'activation de la voie GCN2 et de l'autophagie, les cinétiques d'activation de ces voies sont également conservées. Des études précédentes chez des modèles mammifères ont montré que l'expression de CHOP et ASNS est maximale après 8 heures de carence <sup>535 360</sup> correspondant aux cinétiques d'expression de ces gènes dans la lignée RTH-149 en carence. Ces résultats démontrent que la cinétique d'activation de la voie GCN2 est conservée dans la lignée RTH-149. La cinétique d'induction du flux autophagique est elle aussi conservée. En effet, l'analyse du flux autophagique dans les cellules RTH-149 montre une activation maximale entre 5 et 6 heures de carence. Ces

résultats sont superposables à ceux observés chez les mammifères qui montrent une activation maximale du flux autophagique dès 6 h de carence chez la souris <sup>533</sup>. De plus, l'induction de l'autophagie suit l'inactivation de la voie mTOR à partir de 2 h de carence suggérant encore que mTOR inhibe l'autophagie dans les cellules RTH-149 comme ce qui est connu chez les mammifères notamment *via* ULK1 <sup>514</sup> et les cultures primaires de truite <sup>534</sup>.

Toutes ces observations montrent que la signalisation cellulaire relative à la carence en acides aminés, l'activation de GCN2 et de l'autophagie ainsi que l'inactivation de mTOR, dans la lignée RTH-149 sont conservées, jusqu'à leur cinétiques d'activation, comparé aux mammifère et aux cultures primaires de truite.

## b. Activation de mTOR par les acides aminés différente des modèles mammifères

Bien que la réponse à la carence semble grandement conservée dans la lignée RTH-149, l'activation de la voie mTOR par les acides aminés, bien que présentant des similitudes avec ce qui a été observé dans la lignée cellulaire humaine rénale, HEK-293, diffère sur certains points. En effet, le temps requis pour l'activation de la voie mTOR par les acides aminés est beaucoup plus long que chez les mammifères. En effet, alors que la voie mTOR atteint son activité maximale après 20 minutes de traitement avec les acides aminés chez les mammifères <sup>536</sup>, 2 heures sont requises pour une phosphorylation maximale des cibles de mTOR, S6 et 4EBP1, dans la lignée RTH-149. Il est peu probable que cette différence de réponse aux acides aminés soit due à la faible température d'incubation des cellules de truite (17°C) par rapport à celle des cellules de mammifères (37°C) les cinétiques d'activation de GCN2 et de l'autophagie ainsi que l'inactivation de mTOR par la carence étant conservées. Comme nous l'avons vu dans la partie I, la truite a un régime alimentaire riche en acides aminés dont une partie est catabolisée pour produire de l'énergie. Il est donc possible que la truite ait évolué de sorte à activer les voies anaboliques telles que mTOR, seulement lorsqu'une grande quantité d'acides aminés est disponible dans le but de pouvoir assurer la synthèse protéique quand les besoins énergétiques sont assurés par une quantité d'acides aminés suffisante. Nos résultats montrent que les acides aminés essentiels seuls ne permettent pas une activation de la voie mTOR contrairement à la combinaison de ces derniers avec les acides aminés non essentiels et à ce qui est connu chez les mammifères <sup>537 538</sup>. L'apport d'acides aminés non essentiels dans le milieu de culture, permettrait ainsi d'approvisionner les cellules en énergie, réduisant ainsi le catabolisme des acides aminés activateurs de mTOR tel que la leucine, la méthionine et l'arginine, préservant ainsi leurs concentrations intracellulaires et facilitant alors la levée de l'inhibition de mTORC1 par ces derniers (Figure 42).



**Figure 42. Perspectives concernant l'étude de l'activation de la voie mTOR**

Nos résultats montrent que les AAE seuls ne permettent pas d'activer la voie mTOR contrairement à la combinaison d'AAE et AANE. La production d'énergie reposant plus sur les AA chez la truite que chez les mammifères, il est possible que l'addition des AANE permettent de réduire le catabolisme des AAE qui pourrait alors activer mTOR plus facilement. Le pré-chargement en glutamine (Q) permet d'activer significativement l'activation de mTOR par les AAE, il est possible que le pré-chargement en Q augmente l'influx d'AAE dans les cellules permettant d'augmenter les concentrations intracellulaires en AAE alors suffisantes pour assurer à la fois la production d'énergie et l'activation de mTOR. Il est également possible que l'inhibition de mTOR par les régulateurs de mTOR sensibles aux AA soit plus importante chez la truite et que la levée de cette inhibition requiert des concentrations en AA plus importante. Afin d'explorer ces hypothèses, il serait intéressant d'alimenter le cycle de Krebs avec des AANE ou du pyruvate et observer si l'activation de mTOR par les EAA augmente. Il serait également intéressant de réguler l'expression des régulateurs négatifs de mTOR sensibles aux acides aminés, et voir si leur sous-expression permettrait de lever l'inhibition de la voie mTOR plus facilement par les AAE.

Il est également possible que l'activation plus longue de mTOR par les acides aminés soit due à un renforcement de l'inhibition du recrutement de mTORC1 à la membrane lysosomale (Figure 42) par les régulateurs des complexes Rags sensibles aux acides aminés tels que GATOR1, Sesn2, CASTOR1 et SAMTOR. L'expression de ces derniers pourrait être différente dans les cellules de truites comparé aux cellules de mammifères rendant l'activation de mTOR par les acides aminés essentiels plus difficiles.

Nous avons également observé que l'activation de la voie mTOR est grandement augmentée lorsque les cellules sont pré-chargées en glutamine comme cela a pu être démontré par Nicklin et ses collaborateurs chez les mammifères <sup>447</sup>. Chez les mammifères, le pré-chargement en glutamine facilite l'absorption de la leucine par échange avec la glutamine *via* le transporteur LAT1, qui permet l'activation de mTORC1. Le TAAC  $\gamma^+$ LAT2 étant également un échangeur utilisant la glutamine <sup>448</sup>, le pré-chargement en glutamine pourrait faciliter l'activation de mTOR en accélérant l'absorption d'AA dont l'effet sur l'activation de mTOR est confirmé par nos résultats dans les cellules RTH-149 et RTgutGC.. Cet influx soutenu d'acides aminés pourrait alors faciliter l'activation de mTOR en augmentant les concentrations intracellulaires en acides aminés levant ainsi l'inhibition de l'activation de mTOR par les régulateurs des complexes Rags ou permettant de dépasser les quantités utilisées par les cellules pour alimenter le cycle de Krebs.

### **Conclusion :**

La caractérisation de la signalisation des acides aminés dans la lignée cellulaire RTH-149 montre qu'elle partage de nombreuses caractéristiques avec les modèles mammifères et les cultures primaires de truite qu'il s'agisse de l'activation de GCN2, de l'autophagie ainsi que de l'inactivation de mTOR par la carence. Cela démontre que la signalisation des acides aminés est conservée dans les cellules RTH-149, offrant alors un nouveau modèle pour l'étude de ces voies dans la nutrition des poissons.

Bien que ces voies de signalisation cellulaires soient conservées, notre premier article a également mis en évidence des différences entre la lignée RTH-149 et les modèles mammifères. Ces différences sont plus importantes pour la voie mTOR qui présente une activation par les acides aminés 6 fois plus longue que ce qui est connu chez les mammifères ainsi qu'une activation par les acides aminés essentiels seuls plus difficile. Cette activation de la voie mTOR moins sensible aux AA dans les lignées cellulaires de truite, pourrait être une caractéristique de la truite acquise lors de l'évolution pour adapter l'activation de mTOR à son alimentation riche en protéines.

Les résultats obtenus dans les lignées RTL-W1 et RTgutGC concernant les régulations des voies mTOR, GCN2 et l'autophagie par la carence en acides aminés étant similaires à ceux obtenus dans la lignée RTH-149, cela suggère que les résultats obtenus dans la lignée RTH-149 ne lui sont pas spécifiques et semblent être des caractéristiques propres à la biologie cellulaire de la truite arc-en-ciel. Ainsi, les lignées cellulaires de truite se présenteraient comme des modèles d'études intéressants dans le cadre de la nutrition des poissons.



## Perspectives :

- Il serait intéressant de comparer les résultats obtenus dans la lignée RTgutGC avec d'autres lignées cellulaires intestinales telles que les lignées cellulaires RTdi-MI et RTpi-MI, récemment établies <sup>539</sup> afin d'identifier les régulations communes à ces lignées et déterminer quelles sont les caractéristiques qui seraient propres aux entérocytes de truite comme nous l'avons fait pour les hépatocytes avec les lignées hépatiques RTH-149 et RTL-W1.
- Bien que le foie et l'intestin jouent un rôle primordial dans l'homéostasie des acides aminés au niveau de l'organisme, le muscle représente la majorité du poids de la truite (environ 70% du poids total) et constitue le produit final à la plus haute valeur ajoutée de la filière aquacole. Malheureusement, il n'existe, à notre connaissance, aucune lignée cellulaire dérivée de myocyte de truite actuellement. L'établissement d'une telle lignée serait d'un grand intérêt pour la compréhension de la régulation de l'anabolisme et du catabolisme des acides aminés au niveau des muscles.
- Il serait également intéressant de réitérer les expérimentations sur l'activation de la voie mTOR par les acides aminés dans d'autres lignées cellulaires dont l'activation de la voie mTOR est accélérée afin de déterminer, par comparaison avec les lignées cellulaires utilisées lors de cette étude, quelles sont les raisons de la lente activation de mTOR observée.
- Afin d'étudier l'hypothèse d'une inhibition de mTORC1 plus importante par les inhibiteurs de mTOR sensibles aux AA, il serait intéressant d'étudier leur expression dans les cellules (en cours d'étude au laboratoire). Il est possible que certaines protéines activant la voie mTOR soient exprimés différemment ou que les inhibiteurs soient plus exprimés dans les cellules de truite augmentant leur effet inhibiteur sur mTOR comparé aux mammifères. Après avoir identifié ces régulateurs de mTOR, il serait intéressant d'inhiber ou même de réduire ou supprimer leur expression par manipulation génétique et observer si la diminution de leur expression permet d'augmenter l'activation de la voie mTOR (Figure 42).
- Nos résultats démontrant un effet significatif des AAC sur l'activation de mTOR, il serait intéressant de caractériser plus finement le transporteur SLC38A9, notamment concernant ses activités et spécificités de transport. Finalement, il serait également intéressant de supprimer son expression dans les lignées cellulaires de truite afin d'évaluer son degré d'implication dans l'activation de la voie mTOR par les AAC et comparer les effets de cette délétion sur la physiologie des cellules comme nous l'avons fait par des carences en arginine et lysine.
- Il serait également intéressant d'étudier l'effet du catabolisme des acides aminés sur l'activation de mTOR. Il serait possible d'alimenter le cycle de Krebs en augmentant les concentrations d'autres acides aminés tels que les acides aminés non essentiels ou d'autres composés comme le pyruvate afin de réduire le catabolisme des acides aminés activateurs de mTOR (Figure 42). L'approche inverse serait également possible en réduisant la concentration en pyruvate classiquement supplémenté dans les milieux de cultures et observer l'effet sur le catabolisme des acides aminés en mesurant les

concentrations des produits du catabolisme des AA comme l'ammonium ainsi que sur l'activation de la voie mTOR.

## B- Expression des TAACs chez la truite

### a. De nombreux paralogues des TAACS exprimés chez la truite

Jusqu'à aujourd'hui peu d'études se sont intéressées aux transporteurs d'acides aminés chez la truite arc-en-ciel et chez les poissons en général. Leur expression a pu, pour certains, être mesurée dans des études transcriptomiques telles que celles s'intéressant à l'impact des aliments végétaux sur l'expression des gènes chez la truite mais sans intérêt direct pour les transporteurs et ne s'intéressant pas aux différents gènes paralogues existant chez la truite. Bien que, très récemment, lors de ces 3 années de thèse, des études se sont intéressées aux transporteurs d'acides aminés chez la truite<sup>540 265</sup>, celles-ci se sont concentrées sur quelques transporteurs choisis. Ainsi, une étude récente s'est intéressée à l'absorption intestinale de méthionine et a tenté de déterminer par quels transporteurs d'AA était absorbée la méthionine<sup>540</sup>. Les transporteurs responsables de l'absorption intestinale de méthionine n'ont pas été formellement identifiés dans les modèles mammifères et aviaires bien que la communauté scientifique soupçonne que des TAACs y jouent un rôle<sup>541</sup>. To est ses collaborateurs se sont alors intéressés à certains TAACs sans étudier l'ensemble des TAACs connus chez les mammifères. De plus pour les TAACS étudiés, l'étude est parfois même passée à côté de certains gènes présents dans le génome de la truite tel que rBAT (SLC3A1) que nous avons retrouvé dans le génome de la truite, en identifiant pour autant l'autre sous-unité du transporteur rBAT/b<sup>0,+</sup>AT, SLC7A9 et sans identifier les paralogues des différents TAACs<sup>540</sup>. Ils ont ensuite mesuré les flux de méthionine à travers les entérocytes et en ont déduit par quels transporteurs était absorbée la méthionine par corrélation avec l'expression des quelques transporteurs d'AA analysés. Une vision d'ensemble des TAACs exprimés dans leur modèle d'étude aurait certainement permis d'affiner/confirmer leur modèle dans lequel ils ont « identifiés » les transporteurs impliqués dans l'absorption de la méthionine. Ainsi, suite aux travaux conduits au cours de cette thèse, l'utilisation future d'approches in vitro permettra de préciser ce modèle, en mesurant notamment les flux d'AA dans des conditions expérimentales mieux contrôlées tout en considérant la sous-famille des TAACs dans sa globalité.

Lors de cette thèse, nous avons commencé par identifier les orthologues aux transporteurs d'acides aminés cationiques humains présents dans le génome de la truite. Nous avons ainsi identifié 42 gènes orthologues à 16 des 17 gènes codant pour des transporteurs d'acides aminés cationiques chez l'homme, aucun gène orthologue pour ORNT2 n'ayant été identifié dans le génome de la truite. Le nombre de gènes identifiés dans le génome est environ 2,5 fois plus important que chez l'homme, probablement dû aux duplications complètes du génome spécifiques aux téléostéens et aux salmonidés, et au fractionnement du génome suivant la dernière duplication complète du génome. Alors que pour certains transporteurs d'acides aminés cationiques, un seul gène homologue existe chez la truite, pour d'autres, tel que SLC7A6, le nombre de paralogues peut atteindre 5 copies.

Nous avons ensuite testé leur expression dans un pool de tissus constitué d'intestin, foie, muscle, rein et ovaire dans le but d'identifier les gènes exprimés chez la truite adulte. Nous avons également tester l'expression des homologues de SLC7A4 et SLC7A14 dans un mélange d'ARN provenant du cerveau et de l'hypophyse, les 2 tissus pour lesquels l'expression des paralogues de ces TAACs est spécifique au cerveau et l'hypophyse dans la base de donnée Phylofish<sup>542</sup>. Sur les 42 gènes identifiés dans le génome de la truite, 28 gènes sont exprimés dans les tissus, soit un tiers d'entre eux, ce qui correspond aux estimations relatives aux gènes ayant connu une perte de leur expression suivant la duplication du génome des salmonidés chez la truite<sup>16</sup>. Cependant l'étude de l'expression des TAACs identifiés, est en cours dans le foie, le muscle, les caeca pyloriques, l'intestin proximal et distal chez des truites. En effet, alors que l'expression de certains TAACs chez les mammifères est très spécifique à certains tissus à l'image de CAT3 qui est exprimé seulement durant le développement ou dans le cerveau<sup>152</sup><sup>151</sup><sup>153</sup>, 3 paralogues de celui-ci sont exprimés chez la truite juvénile et dans des tissus autres que le cerveau démontrant des divergences d'expression tissulaire de ces transporteurs chez la truite comparé aux mammifères et donc une possible néo-fonctionalisation. En outre, le nombre plus élevé de transporteurs pose la question de leur redondance dans les cellules de truite et de la régulation de l'expression de ces transporteurs. Il est cependant possible que les différents paralogues aient des affinités et des capacités de transport différentes permettant d'affiner l'absorption des acides aminés cationiques en fonction des conditions environnementales et d'adapter l'absorption des AA aux besoins élevés en AA de la truite.

### b. Expressions dans les lignées cellulaires de truite

Nous avons identifié les différents transporteurs exprimés dans les lignées cellulaires de truite : RTH-149, RTL-W1 et RTgutGC. Plusieurs paralogues d'un même transporteur sont surexprimés à l'image de CAT3 dont 3 paralogues sont exprimés dans les lignées cellulaires de truite ainsi que 2 paralogues de CAT1 qui chez les mammifères présentent des mécanismes de transport similaires et redondantes, posant la question de l'utilité d'exprimer tous ces transporteurs dans les cellules et comment ils interagissent entre eux.

En outre, de façon surprenante, ces 3 lignées expriment exactement les 16 même TAACs bien qu'elles proviennent de tissus différents (foie ou intestin) ainsi qu'ayant été immortalisées selon des processus différents (cellules cancéreuses pour les cellules RTH-149 ou cellules immortalisées ex vivo spontanément pour les lignées RTL-W1 et RTgutGC). Ainsi, ces 3 lignées cellulaires de truite n'expriment pas de gènes homologues de SLC3A1, SLC7A9, SLC6A14, SLC7A7 et CAT2. Compte tenu de l'expression de ces transporteurs chez les mammifères, il est étonnant que les RTgutGC n'expriment pas de paralogues des TAACs de la face apicale SLC3A1, SLC7A9 et SLC6A14 et l'échangeur d'AA de la face basolatérale SLC7A7 mais également que les lignées hépatiques n'expriment pas CAT2 qui est pourtant spécifique du foie chez les mammifères. Il est possible que l'expression tissulaire de ces TAACs soit différente chez la truite, comme pour CAT3 qui est exprimé dans d'autres tissus que le cerveau dont il est spécifique chez la souris et le rat<sup>152</sup>.

Le fait que les 3 lignées cellulaires expriment exactement le même jeu de TAAC pourrait être également dû au processus de transformation de ces cellules. Il est possible que l'expression

de ces TAACs soit favorable à la prolifération plus importante des lignées cellulaires en permettant un apport optimisé en AAC aux cellules. En effet,  $\gamma$ -LAT2, qui n'est pas censé être exprimé dans les hépatocytes d'après les données obtenues chez les mammifères, est exprimé dans les lignées hépatiques de truite RTH-149 et RTL-W1. Il est possible que son expression dans les lignées cellulaires hépatiques RTH-149 et RTL-W1 soit due à l'immortalisation des cellules,  $\gamma$ -LAT2 étant un des TAACs les plus fréquemment surexprimés dans les lignées cellulaires cancéreuses humaines<sup>543</sup>. Il est également possible que la perte d'expression de certains transporteurs dans ces lignées cellulaires réduise l'induction de processus de mort cellulaire, contribuant à leur immortalisation. En effet, nos résultats montrent qu'une activation soutenue de la voie GCN2 avec l'halofuginone qui réprime les surexpressions d'*asns* et *xbp1* observées à des doses plus faibles, induit la surexpression de CHOP et également de certains TAACs. Le maintien de l'expression de CHOP par l'ISR, induisant l'apoptose chez les mammifères<sup>335,337</sup>, il est donc possible que l'expression de certains TAACs dont les régulations de l'expression suivent celle de CHOP lors de l'activation soutenue de GCN2 par l'halofuginone, soient impliqués dans l'apoptose ou accompagnent la mort cellulaire.

Nos conditions expérimentales lors de cette étude pourraient également être à l'origine de la non expression de certains TAACs. En effet, une des contraintes du modèle *in vitro*, qui est aussi une de ses forces, est que les cellules ne sont pas exposées aux différentes régulations systémiques qui sont présentes dans l'organisme. L'expression de certains transporteurs étant soumise aux facteurs de croissance et aux hormones, l'absence de certains d'entre eux dans le milieu de culture pourrait alors empêcher l'expression de certains TAACs. En effet, il a été montré que l'expression de *slc7a9* chez le tilapia (*Oreochromis mossambicus*) est réduite drastiquement dans l'intestin suite à l'ablation de l'hypophyse<sup>544</sup>, suggérant que la régulation de l'expression de *slc7a9* est hormonale dans l'intestin des poissons. Il se peut également que certains de ces TAACs soient régulés par les cytokines pro-inflammatoires comme CAT2-B et SLC7A7 dans les macrophages des mammifères<sup>149 221</sup>.

### **Conclusions :**

Notre étude a permis d'identifier les différents TAACs présents chez la truite et d'établir la liste des différents gènes paralogues exprimés dans les tissus d'intérêt pour notre étude, le foie et l'intestin. Étonnamment, les 3 lignées cellulaires utilisées lors de cette thèse exprimant les mêmes transporteurs d'acides aminés, il est possible que ces transporteurs permettent une absorption plus importante d'acides aminés et soient sélectionnés lors de l'immortalisation des cellules afin de répondre aux besoins en acides aminés plus importants des cellules immortalisées.

### **Perspectives :**

- Certains TAACs n'étant pas exprimés dans nos conditions expérimentales, il serait intéressant d'étudier l'effet des facteurs de croissance, hormones et notamment des cytokines pro-inflammatoires sur l'expression des TAACs dans les lignées cellulaires, sachant que les aliments végétaux induisent une inflammation de l'intestin chez les truites.

- Les différentes parties de l'intestin ayant des capacités d'absorption des AA différentes et exprimant des transporteurs d'acides aminés différents, il serait intéressant d'analyser l'expression des TAACs dans les lignées RTdi-MI et RTpi-MI qui sont respectivement dérivées des parties distale et proximale de l'intestin <sup>539</sup> et de comparer ces résultats avec ceux obtenus dans la lignée RTgutGC afin de mettre en évidence de possibles différences entre ces deux parties de l'intestin.
- Lors de cette étude, nous nous sommes concentrés sur l'expression des TAACs. Les TAACs présentant peu d'homologie avec leurs homologues humains, il faut maintenant caractériser leurs rôles et activités de transport (affinité, capacité, dépendance aux ions) afin de déterminer si ceux-ci sont similaires à ceux observés chez les mammifères. La délétion de TAACs d'intérêt tel qu'*y<sup>+</sup>lat2*, combinée à l'utilisation d'inhibiteurs, pourra nous permettre d'étudier leurs impacts sur les voies régulées par les AA, mTOR, GCN2 et l'autophagie ainsi que leurs activités de transport. L'étude des activités de transport des TAACs non exprimés dans les lignées cellulaires tels que CAT2 sera potentiellement possible en induisant leur expression, de façon ectopique, dans les lignées cellulaires.
- Dans le but de caractériser finement les activités de transport des TAACs de truite, il pourrait alors être intéressant d'exprimer ceux-ci dans des oocytes de xénope, à l'image de ce qui a été réalisé pour les transporteurs d'acides aminés d'autres espèces.
- Finalement, dans cette étude nous avons concentré nos efforts sur les TAACs. Ceux-ci ne représentent qu'à peine un quart de la totalité des transporteurs d'acides aminés chez les mammifères. Il sera donc intéressant de continuer la caractérisation de l'expression de l'ensemble des transporteurs chez la truite, notamment de transporteurs d'AA neutres qui pourrait contribuer indirectement à l'absorption des AAC en permettant leur échange via les transporteurs *y<sup>+</sup>lat*. La caractérisation de l'expression de l'ensemble des transporteurs d'AA représente également un des sujets qui est développé actuellement au laboratoire.

## C- La carence en AA induit la surexpression de TAACs

### a. Expression des TAACs par la carence en acides aminés

L'utilisation des lignées cellulaires de truite nous a permis d'étudier les régulations de l'expression des TAACs exprimés lors de carences en acides aminés. Ainsi, nous avons observé qu'en situation de carence, les cellules RTH-149, RTL-W1 et RTgutGC surexpriment des TAACs également décrits chez les mammifères pour suivre des régulations similaires tels que CAT1, 4F2hc et PQLC2 <sup>271 545</sup> ainsi que des gènes homologues de TAACs pour lesquels aucune surexpression n'a été observé en carence à notre connaissance tels que CAT3, ORNT1 et SLC7A6. De plus, l'ajout d'acides aminés au milieu de carence supprime la surexpression de ces transporteurs démontrant que la carence en acides aminés est responsable de leur surexpression. Ces mêmes TAACs, sont également surexprimés par les carences spécifiques en arginine et/ou lysine. Les 3 lignées surexpriment globalement les mêmes TAACs lors d'une carence en acides aminés, avec seulement quelques différences comme la surexpression de paralogues différents d'un même TAAC entre les différentes lignées. Les résultats similaires entre les 3 lignées renforcent la possibilité que la surexpression de ces TAACs par la carence

en acides aminés s'opère également *in vivo*. La surexpression des CATs et des gènes codant pour  $\gamma^+$ LAT2 lors des carences en lysine et arginine supporte notre hypothèse selon laquelle la surexpression de CAT2 et SLC7A6 chez les truites nourries avec des aliments végétaux supplémentés en R et K libres<sup>524,525</sup> serait due à une carence en arginine et/ou lysine.

### b. Surexpression par la voie GCN2

Après avoir identifié les TAACs surexprimés par la carence en acides aminés, nous voulions savoir si, tout comme notre hypothèse de travail le propose, leur surexpression est induite par la voie GCN2. Nous avons alors induit pharmacologiquement l'activation de la voie GCN2 et ce, dans un milieu complet afin de se prémunir des réponses à la carence en AA indépendantes de la voies GCN2. L'activation de la voie GCN2 dans les 3 lignées cellulaires induit la surexpression des TAACs surexprimés par la carence en acides aminés. En outre, nous avons observé une suppression de la surexpression des TAACs induits par l'halofuginone en augmentant la concentration de cette dernière tout comme les gènes cibles de la voie GCN2, supportant l'hypothèse que l'expression de ces TAACs est bien sous la dépendance de la voie GCN2. De plus, une autre observation concernant l'expression des TAACs supporte cette hypothèse. En effet, les TAACs surexprimés par la carence en AA et l'halofuginone sont également surexprimés par la carence spécifique en lysine tout comme les gènes cibles de GCN2 dans les lignées cellulaires RTH-149 et RTgutGC. De manière intéressante, la carence spécifique en arginine induit la surexpression des gènes cibles de GCN2 dans les cellules RTH-149 mais pas dans les cellules RTgutGC, suggérant que la voie GCN2 n'est pas activée par une carence en arginine dans les cellules RTgutGC. Parallèlement, la carence en arginine n'induit la surexpression des TAACs, identifiés comme étant des cibles potentielles de GCN2, uniquement dans les cellules RTH-149, constituant un argument supplémentaire supportant fortement l'hypothèse de l'implication de la voie GCN2 dans la surexpression des TAACs par GCN2 lors de la carence en acides aminés.

### Conclusions :

Les résultats démontrent que des paralogues de CAT1, CAT3, 4F2hc, SLC7A6, ORNT1 et PQLC2 sont surexprimés par la carence en acides aminés dans les lignées cellulaires de truite et suggèrent fortement que ces TAACS sont surexprimés par la voie GCN2. Ces TAACs pourront potentiellement être utilisés en tant que marqueurs d'une carence en acides aminés à l'avenir chez la truite comme peut l'être CAT1 chez les mammifères.

De plus, les résultats obtenus dans ces lignées cellulaires démontrent que la surexpression d' $\gamma^+$ LAT2, mais également des CATs (des proches homologues de CAT2), est induite par la carence en arginine et lysine et ce, probablement via la voie GCN2. Ainsi, ces observations *in vitro* supporte notre hypothèse selon laquelle CHOP,  $\gamma^+$ LAT2 et CAT2 seraient surexprimés *via* la voie GCN2 par la carence en arginine et lysine chez les truites nourries avec des aliments végétaux bien que ces AAC soient supplémentés sous forme libre.

## Perspectives :

- Premièrement, l'expression des CAATs n'étant pas exclusivement régulée par une carence en leur substrat, il serait intéressant d'étudier les effets de la carence en d'autres acides aminés telle que la méthionine, qui est également souvent ajoutée sous forme libre aux aliments végétaux, sur l'expression des TAACs et dont l'absorption pourrait être en partie effectuée par des TAACs <sup>541</sup>.
- Nos résultats suggérant fortement que la surexpression des TAACs est induite via l'activation de GCN2, nous ne pouvons cependant pas confirmer l'implication de la voie GCN2. Nous pourrions étudier l'expression des TAACS en utilisant d'autres activateurs et inhibiteurs pharmacologiques de GCN2 et de l'ISR afin de supporter d'avantage cette hypothèse. Ainsi, nous pourrions utiliser l'histidinol, un autre activateur de GCN2, et comparer ces résultats avec ceux obtenus avec l'utilisation de l'halofuginone (Figure 43). De même, l'inhibition de l'ISR par l'ISRIB (ISR InhiBitor), qui réduit la phosphorylation de eIF2 $\alpha$  par GCN2 et les autres kinases, nous permettra de déterminer si cet inhibiteur réduirait l'expression des TAACs lors de la carence (Figure 43). Finalement, afin de confirmer que la surexpression des TAACs est induite par l'activation de la voie GCN2, il faudrait supprimer l'expression de GCN2 dans les lignées cellulaires de truite par manipulation génétique et voir si la carence en AA induit toujours la surexpression des TAACs (Figure 43).
- Sachant que le stress du RE induit la surexpression de CAT1 chez les mammifères et que les marqueurs de l'ISR que nous avons utilisé dans cette étude peuvent être induit à la fois par GCN2 et PERK <sup>546</sup>, il serait également intéressant de savoir si l'UPR joue un rôle dans la surexpression des TAACs chez la truite en activant cette voie pharmacologiquement avec de la tunicamycine et/ou de la thapsigargine. De même, comme nous l'avons vu dans l'introduction, chez les mammifères, l'expression de certains TAACs tels que  $\gamma^+$ LAT1 et CAT2-B peut être également induite par l'inflammation. Les aliments végétaux pouvant provoquer une inflammation de l'intestin notamment, il serait intéressant de voir si les cytokines pro-inflammatoires induisent l'expression de certains TAACs dans les lignées cellulaires de truite. L'analyse de l'effet du stress du RE et de l'inflammation permettrait de voir si la surexpression des TAACs observés chez des truites nourries avec des aliments végétaux pourraient constituer de nouveaux marqueurs permettant d'identifier différents stress induit par ces aliments à base de végétaux.

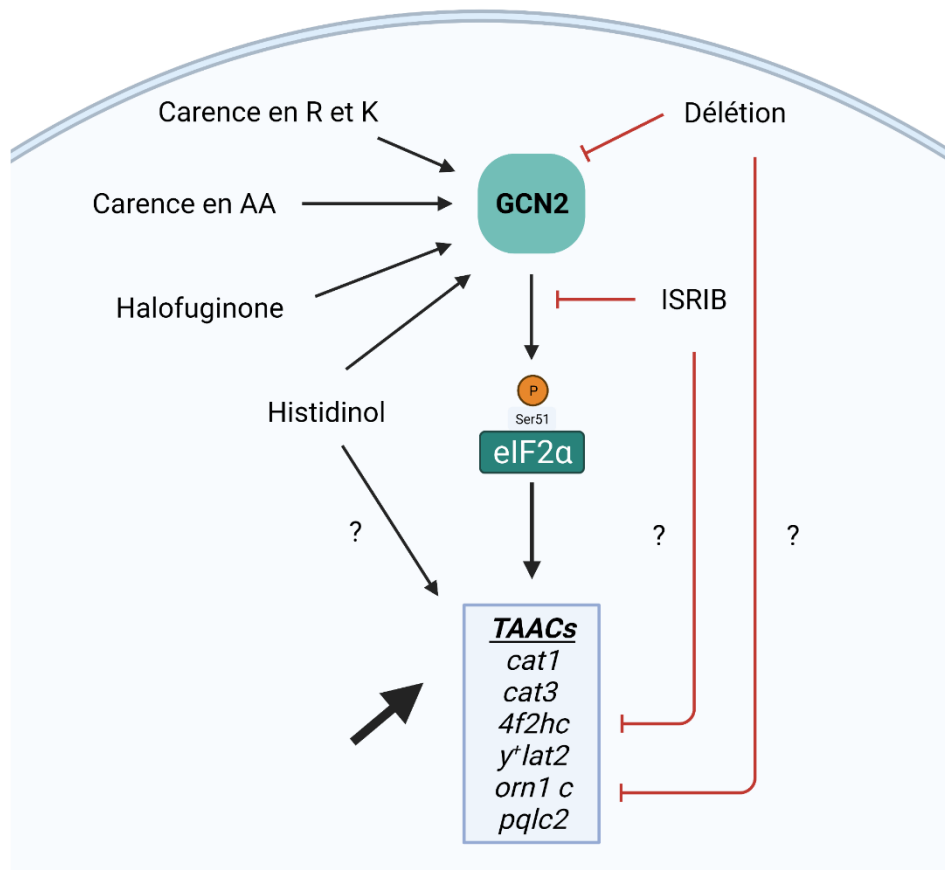


Figure 43. Perspectives d'étude du rôle de la voie GCN2 dans l'expression des TAACs

## D- L'arginine, un acide aminé essentiel ?

### a. Effets étonnants sur la prolifération cellulaire

Dans le but de savoir si la carence en arginine et lysine pourrait être à l'origine du ralentissement de la croissance des truites nourries avec des aliments végétaux, comme nous le proposons dans notre hypothèse de travail, nous avons étudié les effets d'une carence en ces AAC sur la prolifération cellulaire. Premièrement, nos résultats montrent que les cellules RTH-149, RTL-W1 et RTgutGC ne prolifèrent pas ou très peu en absence de lysine. Cela n'a rien d'étonnant, la lysine étant un acide aminé essentiel chez la truite comme chez les mammifères. Des résultats plus surprenants ont cependant été obtenus pour la carence en arginine. En effet, bien que la carence en arginine réduise l'activation de mTOR qui promeut la prolifération cellulaire, la carence en arginine n'a aucun effet sur la prolifération des 3 lignées cellulaires étudiées. Alors que l'arginine est considérée comme semi-essentielle chez les mammifères, c'est-à-dire essentielle seulement dans certaines conditions qui augmentent les besoins en arginine, telles que le développement ou une infection, chez la truite, elle est considérée comme essentielle <sup>547</sup>. Cela s'explique par une synthèse *de novo* d'arginine très limitée chez la truite, ne permettant pas de couvrir ses besoins. Ce défaut de synthèse s'explique notamment par un cycle de l'urée incomplet. En effet, la truite adulte ne peut



synthétiser de carbamoyl-phosphate qui est une molécule intermédiaire du cycle de l'urée permettant la synthèse de citrulline à partir de l'ornithine. L'enzyme permettant sa synthèse, la carbamoylphosphate synthetase (CPS), n'est pas exprimée chez la truite adulte mais seulement chez les alevins<sup>548</sup>. Alors que les alevins se servent du cycle de l'urée pour éviter l'accumulation d'ammonium due aux catabolisme des acides aminés d'une façon similaire à ce qui est connu chez les animaux urotéliques tels que les mammifères<sup>549</sup>, les stades de développement ultérieurs excrètent directement l'ammonium par les branchies<sup>550</sup><sup>34</sup>. Il est donc possible que le processus d'immortalisation des lignées cellulaires ait permis l'expression de CPS, permettant ainsi un cycle de l'urée complet permettant la synthèse *de novo* d'arginine.

### **Conclusions :**

Lors de ce projet de thèse nous avons démontré que l'arginine joue bien un effet dans l'activation de mTOR chez la truite, comme cela est connu chez les mammifères. La carence en lysine quant à elle pourrait légèrement inhiber la voie mTOR.

Comme attendu, la carence en lysine, qui est un acide aminé essentiel, empêche la prolifération des lignées cellulaires. Etonnamment, la carence en arginine, bien qu'elle réduise l'activation de mTOR, n'a aucun effet sur la prolifération de ces lignées cellulaires. Il est possible que ces lignées cellulaires expriment CPS et possède alors un cycle de l'urée complètement fonctionnel permettant la synthèse *de novo* d'arginine contrairement aux truites adultes.

### **Perspectives :**

- Le cycle de l'urée pouvant être fonctionnel dans les lignées cellulaires de truite, il serait intéressant de premièrement déterminer si l'enzyme CPS, qui catalyse une étape limitante de la production d'arginine dans le cycle de l'urée chez la truite, est exprimée dans les lignées cellulaires de truite.
- Si CPS est exprimée dans ces lignées cellulaires, sa délétion génétique dans des cellules exposées à une carence en arginine permettrait de déterminer si la prolifération cellulaire est due à une synthèse *de novo* d'arginine via le cycle de l'urée.

## Conclusion générale

### La supplémentation d'acides aminés cationiques libres

Au cours de cette thèse nous avons identifié les différents gènes paralogues des TAACs, présents dans le génome de la truite et exprimés dans différents tissus tels que l'intestin, le foie, le muscle et les reins. Grâce à l'utilisation des lignées cellulaires de truite, nous avons également démontré que certains TAACs sont surexprimés par la carence en AA ainsi que par la carence spécifique en arginine et lysine (Figure 44). Leur surexpression suit celle des gènes cibles de l'ISR, dont *chop*, et est induite par l'halofuginone, un activateur de la voie GCN2, suggérant que la surexpression des TAACs est contrôlée par la voie GCN2. Ces résultats valident notre hypothèse de travail qui propose que la surexpression de *chop* et des transporteurs *cat2* et *y<sup>+</sup>lat2* chez les truites nourries avec des aliments végétaux serait induite par une carence en acides aminés cationiques bien qu'ils soient supplémentés sous forme libre à ces aliments (Figure 44). Il est donc possible que les acides aminés ajoutés sous forme libre aux aliments végétaux soient inefficacement absorbés par les truites.

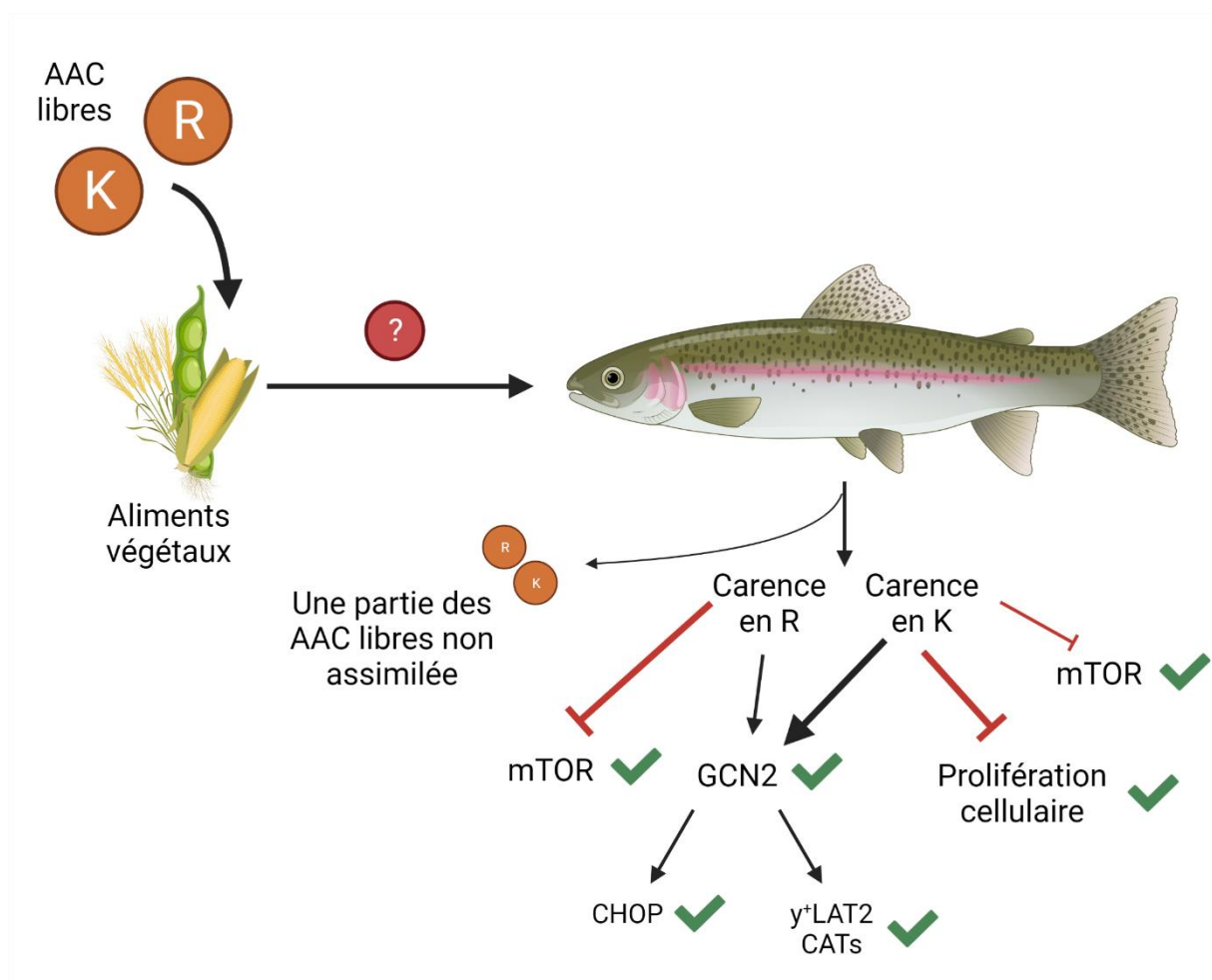
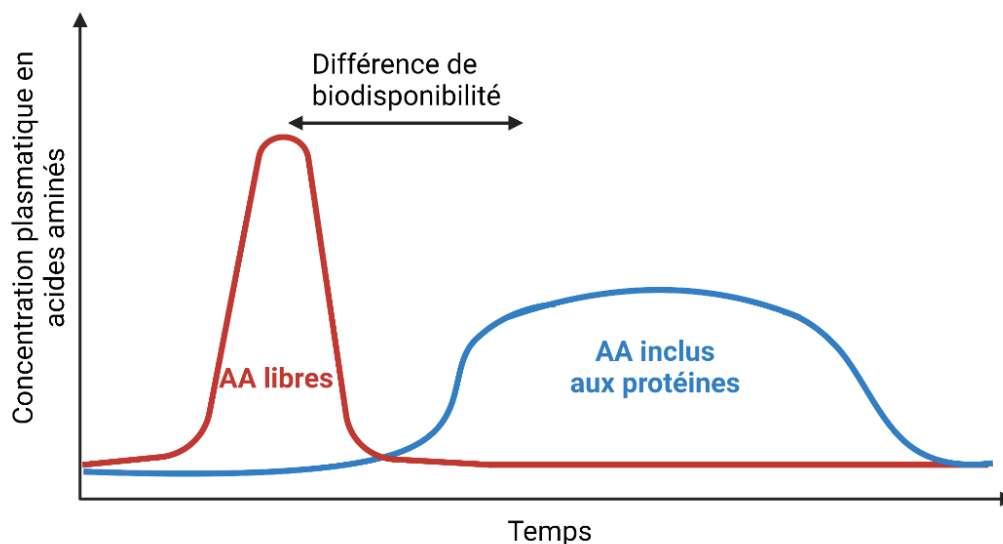


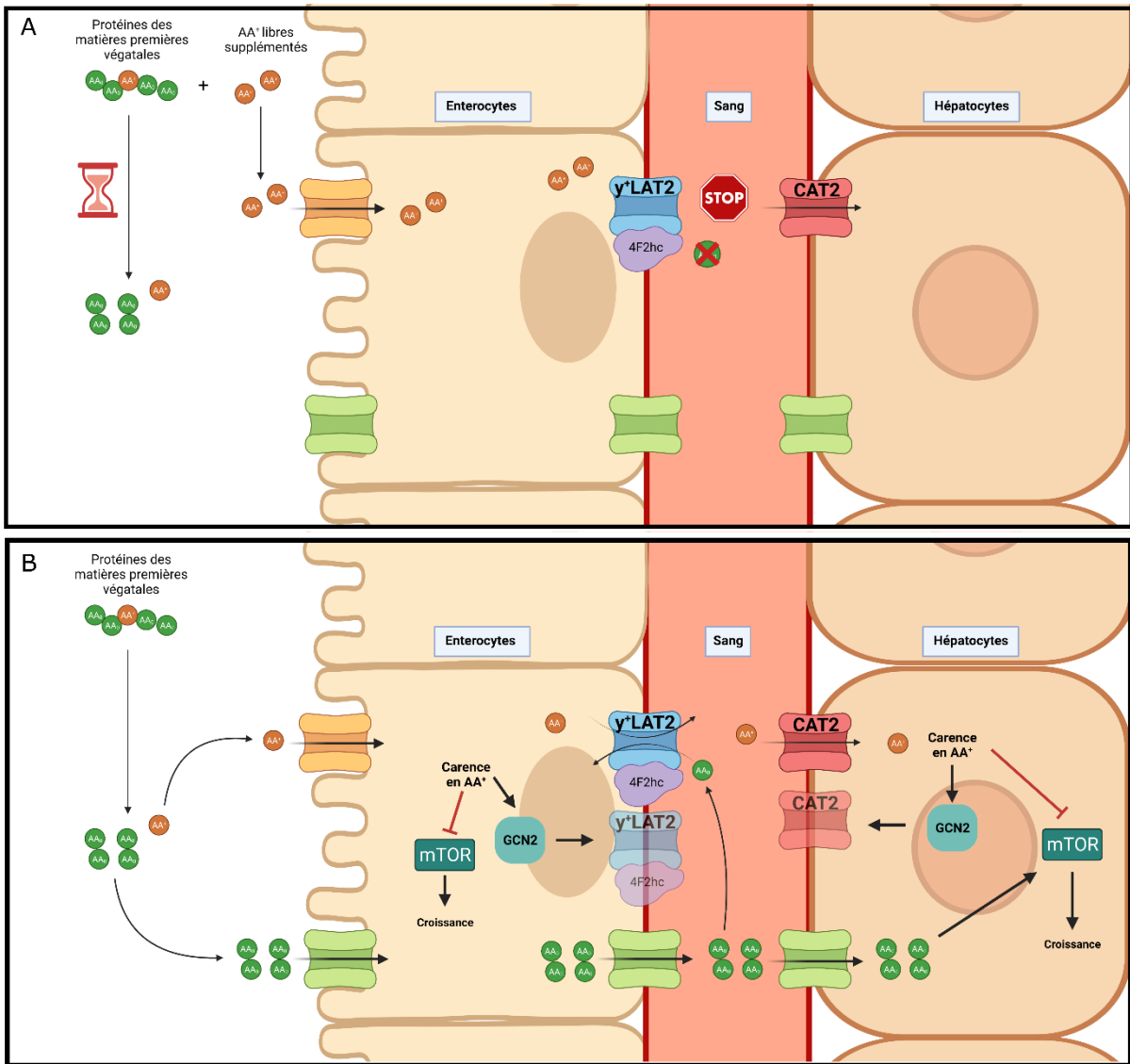
Figure 44. Comparaison des résultats obtenus avec notre hypothèse de travail

Certains indices suggèrent que l'absorption des acides aminés libres est différente de celle des acides aminés inclus dans les protéines, ce qui pourrait affecter leur métabolisation par les poissons. En effet, différentes études ont montré que les acides aminés libres étaient plus rapidement absorbés et transportés vers le plasma, atteignant un pic de concentration entre 9 et 18 h après le dernier repas, que les acides aminés inclus aux protéines dont le pic de concentration est atteint après 18 h <sup>551 552 553</sup>. De plus, ces mêmes études montrent également que la concentration des acides aminés supplémentés sous forme libre revient au niveau basal plus rapidement que les acides aminés inclus aux protéines dont les pics de concentrations sont plus faibles mais plus soutenus dans le temps. Il semble que l'apport d'acides aminés par la digestion de protéines permettrait une absorption des acides aminés plus lente qui favoriserait l'anabolisme alors que l'absorption rapide d'acides aminés libres induirait de fortes concentrations plasmatiques (Figure 45). Cela induirait une différence de biodisponibilité favorisant le catabolisme ou l'élimination des AA libres.



**Figure 45. Différence de cinétique d'absorption entre acides aminés libres et inclus aux protéines**

On peut alors supposer que cette différence de biodisponibilité entre les acides aminés libres ajoutés aux aliments à base de plantes et les acides aminés inclus dans les protéines pourrait perturber les processus anaboliques régulés par les acides aminés et induire le catabolisme des AA libres ajoutés aux aliments piscicoles et donc finalement un déséquilibre en ces derniers. De façon similaire, Brezas et Hardy ont récemment montré qu'une supplémentation en certains AAE libres (lysine et méthionine) affecte les cinétiques d'absorption de tous les AAE <sup>554</sup>, ce qui dans nos protocoles d'élevages actuels, conduirait à induire un déséquilibre en acides aminés chez les poissons nourries avec des aliments constitués de protéines et d'acides aminés libres.



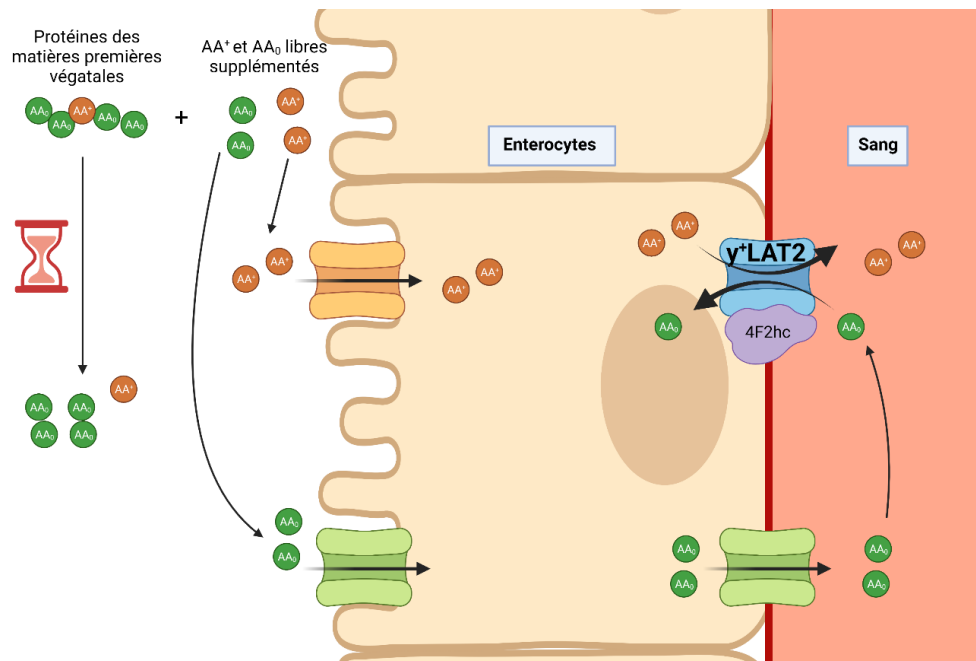
**Figure 46. Hypothèse sur le défaut d'absorption des AAC libres**

- (A) Les protéines de plantes doivent être digérées préalablement à l'absorption des AA qui les constituent alors que les AAC libres (AA<sup>+</sup>) sont absorbés plus rapidement. Les AA neutres (AA<sub>0</sub>) inclus aux protéines ne sont absorbés que plus tard et les concentrations plasmatiques en AA<sub>0</sub> sont insuffisantes pour permettre l'échange contre les AA<sup>+</sup> via γ<sup>+</sup>LAT2. Ne pouvant être transportés vers le plasma, les AA<sup>+</sup> seraient catabolisés par les entérocytes ou excrétés dans la lumière intestinale.
- (B) Une fois les protéines des aliments végétaux digérées, les AA<sub>0</sub> et la quantité limitée d'AA<sup>+</sup> qu'elles contiennent sont absorbés par les entérocytes. Le transport des AA<sub>0</sub> vers le plasma augmente leur concentration plasmatique permettant l'efflux des AA<sup>+</sup> des entérocytes vers le plasma par échange avec les AA<sub>0</sub> via γ<sup>+</sup>LAT2. La quantité réduite d'AA<sup>+</sup> absorbés diminuerait alors l'activité de mTOR et la croissance et activerait la voie GCN2 induisant la surexpression d'γ<sup>+</sup>LAT2 et CAT2.

De façon intéressante, l'un des 2 TAACs surexprimés, γ<sup>+</sup>LAT2, est un échangeur d'AAC contre des acides aminés neutres<sup>555</sup> connu pour être exprimé à la membrane basolatérale des entérocytes chez les mammifères. Les transporteurs γ<sup>+</sup>LATs étant les seuls TAACs connus

permettant l'efflux d'AAC des entérocytes vers le plasma, il est tentant de supposer que les différences d'absorption entre les AA neutres inclus aux protéines des aliments végétaux et les AAC qui y sont ajoutés sous forme libre pourraient affecter l'échange par les transporteurs  $\gamma^+$ LATs dans les entérocytes et diminuer l'efficacité de leur absorption intestinale (Figure 46 A).

Les AAC libres seraient alors absorbés plus rapidement par les entérocytes que les acides aminés neutres inclus aux protéines de plantes. La concentration plasmatique en acides aminés neutres étant insuffisante, leur échange avec les AAC via  $\gamma^+$ LAT2 serait limité et le transport des AAC vers le plasma moins efficace. Ne pouvant être transportés vers le plasma les AAC seraient alors catabolisés par les entérocytes (Figure 46). Les acides aminés provenant des protéines de l'aliment végétal contenant des AA cationiques et des AA neutres seraient absorbés plus tard par les entérocytes. La concentration en acides aminés neutres étant suffisante dans le plasma après leur absorption, ils pourraient alors être échangés contre les AAC par  $\gamma^+$ LAT2. Cependant la quantité limitée d'AAC des aliments végétaux réduirait l'activation de voies anaboliques telle que mTOR et la croissance des truites (Figure 46 B).



**Figure 47. Hypothèse de l'ajout d'acides aminés neutres aux aliments végétaux pour améliorer l'absorption des acides aminés cationiques libres**

La supplémentation en acides aminés neutres (AA<sub>0</sub>) en plus de la supplémentation des acides aminés cationiques (AA<sup>+</sup>) aux aliments végétaux pourrait permettre l'absorption d'AA<sup>+</sup> avec les AA<sub>0</sub> par les entérocytes avant la digestion des protéines de plantes. Cela pourrait permettre d'augmenter la concentration plasmatique en AA<sub>0</sub> permettant l'échange des AA<sup>+</sup> contre les AA<sub>0</sub> par  $\gamma^+$ LAT2 alors que les protéines des matières végétales ne sont pas encore digérées. Ceci pourrait alors permettre une meilleure assimilation des AA<sup>+</sup> libres par les truites et améliorer leur croissance.

Cette hypothèse est appuyée par des résultats récemment obtenus dans deux études de Brezas et ses collaborateurs démontrant qu'une lignée de truite arc-en-ciel résistante aux aliments végétaux présente des variations de concentrations plasmatiques synchrones pour les différents acides aminés <sup>554</sup> ainsi qu'une régulation transcriptionnelle de transporteurs d'acides aminés différente de truites non sélectionnées <sup>265</sup>. D'après nos résultats et ces observations, nous pensons que l'ajout d'acides aminés neutres libres pourrait améliorer l'absorption des AAC libres (Figure 47).

En effet, si le défaut d'absorption des AAC libres s'explique par la différence de leur biodisponibilité avec les AA<sub>0</sub> inclus aux protéines, l'ajout d'AA<sub>0</sub> libres aux aliments végétaux pourrait améliorer l'absorption des AAC (Figure 47). Cette hypothèse est actuellement en cours d'évaluation à travers une expérimentation *in vivo* dans laquelle l'ajout de glutamine, alanine, glycine ou de leucine libres dans des aliments à base de végétaux déjà supplémentés en arginine et lysine sont étudiés pour leurs effets sur la croissance des truites. Pour confirmer l'hypothèse de l'échange, il sera cependant nécessaire d'étudier les activités de transport des paralogues d'*y<sup>+</sup>lat2*, s'il échange les AAC contre des AA neutres et préférentiellement lesquels. L'étude des activités de transport d'*y<sup>+</sup>lat2* pourrait être effectuée en l'exprimant dans des oocytes de xénope ou en supprimant son expression par manipulation génétique dans les lignées cellulaires de truite et observer les conséquences de sa délétion sur l'absorption des AAC, les voies de signalisation GCN2 et mTOR ainsi que sur la prolifération cellulaire

### Utilisation du modèle lignées cellulaires

Lors de ce travail de thèse, nous avons également démontré que les voies de signalisation cellulaire mTOR et GCN2 ainsi que l'autophagie qu'elles régulent sont globalement conservées dans les lignées cellulaires étudiées, validant l'utilisation de cet outil pour l'étude de la nutrition des poissons. Les lignées cellulaires nous ont permis de mettre en évidence les effets propres aux acides aminés et plus spécifiquement des AAC sur l'expression des TAACs et la régulation des voies GCN2 et mTOR, chose qu'il aurait été impossible d'observer avec des expérimentations *in vivo*. En effet dans les études *in vivo*, les effets moléculaires observés par l'utilisation d'aliments végétaux peuvent être induits par différents facteurs dont il est impossible de discriminer les causes des conséquences. L'utilisation des lignées cellulaires de truite permettra une compréhension plus fine de l'effet des nutriments sur la biologie cellulaire et d'approfondir notre compréhension des dérégulations de la physiologie de la truite induites par les aliments végétaux. En plus de réduire l'utilisation d'animaux pour les expérimentations, l'autre intérêt majeur de l'utilisation de lignées cellulaires est la possibilité d'effectuer des manipulations génétiques plus facilement que dans des cultures primaires ou évidemment dans des organismes entiers.

Récemment, en 2016, Collet et ses collaborateurs ont développé l'utilisation de d'une méthode d'édition du génome à l'aide du système CRIPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats/CRISPR-associated 9) dans une lignée cellulaire de poisson, la lignée cellulaire de saumon royal (*Oncorhynchus tshawytscha*) CHSE <sup>556</sup>. Ils ont ainsi, à partir de cellules CHSE exprimant la protéine fluorescente EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein), établis une lignée exprimant la protéine Cas9. Ils ont ensuite démontré que

l'introduction d'un ARN guide (ARNg) dirigé contre le gène EGFP dans ces cellules induisait sa délétion et une perte de fluorescence. L'introduction d'ARNg ciblés contre l'EGFP et un gène cible endogène permettrait alors de sélectionner les clones dans lesquels la délétion d'un gène endogène a fonctionné en sélectionnant les cellules n'exprimant plus EGFP. L'adaptation de cette méthode aux lignées cellulaires de truites utilisées lors de cette thèse est en cours au laboratoire afin de supprimer l'expression de gènes d'intérêt dans l'étude du métabolisme des AA chez la truite. Une fois fonctionnel, ce nouvel outil nous permettra de répondre aux nombreuses questions émises dans la discussion de ce manuscrit et notamment de confirmer le rôle de GCN2 dans la surexpression des TAACs en supprimant son expression. Cette nouvelle technique nous permettra également de générer des cellules n'exprimant plus des TAACs afin de déterminer leur rôle cellulaire et possiblement leurs activités de transport. Finalement l'utilisation des lignées cellulaires de truite combinée à l'utilisation de la technique CRISPR/Cas9 nous permettra également de déterminer les rôles de différentes protéines de la truite ce qui permettra de considérablement approfondir nos connaissances de la biologie des truites, lesquelles s'appuient encore pour beaucoup sur les observations faites chez les mammifères.

# BIBLIOGRAPHIE





## Bibliographie

1. Harland, J. The origins of aquaculture. *Nat. Ecol. Evol.* 3, 1378–1379 (2019).
2. Nakajima, T., Hudson, M. J., Uchiyama, J., Makibayashi, K. & Zhang, J. Common carp aquaculture in Neolithic China dates back 8,000 years. *Nat. Ecol. Evol.* 3, 1415–1418 (2019).
3. Vivier, P. Un important centenaire : REMY, GEHIN, HAXO, COSTE et l'établissement domanial de pisciculture d'Huningue (1843-1853-1953). *Bull. Fr. Piscic.* 121–139 (1956) doi:10.1051/kmae:1956004.
4. Hernández-Rodríguez, A. *et al.* Aquaculture development trends in Latin America and the Caribbean. 20–25 (2001).
5. Sigler, J. W. & Sigler, W. F. History of fish hatchery development in the Great Basin states of Utah and Nevada. *Gt. Basin Nat.* 46, 13 (1986).
6. FAO. *La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2020.* (FAO, 2020). doi:10.4060/ca9229fr.
7. Sarma, D. *et al.* Nutritional Quality in Terms of Amino Acid and Fatty Acid of Five Coldwater Fish Species: Implications to Human Health. *Natl. Acad. Sci. Lett.* 36, 385–391 (2013).
8. Schmidt, E. B., Skou, H. A., Christensen, J. H. & Dyerberg, J. N-3 fatty acids from fish and coronary artery disease: implications for public health. *Public Health Nutr.* 3, 91–98 (2000).
9. Hardy, R. W. Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. in *Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture* (eds. Webster, C. D. & Lim, C.) 184–202 (CABI, 2002). doi:10.1079/9780851995199.0184.
10. Ohno, S. *Evolution by Gene Duplication.* (Springer-Verlag, 1970). doi:10.1007/978-3-642-86659-3.
11. Dehal, P. & Boore, J. L. Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biol.* 3, e314 (2005).
12. Amores, A. *et al.* Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science* 282, 1711–1714 (1998).
13. Near, T. J. *et al.* Resolution of ray-finned fish phylogeny and timing of diversification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 13698–13703 (2012).
14. Hurley, I. A., Scemama, J.-L. & Prince, V. E. Consequences of Hoxb1 duplication in teleost fish. *Evol. Dev.* 9, 540–554 (2007).
15. Moghadam, H. K., Ferguson, M. M. & Danzmann, R. G. Evolution of Hox Clusters in Salmonidae: A Comparative Analysis Between Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Mol. Evol.* 61, 636–649 (2005).
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. Hardy, R. W., Webster, C. D. & Lim, C. *Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture.* (CABI, 2002).
18. Page, W. F. *Feeding and rearing fishes, particularly trout, under domestication.* 1–32 (Govt. print. off., 1895).
19. NRC, N. R. *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp.* (2011). doi:10.17226/13039.
20. Wilson, R. P. Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture* 124, 67–80 (1994).
21. Bergot, F. [Specific problems posed by carbohydrate utilization in the rainbow trout]. *Ann. Nutr. Aliment.* 33, 247–257 (1979).

22. Párrizas, M., Baños, N., Baró, J., Planas, J. & Gutiérrez, J. Up-regulation of insulin binding in fish skeletal muscle by high insulin levels. *Regul. Pept.* 53, 211–222 (1994).
23. Song, X. *et al.* Regulations on glucose metabolism affected by dietary carbohydrate in different strains of juvenile gibel carp (*Carassius gibelio*). *Aquac. Res.* 50, 1075–1086 (2019).
24. Mommsen, T. P., Moon, T. W. & Plisetskaya, E. M. Effects of arginine on pancreatic hormones and hepatic metabolism in rainbow trout. *Physiol. Biochem. Zool. PBZ* 74, 668–678 (2001).
25. Navarro, I. *et al.* Insights into Insulin and Glucagon Responses in Fish. *Fish Physiol. Biochem.* 27, 205–216 (2002).
26. Stenbit, A. E. *et al.* GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nat. Med.* 3, 1096–1101 (1997).
27. Seilliez, I. *et al.* 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 (2011).
28. Brauge, C., Corraze, G. & Médale, F. Effects of dietary levels of carbohydrate and lipid on glucose oxidation and lipogenesis from glucose in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in freshwater or in seawater. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 111, 117–124 (1995).
29. Panserat, S. *et al.* Glucokinase is highly induced and glucose-6-phosphatase poorly repressed in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a single meal with glucose. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 128, 275–283 (2001).
30. Castell, J. D., Lee, D. J. & Sinnhuber, R. O. Essential Fatty Acids in the Diet of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*): Lipid Metabolism and Fatty Acid Composition. *J. Nutr.* 102, 93–99 (1972).
31. Takeuchi, T. & Watanabe, T. Effects of Various Polyunsaturated Fatty Acids on Growth and Fatty Acid Compositions of Rainbow Trout *Salmo gairdneri*, Coho Salmon *Onchorhynchus kisutch*, and Chum Salmon *Onchorhynchus keta*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 48, 1745–1752 (1982).
32. Yu, T. C., Sinnhuber, R. O. & Hendricks, J. D. Reproduction and survival of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed linolenic acid as the only source of essential fatty acids. *Lipids* 14, 572–575 (1979).
33. Dabrowski, K. & Guderley, H. 6 - Intermediary Metabolism. in *Fish Nutrition (Third Edition)* (eds. Halver, J. E. & Hardy, R. W.) 309–365 (Academic Press, 2003). doi:10.1016/B978-012319652-1/50007-0.
34. Sayer, M. D. J. & Davenport, J. The relative importance of the gills to ammonia and urea excretion in five seawater and one freshwater teleost species. *J. Fish Biol.* 31, 561–570 (1987).
35. van den Thillart, G. Energy metabolism of swimming trout (*Salmo gairdneri*). *J. Comp. Physiol. B* 156, 511–520 (1986).
36. NRC. *Nutrient Requirements of Fish*. (The National Academies Press, 1993). doi:10.17226/2115.
37. Green, J. A., Hardy, R. W. & Brannon, E. L. The optimum dietary essential: nonessential amino acid ratio for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), which maximizes nitrogen retention and minimizes nitrogen excretion. *Fish Physiol. Biochem.* 27, 109–115 (2002).
38. Webster, C. D. & Lim, C. *Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture*. (CABI, 2002).

39. Karakassis, I., Tsapakis, M., Hatziyanni, E., Papadopoulou, K.-N. & Plaiti, W. Impact of cage farming of fish on the seabed in three Mediterranean coastal areas. *ICES J. Mar. Sci.* 57, 1462–1471 (2000).
40. Herath, S. S. & Satoh, S. 15 - Environmental impact of phosphorus and nitrogen from aquaculture. in *Feed and Feeding Practices in Aquaculture* (ed. Davis, D. A.) 369–386 (Woodhead Publishing, 2015). doi:10.1016/B978-0-08-100506-4.00015-5.
41. Reilly, A. & Käferstein, F. Food safety hazards and the application of the principles of the hazard analysis and critical control point (HACCP) system for their control in aquaculture production. *Aquac. Res.* 28, 735–752 (1997).
42. Tacon, A. & Hasan, M. Global synthesis of feeds and nutrients for sustainable aquaculture development. *Study Anal. Feeds Fertil. Sustain. Aquac. Dev.* 497, 3–17 (2007).
43. Tacon, A. G. J. & Metian, M. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture* 285, 146–158 (2008).
44. Naylor, R. L. *et al.* Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 15103–15110 (2009).
45. Lasner, T., Brinker, A., Nielsen, R. & Rad, F. Establishing a benchmarking for fish farming - Profitability, productivity and energy efficiency of German, Danish and Turkish rainbow trout grow-out systems. *Aquac. Res.* 48, 3134–3148 (2017).
46. Gatlin, D. M. *et al.* Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquac. Res.* 38, 551–579 (2007).
47. Spataru, P., Wohlfarth, G. W. & Hulata, G. Studies on the natural food of different fish species in intensively manured polyculture ponds. *Aquaculture* 35, 283–298 (1983).
48. Huis, A. van. *Edible insects: future prospects for food and feed security.* (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013).
49. Tran, G., Heuzé, V. & Makkar, H. P. S. Insects in fish diets. *Anim. Front.* 5, 37–44 (2015).
50. Barroso, F. G. *et al.* The potential of various insect species for use as food for fish. *Aquaculture* 422–423, 193–201 (2014).
51. Finke, M. D. Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biol.* 21, 269–285 (2002).
52. Makkar, H. P. S., Tran, G., Heuzé, V. & Ankers, P. State-of-the-art on use of insects as animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* 197, 1–33 (2014).
53. Sánchez-Muros, M.-J., Barroso, F. G. & Manzano-Agugliaro, F. Insect meal as renewable source of food for animal feeding: a review. *J. Clean. Prod.* 65, 16–27 (2014).
54. Finke, M. D. Complete nutrient content of four species of commercially available feeder insects fed enhanced diets during growth. *Zoo Biol.* 34, 554–564 (2015).
55. Nogales-Mérida, S. *et al.* Insect meals in fish nutrition. *Rev. Aquac.* 11, 1080–1103 (2019).
56. Stamer, A. Insect proteins—a new source for animal feed. *EMBO Rep.* 16, 676–680 (2015).
57. Saint-Hilaire, Shepard & Tomberlin. Fly Prepupae as a Feedstuff for Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss.* (2007).
58. Siwicki, A. K. *et al.* The effect of beta-1.3/1.6 - glucan in diets on the effectiveness of anti-Yersinia ruckeri vaccine - an experimental study in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 13, 59–61 (2004).
59. Guselle, N. J., Markham, R. J. F. & Speare, D. J. Timing of intraperitoneal administration of  $\beta$ -1,3/1,6 glucan to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), affects protection against the microsporidian *Loma salmonae*. *J. Fish Dis.* 30, 111–116 (2007).

60. Staykov, Y., Spring, P., Denev, S. & Sweetman, J. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac. Int.* 15, 153–161 (2007).
61. Yilmaz, E., Genç, M. & Genç, E. Effects of dietary mannan oligosaccharides on growth, body composition, and intestine and liver histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. (2007).
62. Lapeña, D. *et al.* Production and characterization of yeasts grown on media composed of spruce-derived sugars and protein hydrolysates from chicken by-products. *Microb. Cell Factories* 19, 19 (2020).
63. Øverland, M., Karlsson, A., Mydland, L. T., Romarheim, O. H. & Skrede, A. Evaluation of *Candida utilis*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts as protein sources in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 402–403, 1–7 (2013).
64. Agboola, J. O., Øverland, M., Skrede, A. & Hansen, J. Ø. Yeast as major protein-rich ingredient in aquafeeds: a review of the implications for aquaculture production. *Rev. Aquac.* 13, 949–970 (2021).
65. Vidakovic, A. *et al.* Growth performance, nutrient digestibility and intestinal morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed graded levels of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Wickerhamomyces anomalus*. *Aquac. Nutr.* 26, 275–286 (2020).
66. Langeland, M. *et al.* Digestibility of microbial and mussel meal for Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) and Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Aquac. Nutr.* 22, 485–495 (2016).
67. Hauptman, B. S. *et al.* Evaluation of grain distillers dried yeast as a fish meal substitute in practical-type diets of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 432, 7–14 (2014).
68. Lourenço, S. O., Barbarino, E., De-Paula, J. C., Pereira, L. O. da S. & Marquez, U. M. L. Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. *Phycol. Res.* 50, 233–241 (2002).
69. Dawczynski, C., Schubert, R. & Jahreis, G. Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chem.* 103, 891–899 (2007).
70. Gosch, B. J., Magnusson, M., Paul, N. A. & Nys, R. de. Total lipid and fatty acid composition of seaweeds for the selection of species for oil-based biofuel and bioproducts. *GCB Bioenergy* 4, 919–930 (2012).
71. Miyashita, K., Mikami, N. & Hosokawa, M. Chemical and nutritional characteristics of brown seaweed lipids: A review. *J. Funct. Foods* 5, 1507–1517 (2013).
72. Holdt, S. L. & Kraan, S. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *J. Appl. Phycol.* 23, 543–597 (2011).
73. Wan, A. H. L., Davies, S. J., Soler-Vila, A., Fitzgerald, R. & Johnson, M. P. Macroalgae as a sustainable aquafeed ingredient. *Rev. Aquac.* 11, 458–492 (2019).
74. Yıldırım, Ö., Ergün, S., Yaman, S. & Türker, A. Effects of Two Seaweeds (*Ulva lactuca* and *Enteromorpha linza*) as a Feed Additive in Diets on Growth Performance, Feed Utilization, and Body Composition of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). (2009).
75. Kloareg, B. Structure et propriétés d'échange des parois cellulaires des Algues brunes. Implications écophysiological. *Bull. Société Bot. Fr. Actual. Bot.* 138, 305–318 (1991).
76. Bélanger, A., Sarker, P. K., Bureau, D. P., Chouinard, Y. & Vandenberg, G. W. Apparent Digestibility of Macronutrients and Fatty Acids from Microalgae (*Schizochytrium* sp.) Fed to Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): A Potential Candidate for Fish Oil Substitution. *Animals* 11, 456 (2021).

77. Santigosa, Constant, Prudence, Wahli & Verlhac-Trichet. A novel marine algal oil containing both EPA and DHA is an effective source of omega-3 fatty acids for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). (2020) doi:10.1111/jwas.12699.
78. Gomes, E. F., Rema, P. & Kaushik, S. J. Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): digestibility and growth performance. *Aquaculture* 130, 177–186 (1995).
79. Kaushik, S. J. *et al.* Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 133, 257–274 (1995).
80. Burel, C., Boujard, T., Tulli, F. & Kaushik, S. J. Digestibility of extruded peas, extruded lupin, and rapeseed meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 188, 285–298 (2000).
81. Carter, C. G. & Hauler, R. C. Fish meal replacement by plant meals in extruded feeds for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture* 185, 299–311 (2000).
82. Collins, S. A., Øverland, M., Skrede, A. & Drew, M. D. 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 (2013).
83. Hardy, R. W. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquac. Res.* 41, 770–776 (2010).
84. Ytrestøyl, T., Aas, T. S. & Åsgård, T. Utilisation of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Aquaculture* 448, 365–374 (2015).
85. Vilhelmsson, O. T., Martin, S. A. M., Médale, F., Kaushik, S. J. & Houlihan, D. F. Dietary plant-protein substitution affects hepatic metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nutr.* 92, 71–80 (2004).
86. Panserat, S. *et al.* Hepatic gene expression profiles in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed fishmeal or fish oil-free diets. *Br. J. Nutr.* 100, 953–967 (2008).
87. de Francesco, M. *et al.* 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 (2004).
88. Lazzarotto, V., Médale, F., Larroquet, L. & Corraze, G. Long-term dietary replacement of fishmeal and fish oil in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on growth, whole body fatty acids and intestinal and hepatic gene expression. *PLOS ONE* 13, e0190730 (2018).
89. Geurden, I. *et al.* Rainbow trout can discriminate between feeds with different oil sources. *Physiol. Behav.* 85, 107–114 (2005).
90. Corraze, G. & Kaushik, S. Lipid nutrition and fish oil replacement by vegetable oils in pisciculture. *Cah. Agric.* 18, 112–118 (2009).
91. Torstensen, B. E. *et al.* Novel production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) protein based on combined replacement of fish meal and fish oil with plant meal and vegetable oil blends. *Aquaculture* 285, 193–200 (2008).
92. Yamamoto, T. *et al.* Self-selection of diets with different amino acid profiles by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 187, 375–386 (2000).
93. Francis, G., Makkar, H. P. S. & Becker, K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199, 197–227 (2001).
94. Krogdahl, Å., Penn, M., Thorsen, J., Refstie, S. & Bakke, A. M. Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquac. Res.* 41, 333–344 (2010).

95. van den Ingh, Olli & Krogdahl. Alcohol-soluble components in soybeans cause morphological changes in the distal intestine of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. - Ingh - 1996 - Journal of Fish Diseases - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2761.1996.tb00119.x> (1996).
96. Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Bradley, G., Baker, R. T. M. & Davies, S. J. Soybean meal alters autochthonous microbial populations, microvilli morphology and compromises intestinal enterocyte integrity of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 32, 755–766 (2009).
97. Bakke-McKellep, A. M., Press, C. M., Baeverfjord, G., Krogdahl, Å. & Landsverk, T. Changes in immune and enzyme histochemical phenotypes of cells in the intestinal mucosa of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., with soybean meal-induced enteritis. *J. Fish Dis.* 23, 115–127 (2000).
98. Krogdahl, A. Ê., Bakke-McKellep, A. M., Réed, K. H., Baeverfjord, G. & Bakke-McKellep, A. M. Feeding Atlantic salmon *Salmo salar* L. soybean products: effects on disease resistance (furunculosis), and lysozyme and IgM levels in the intestinal mucosa. *Aquacult Nutr* 77–84.
99. Desai, A. R. *et al.* Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 350–353, 134–142 (2012).
100. Heikkinen, J. *et al.* Effects of soybean meal based diet on growth performance, gut histopathology and intestinal microbiota of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 261, 259–268 (2006).
101. Krogdahl, Å., Bakke-McKellep, A. M. & Baeverfjord, G. Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac. Nutr.* 9, 361–371 (2003).
102. Nordrum, S., Bakke-McKellep, A. M., Krogdahl, Å. & Buddington, R. K. Effects of soybean meal and salinity on intestinal transport of nutrients in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 125, 317–335 (2000).
103. Makkar, H. P. S. Antinutritional factors in foods for livestock. *BSAP Occas. Publ.* 16, 69–85 (1993).
104. Francis, G., Makkar, H. P. S. & Becker, K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199, 197–227 (2001).
105. de la Higuera, M. *et al.* Evaluation of lupin seed meal as an alternative protein source in feeding of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 71, 37–50 (1988).
106. Olli, J. J., Hjelmeland, K. & Krogdahl, Å. Soybean trypsin inhibitors in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*, L): effects on nutrient digestibilities and trypsin in pyloric caeca homogenate and intestinal content. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 109, 923–928 (1994).
107. Spinelli, J., Houle, C. R. & Wekell, J. C. The effect of phytates on the growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed purified diets containing varying quantities of calcium and magnesium. *Aquaculture* 30, 71–83 (1983).
108. Shimoyamada, M., Ikedo, S., Ootsubo, R. & Watanabe, K. Effects of Soybean Saponins on Chymotryptic Hydrolyses of Soybean Proteins. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4793–4797 (1998).
109. Bennetau-Pelissero, C. *et al.* Effect of Genistein-Enriched Diets on the Endocrine Process of Gametogenesis and on Reproduction Efficiency of the Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 121, 173–187 (2001).

110. Teskeredžić, Z. *et al.* Assessment of undephytinized and dephytinized rapeseed protein concentrate as sources of dietary protein for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 131, 261–277 (1995).
111. Lorentzen, M. & Maage, A. Trace element status of juvenile Atlantic salmon *Salmo salar* L. fed a fish-meal based diet with or without supplementation of zinc, iron, manganese and copper from first feeding. (1999).
112. Médale, F. *et al.* Des aliments à base de végétaux pour les poissons d'élevage. *INRAE Prod. Anim.* 26, 303–316 (2013).
113. Médale, F. *et al.* Des aliments à base de végétaux pour les poissons d'élevage. *INRAE Prod. Anim.* 26, 303–316 (2013).
114. Hediger, M. A. *et al.* The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pflug. Arch.* 447, 465–468 (2004).
115. Höglund, P. J., Nordström, K. J. V., Schiöth, H. B. & Fredriksson, R. 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 (2011).
116. Christensen, H. N. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol. Rev.* 70, 43–77 (1990).
117. Fredriksson, R., Nordström, K. J. V., Stephansson, O., Hägglund, M. G. A. & Schiöth, H. B. The solute carrier (SLC) complement of the human genome: Phylogenetic classification reveals four major families. *FEBS Lett.* 582, 3811–3816 (2008).
118. Bergström, J., Fürst, P., Norée, L. O. & Vinnars, E. Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. *J. Appl. Physiol.* 36, 693–697 (1974).
119. Hediger, M. A., Cléménçon, B., Burrier, R. E. & Bruford, E. A. The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): Introduction. *Mol. Aspects Med.* 34, 95–107 (2013).
120. Christensen, H. N. Methods for distinguishing amino acid transport systems of a given cell or tissue. *Fed. Proc.* 25, 850–853 (1966).
121. Gyimesi, G. & Hediger, M. A. SLC66 Lysosomal amino acid transporters in GtoPdb v.2021.2. *IUPHARBPS Guide Pharmacol. CITE* 2021, (2021).
122. Daniel, H. Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu. Rev. Physiol.* 66, 361–384 (2004).
123. Kowalczyk, S. *et al.* A protein complex in the brush-border membrane explains a Hartnup disorder allele. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 22, 2880–2887 (2008).
124. Kanai, Y. *et al.* The neuronal and epithelial human high affinity glutamate transporter. Insights into structure and mechanism of transport. *J. Biol. Chem.* 269, 20599–20606 (1994).
125. Romeo, E. *et al.* Luminal kidney and intestine SLC6 amino acid transporters of B0AT-cluster and their tissue distribution in *Mus musculus*. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 290, F376–383 (2006).
126. Anderson, C. M. H. *et al.* H<sup>+</sup>/amino acid transporter 1 (PAT1) is the imino acid carrier: An intestinal nutrient/drug transporter in human and rat. *Gastroenterology* 127, 1410–1422 (2004).
127. Palacín, M., Borsani, G. & Sebastio, G. The molecular bases of cystinuria and lysinuric protein intolerance. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 328–335 (2001).



128. Ramadan, T. *et al.* Recycling of aromatic amino acids via TAT1 allows efflux of neutral amino acids via LAT2-4F2hc exchanger. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 454, 507–516 (2007).
129. Palacín, M., Bertran, J., Chillarón, J., Estévez, R. & Zorzano, A. Lysinuric protein intolerance: mechanisms of pathophysiology. *Mol. Genet. Metab.* 81 Suppl 1, S27–37 (2004).
130. Brons, A.-K. *et al.* SLC3A1 and SLC7A9 Mutations in Autosomal Recessive or Dominant Canine Cystinuria: A New Classification System. *J. Vet. Intern. Med.* 27, 1400–1408 (2013).
131. Cheon, C. K., Lee, B. H., Ko, J. M., Kim, H.-J. & Yoo, H.-W. Novel Mutation in SLC6A19 Causing Late-Onset Seizures in Hartnup Disorder. *Pediatr. Neurol.* 42, 369–371 (2010).
132. Estève, E. *et al.* Renal involvement in lysinuric protein intolerance: contribution of pathology to assessment of heterogeneity of renal lesions. *Hum. Pathol.* 62, 160–169 (2017).
133. 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).
134. Bröer, S. *et al.* Iminoglycinuria and hyperglycinuria are discrete human phenotypes resulting from complex mutations in proline and glycine transporters. *J. Clin. Invest.* 118, 3881–3892 (2008).
135. Christensen, H. N. & Antonioli, J. A. Cationic Amino Acid Transport in the Rabbit Reticulocyte: NA<sup>+</sup>-dependent inhibition of NA<sup>+</sup>-independent transport. *J. Biol. Chem.* 244, 1497–1504 (1969).
136. Christensen, H. N. & Handlogten, M. E. Reactions of neutral amino acids plus Na<sup>+</sup> with a cationic amino acid transport system. *FEBS Lett.* 3, 14–17 (1969).
137. Van Winkle, L. J., Christensen, H. N. & Campione, A. L. Na<sup>+</sup>-dependent transport of basic, zwitterionic, and bicyclic amino acids by a broad-scope system in mouse blastocysts. *J. Biol. Chem.* 260, 12118–12123 (1985).
138. Winkle, L. J. V., Campione, A. L. & Gorman, J. M. Na<sup>+</sup>-independent transport of basic and zwitterionic amino acids in mouse blastocysts by a shared system and by processes which distinguish between these substrates. *J. Biol. Chem.* 263, 3150–3163 (1988).
139. Devés, R., Chavez, P. & Boyd, C. A. Identification of a new transport system (y<sup>+</sup>L) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity. *J. Physiol.* 454, 491–501 (1992).
140. Kim, J. W., Closs, E. I., Albritton, L. M. & Cunningham, J. M. Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature* 352, 725–728 (1991).
141. Wang, H., Kavanaugh, M. P., North, R. A. & Kabat, D. Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature* 352, 729–731 (1991).
142. Albritton, L. M., Tseng, L., Scadden, D. & Cunningham, J. M. A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell* 57, 659–666 (1989).
143. Finley, K. D. *et al.* A mammalian arginine/lysine transporter uses multiple promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 9378–9382 (1995).
144. Wolf, S. *et al.* Expression of solute carrier 7A4 (SLC7A4) in the plasma membrane is not sufficient to mediate amino acid transport activity. *Biochem. J.* 364, 767–775 (2002).
145. Jin, Z.-B. *et al.* SLC7A14 linked to autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat. Commun.* 5, 3517 (2014).

146. Jaenecke, I. *et al.* 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 (2012).
147. Jäger, K., Bönisch, U., Risch, M., Worlitzsch, D. & Paulsen, F. Detection and Regulation of Cationic Amino Acid Transporters in Healthy and Diseased Ocular Surface. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 1112–1121 (2009).
148. Closs, E. I., Lyons, C. R., Kelly, C. & Cunningham, J. M. Characterization of the third member of the MCAT family of cationic amino acid transporters. Identification of a domain that determines the transport properties of the MCAT proteins. *J. Biol. Chem.* 268, 20796–20800 (1993).
149. Niese, K. A., Chiaramonte, M. G., Ellies, L. G., Rothenberg, M. E. & Zimmermann, N. The cationic amino acid transporter 2 is induced in inflammatory lung models and regulates lung fibrosis. *Respir. Res.* 11, 87 (2010).
150. Nicholson, B., Manner, C. K., Kleeman, J. & MacLeod, C. L. Sustained Nitric Oxide Production in Macrophages Requires the Arginine Transporter CAT2 \*. *J. Biol. Chem.* 276, 15881–15885 (2001).
151. Hosokawa, H. *et al.* Cloning and Characterization of a Brain-specific Cationic Amino Acid Transporter \*. *J. Biol. Chem.* 272, 8717–8722 (1997).
152. Ito, K. & Groudine, M. A new member of the cationic amino acid transporter family is preferentially expressed in adult mouse brain. *J. Biol. Chem.* 272, 26780–26786 (1997).
153. Vékony, N., Wolf, S., Boissel, J. P., Gnauert, K. & Closs, E. I. Human cationic amino acid transporter hCAT-3 is preferentially expressed in peripheral tissues. *Biochemistry* 40, 12387–12394 (2001).
154. Sperandio, M. P. *et al.* The Gene Encoding a Cationic Amino Acid Transporter (SLC7A4) Maps to the Region Deleted in the Velocardiofacial Syndrome. *Genomics* 49, 230–236 (1998).
155. Sreedharan, S., Stephansson, O., Schiöth, H. B. & Fredriksson, R. Long evolutionary conservation and considerable tissue specificity of several atypical solute carrier transporters. *Gene* 478, 11–18 (2011).
156. Closs, E. I., Gräf, P., Habermeier, A., Cunningham, J. M. & Förstermann, U. Human Cationic Amino Acid Transporters hCAT-1, hCAT-2A, and hCAT-2B: Three Related Carriers with Distinct Transport Properties <sup>†</sup>, <sup>‡</sup>. *Biochemistry* 36, 6462–6468 (1997).
157. Nicholson, B., Sawamura, T., Masaki, T. & MacLeod, C. L. Increased Cat3-mediated cationic amino acid transport functionally compensates in Cat1 knockout cell lines. *J. Biol. Chem.* 273, 14663–14666 (1998).
158. Eleno, N., Devés, R. & Boyd, C. A. Membrane potential dependence of the kinetics of cationic amino acid transport systems in human placenta. *J. Physiol.* 479, 291–300 (1994).
159. Rotoli, B. M., Bussolati, O., Dall’asta, V. & Gazzola, G. C. Membrane potential and amino acid transport in a mutant chinese hamster ovary cell line. *J. Cell. Physiol.* 146, 417–424 (1991).
160. Kavanaugh, M. P. Voltage dependence of facilitated arginine flux mediated by the system y<sup>+</sup> basic amino acid transporter. *Biochemistry* 32, 5781–5785 (1993).
161. Closs, E. I., Gräf, P., Habermeier, A., Cunningham, J. M. & Förstermann, U. Human Cationic Amino Acid Transporters hCAT-1, hCAT-2A, and hCAT-2B: Three Related Carriers with Distinct Transport Properties. *Biochemistry* 36, 6462–6468 (1997).

162. Haynes, B. F. Human T Lymphocyte Antigens as Defined by Monoclonal Antibodies. *Immunol. Rev.* 57, 127–161 (1981).
163. Fenczik, C. A. *et al.* Distinct Domains of CD98hc Regulate Integrins and Amino Acid Transport \*. *J. Biol. Chem.* 276, 8746–8752 (2001).
164. Prager, G. W., Féral, C. C., Kim, C., Han, J. & Ginsberg, M. H. CD98hc (SLC3A2) Interaction with the Integrin  $\beta$  Subunit Cytoplasmic Domain Mediates Adhesive Signaling. *J. Biol. Chem.* 282, 24477–24484 (2007).
165. Feral, C. C. *et al.* CD98hc (SLC3A2) mediates integrin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 355–360 (2005).
166. Fenczik, C. A., Sethi, T., Ramos, J. W., Hughes, P. E. & Ginsberg, M. H. Complementation of dominant suppression implicates CD98 in integrin activation. *Nature* 390, 81–85 (1997).
167. Cai, S. *et al.* CD98 modulates integrin  $\beta$ 1 function in polarized epithelial cells. *J. Cell Sci.* 118, 889–899 (2005).
168. Kaszuba, K. *et al.* N-Glycosylation as determinant of epidermal growth factor receptor conformation in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 4334–4339 (2015).
169. Torrents, D. *et al.* Identification and characterization of a membrane protein ( $\gamma$ +L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity  $\gamma$ +L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *J. Biol. Chem.* 273, 32437–32445 (1998).
170. Fort, J. *et al.* The Structure of Human 4F2hc Ectodomain Provides a Model for Homodimerization and Electrostatic Interaction with Plasma Membrane \*. *J. Biol. Chem.* 282, 31444–31452 (2007).
171. Bertran, J. *et al.* Stimulation of system  $\gamma$ (+)-like amino acid transport by the heavy chain of human 4F2 surface antigen in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 5606–5610 (1992).
172. Wells, R. G., Lee, W. S., Kanai, Y., Leiden, J. M. & Hediger, M. A. The 4F2 antigen heavy chain induces uptake of neutral and dibasic amino acids in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 267, 15285–15288 (1992).
173. Bröer, S., Bröer, A. & Hamprecht, B. The 4F2hc surface antigen is necessary for expression of system L-like neutral amino acid-transport activity in C6-BU-1 rat glioma cells: evidence from expression studies in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem. J.* 312, 863–870 (1995).
174. Broër, A., HAMPRECHT, B. & Broër, S. Discrimination of two amino acid transport activities in 4F2 heavy chain- expressing *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem. J.* 333, 549–554 (1998).
175. Estévez, R. *et al.* The amino acid transport system  $\gamma$ +L/4F2hc is a heteromultimeric complex. *FASEB J.* 12, 1319–1329 (1998).
176. Pfeiffer, R. *et al.* Amino acid transport of  $\gamma$ +L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *EMBO J.* 18, 49–57 (1999).
177. Kanai, Y. *et al.* Transport Properties of a System  $\gamma$ +L Neutral and Basic Amino Acid Transporter: INSIGHTS INTO THE MECHANISMS OF SUBSTRATE RECOGNITION \*. *J. Biol. Chem.* 275, 20787–20793 (2000).
178. Shoji, Y. *et al.* Five novel SLC7A7 variants and  $\gamma$ +L gene-expression pattern in cultured lymphoblasts from Japanese patients with lysinuric protein intolerance. *Hum. Mutat.* 20, 375–381 (2002).

179. Bröer, A., Wagner, C. A., Lang, F. & Bröer, S. The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/y+LAT2 mediates arginine efflux in exchange with glutamine. *Biochem. J.* 349, 787–795 (2000).
180. Rotoli, B. M., Barilli, A., Visigalli, R., Ferrari, F. & Dall'Asta, V. y+LAT1 and y+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 (2020).
181. Pickel, V. M. *et al.* Ultrastructural localization of a neutral and basic amino acid transporter in rat kidney and intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 7779–7783 (1993).
182. Bauch, C. & Verrey, F. Apical heterodimeric cystine and cationic amino acid transporter expressed in MDCK cells. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* 283, F181–F189 (2002).
183. Mizoguchi, K. *et al.* Human cystinuria-related transporter: Localization and functional characterization. *Kidney Int.* 59, 1821–1833 (2001).
184. Nagamori, S. *et al.* Novel cystine transporter in renal proximal tubule identified as a missing partner of cystinuria-related plasma membrane protein rBAT/SLC3A1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 775–780 (2016).
185. Reig, N. *et al.* The light subunit of system bo,+ is fully functional in the absence of the heavy subunit. *EMBO J.* 21, 4906–4914 (2002).
186. Wang, Y. & Tate, S. S. Oligomeric structure of a renal cystine transporter: implications in cystinuria. *FEBS Lett.* 368, 389–392 (1995).
187. Fernández, E. *et al.* The Structural and Functional Units of Heteromeric Amino Acid Transporters: THE HEAVY SUBUNIT rBAT DICTATES OLIGOMERIZATION OF THE HETEROMERIC AMINO ACID TRANSPORTERS\*. *J. Biol. Chem.* 281, 26552–26561 (2006).
188. Feliubadaló, L. *et al.* Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, encoding a subunit (bo,+AT) of rBAT. *Nat. Genet.* 23, 52–57 (1999).
189. Sloan, J. L. & Mager, S. Cloning and functional expression of a human Na(+) and Cl(-)-dependent neutral and cationic amino acid transporter B(0+). *J. Biol. Chem.* 274, 23740–23745 (1999).
190. Kekuda, R. *et al.* Molecular and functional characterization of intestinal Na(+)-dependent neutral amino acid transporter B0. *Am. J. Physiol.* 272, G1463-1472 (1997).
191. Uchiyama, T. *et al.* Functional characterization and cloning of amino acid transporter B(0,+) (ATB(0,+)) in primary cultured rat pneumocytes. *J. Cell. Physiol.* 214, 645–654 (2008).
192. Karunakaran, S. *et al.* SLC6A14 (ATB0,+) Protein, a Highly Concentrative and Broad Specific Amino Acid Transporter, Is a Novel and Effective Drug Target for Treatment of Estrogen Receptor-positive Breast Cancer \*. *J. Biol. Chem.* 286, 31830–31838 (2011).
193. Gu, S., Adan-Rice, D., Leach, R. J. & Jiang, J. X. A novel human amino acid transporter, hNAT3: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic structure, expression, and functional characterization. *Genomics* 74, 262–272 (2001).
194. Hatanaka, T. *et al.* 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* 1510, 10–17 (2001).
195. Sugawara, M. *et al.* 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 (2000).

196. Wang, H. *et al.* Cloning and Functional Expression of ATA1, a Subtype of Amino Acid Transporter A, from Human Placenta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 1175–1179 (2000).
197. Hatanaka, T. *et al.* Primary structure, functional characteristics and tissue expression pattern of human ATA2, a subtype of amino acid transport system A. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1467, 1–6 (2000).
198. Desforges, M. *et al.* SNAT4 isoform of system A amino acid transporter is expressed in human placenta. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 290, C305–C312 (2006).
199. Novak, D., Lehman, M., Bernstein, H., Beveridge, M. & Cramer, S. SNAT Expression in Rat Placenta. *Placenta* 27, 510–516 (2006).
200. Ruprecht, J. J. & Kunji, E. R. S. The SLC25 Mitochondrial Carrier Family: Structure and Mechanism. *Trends Biochem. Sci.* 45, 244–258 (2020).
201. Fiermonte, G. *et al.* The Mitochondrial Ornithine Transporter: BACTERIAL EXPRESSION, RECONSTITUTION, FUNCTIONAL CHARACTERIZATION, AND TISSUE DISTRIBUTION OF TWO HUMAN ISOFORMS \*. *J. Biol. Chem.* 278, 32778–32783 (2003).
202. Porcelli, V., Fiermonte, G., Longo, A. & Palmieri, F. The Human Gene SLC25A29, of Solute Carrier Family 25, Encodes a Mitochondrial Transporter of Basic Amino Acids \*. *J. Biol. Chem.* 289, 13374–13384 (2014).
203. Palmieri, F. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch.* 447, 689–709 (2004).
204. Liu, B., Du, H., Rutkowski, R., Gartner, A. & Wang, X. LAAT-1 Is the Lysosomal Lysine/Arginine Transporter That Maintains Amino Acid Homeostasis. *Science* 337, 351–354 (2012).
205. Jézégou, A. *et al.* Heptahelical protein PQLC2 is a lysosomal cationic amino acid exporter underlying the action of cysteamine in cystinosis therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, E3434–E3443 (2012).
206. Wang, S. *et al.* Lysosomal amino acid transporter SLC38A9 signals arginine sufficiency to mTORC1. *Science* 347, 188–194 (2015).
207. Wyant, G. A. *et al.* mTORC1 activator SLC38A9 is required to efflux essential amino acids from lysosomes and use protein as a nutrient. *Cell* 171, 642–654.e12 (2017).
208. Perkins, C. P. *et al.* Anemia and perinatal death result from loss of the murine ecotropic retrovirus receptor mCAT-1. *Genes Dev.* 11, 914–925 (1997).
209. Werner, A. *et al.* Cationic Amino Acid Transporter-1-Mediated Arginine Uptake Is Essential for Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Proliferation and Viability. *Front. Oncol.* 9, 1268 (2019).
210. Sperandeo, M. P. *et al.* Slc7a7 disruption causes fetal growth retardation by downregulating Igf1 in the mouse model of lysinuric protein intolerance. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 293, C191–198 (2007).
211. Bodoy, S. *et al.* Inducible Slc7a7 Knockout Mouse Model Recapitulates Lysinuric Protein Intolerance Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 20, E5294 (2019).
212. Stroup, B. M. *et al.* A global Slc7a7 knockout mouse model demonstrates characteristic phenotypes of human lysinuric protein intolerance. *Hum. Mol. Genet.* 29, 2171–2184 (2020).
213. Liu, J.-P., Baker, J., Perkins, A. S., Robertson, E. J. & Efstratiadis, A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75, 59–72 (1993).

214. Powell-Braxton, L. *et al.* IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes Dev.* 7, 2609–2617 (1993).
215. Matoba, S. *et al.* Paternal knockout of Slc38a4/SNAT4 causes placental hypoplasia associated with intrauterine growth restriction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 21047–21053 (2019).
216. Ji, S. Overexpression of SLC25A15 is involved in the proliferation of cutaneous melanoma and leads to poor prognosis. *médecine/sciences* 34, 74–80 (2018).
217. Mills, C. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit. Rev. Immunol.* 32, (2012).
218. Yeramian, A. *et al.* Arginine Transport via Cationic Amino Acid Transporter 2 Plays a Critical Regulatory Role in Classical or Alternative Activation of Macrophages. *J. Immunol.* 176, 5918–5924 (2006).
219. Yeramian, A. *et al.* Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 5918–5924 (2006).
220. Kawahara, K. *et al.* Co-induction of argininosuccinate synthetase, cationic amino acid transporter-2, and nitric oxide synthase in activated murine microglial cells. *Mol. Brain Res.* 90, 165–173 (2001).
221. Rotoli, B. M. *et al.* INF $\gamma$  stimulates arginine transport through system  $\gamma$ +L in human monocytes. *FEBS Lett.* 571, 177–181 (2004).
222. Rotoli, B. M. *et al.* Alveolar Macrophages from Normal Subjects Lack the NOS-Related System  $\gamma$ + for Arginine Transport. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 37, 105–112 (2007).
223. Calonge, M. J. *et al.* Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nat. Genet.* 6, 420–425 (1994).
224. Calonge, M. J. *et al.* Genetic heterogeneity in cystinuria: the SLC3A1 gene is linked to type I but not to type III cystinuria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 9667–9671 (1995).
225. Feliubadaló, L. *et al.* Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, encoding a subunit (bo,+AT) of rBAT. *Nat. Genet.* 23, 52–57 (1999).
226. Ahmadi, S. *et al.* SLC6A14, an amino acid transporter, modifies the primary CF defect in fluid secretion. *eLife* 7, e37963 (2018).
227. Torrents, D. *et al.* Identification of SLC7A7, encoding  $\gamma$ +LAT-1, as the lysinuric protein intolerance gene. *Nat. Genet.* 21, 293–296 (1999).
228. Hyatt, S. L., Aulak, K. S., Malandro, M., Kilberg, M. S. & Hatzoglou, M. Adaptive Regulation of the Cationic Amino Acid Transporter-1 (Cat-1) in Fao Cells \*. *J. Biol. Chem.* 272, 19951–19957 (1997).
229. Fernandez, J. *et al.* Transcriptional Control of the Arginine/Lysine Transporter, Cat-1, by Physiological Stress. *J. Biol. Chem.* 278, 50000–50009 (2003).
230. Fernandez, J. *et al.* Internal Ribosome Entry Site-mediated Translation of a Mammalian mRNA Is Regulated by Amino Acid Availability \*. *J. Biol. Chem.* 276, 12285–12291 (2001).
231. Aulak, K. S. *et al.* Post-transcriptional regulation of the arginine transporter Cat-1 by amino acid availability. *J. Biol. Chem.* 274, 30424–30432 (1999).
232. Aulak, K. S. *et al.* Molecular sites of regulation of expression of the rat cationic amino acid transporter gene. *J. Biol. Chem.* 271, 29799–29806 (1996).
233. Mukherjee, N. *et al.* Integrative Regulatory Mapping Indicates that the RNA-Binding Protein HuR Couples Pre-mRNA Processing and mRNA Stability. *Mol. Cell* 43, 327–339 (2011).

234. Lebedeva, S. *et al.* Transcriptome-wide Analysis of Regulatory Interactions of the RNA-Binding Protein HuR. *Mol. Cell* 43, 340–352 (2011).
235. Yaman, I. *et al.* Nutritional Control of mRNA Stability Is Mediated by a Conserved AU-rich Element That Binds the Cytoplasmic Shuttling Protein HuR \*. *J. Biol. Chem.* 277, 41539–41546 (2002).
236. Bhattacharyya, S. N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E. I. & Filipowicz, W. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 125, 1111–1124 (2006).
237. Sala, R. *et al.* Two-way arginine transport in human endothelial cells: TNF- $\alpha$  stimulation is restricted to system  $\gamma^+$ . *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 282, C134–C143 (2002).
238. Hammermann, R. *et al.* Nuclear factor-kappaB mediates simultaneous induction of inducible nitric-oxide synthase and Up-regulation of the cationic amino acid transporter CAT-2B in rat alveolar macrophages. *Mol. Pharmacol.* 58, 1294–1302 (2000).
239. Baydoun, A. R. *et al.* Transmembrane signalling mechanisms regulating expression of cationic amino acid transporters and inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. J.* 344 Pt 1, 265–272 (1999).
240. Kucharzik, T. *et al.* Activation of epithelial CD98 glycoprotein perpetuates colonic inflammation. *Lab. Invest.* 85, 932–941 (2005).
241. Hatanaka, T., Hatanaka, Y., Tsuchida, J., Ganapathy, V. & Setou, M. Amino Acid Transporter ATA2 Is Stored at the trans-Golgi Network and Released by Insulin Stimulus in Adipocytes \*. *J. Biol. Chem.* 281, 39273–39284 (2006).
242. Walker, D. K. *et al.* Insulin increases mRNA abundance of the amino acid transporter SLC7A5/LAT1 via an mTORC1-dependent mechanism in skeletal muscle cells. *Physiol. Rep.* 2, e00238 (2014).
243. Wu, J. Y., Robinson, D., Kung, H. J. & Hatzoglou, M. Hormonal regulation of the gene for the type C ecotropic retrovirus receptor in rat liver cells. *J. Virol.* 68, 1615–1623 (1994).
244. Simmons, W. W., Closs, E. I., Cunningham, J. M., Smith, T. W. & Kelly, R. A. Cytokines and Insulin Induce Cationic Amino Acid Transporter (CAT) Expression in Cardiac Myocytes: REGULATION OF L-ARGININE TRANSPORT AND NO PRODUCTION BY CAT-1, CAT-2A, AND CAT-2B (\*). *J. Biol. Chem.* 271, 11694–11702 (1996).
245. González, M. *et al.* Insulin-stimulated L-arginine transport requires SLC7A1 gene expression and is associated with human umbilical vein relaxation. *J. Cell. Physiol.* 226, 2916–2924 (2011).
246. González, M., Flores, C., Pearson, J. D., Casanello, P. & Sobrevia, L. Cell signalling-mediated insulin increase of mRNA expression for cationic amino acid transporters-1 and -2 and membrane hyperpolarization in human umbilical vein endothelial cells. *Pflüg. Arch.* 448, 383–394 (2004).
247. Holcik, M. & Sonenberg, N. Translational control in stress and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 318–327 (2005).
248. Fernandez, J. *et al.* Regulation of Internal Ribosome Entry Site-mediated Translation by Eukaryotic Initiation Factor-2 $\alpha$  Phosphorylation and Translation of a Small Upstream Open Reading Frame \*. *J. Biol. Chem.* 277, 2050–2058 (2002).
249. Antal, C. E. *et al.* Cancer-Associated Protein Kinase C Mutations Reveal Kinase's Role as Tumor Suppressor. *Cell* 160, 489–502 (2015).
250. Bode, B. P., Reuter, N., Conroy, J. L. & Souba, W. W. Protein kinase C regulates nutrient uptake and growth in hepatoma cells. *Surgery* 124, 260–268 (1998).

251. Gräf, P., Förstermann, U. & Closs, E. I. The transport activity of the human cationic amino acid transporter hCAT-1 is downregulated by activation of protein kinase C. *Br. J. Pharmacol.* 132, 1193–1200 (2001).
252. Krotova, K. Y., Zharikov, S. I. & Block, E. R. Classical isoforms of PKC as regulators of CAT-1 transporter activity in pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 284, L1037–L1044 (2003).
253. Rotmann, A., Simon, A., Martiné, U., Habermeier, A. & Closs, E. I. Activation of classical protein kinase C decreases transport via systems  $\gamma^+$  and  $\gamma^+L$ . *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C2259–2268 (2007).
254. Zharikov, S. I., Krotova, K. Y., Belayev, L. & Block, E. R. Pertussis toxin activates l-arginine uptake in pulmonary endothelial cells through downregulation of PKC- $\alpha$  activity. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 286, L974–L983 (2004).
255. Rotmann, A., Strand, D., Martiné, U. & Closs, E. I. Protein kinase C activation promotes the internalization of the human cationic amino acid transporter hCAT-1. A new regulatory mechanism for hCAT-1 activity. *J. Biol. Chem.* 279, 54185–54192 (2004).
256. Rotmann, A. *et al.* Activation of classical protein kinase C reduces the expression of human cationic amino acid transporter 3 (hCAT-3) in the plasma membrane. *Biochem. J.* 395, 117–123 (2006).
257. Vina-Vilaseca, A., Bender-Sigel, J., Sorkina, T., Closs, E. I. & Sorkin, A. Protein Kinase C-dependent Ubiquitination and Clathrin-mediated Endocytosis of the Cationic Amino Acid Transporter CAT-1\*, *J. Biol. Chem.* 286, 8697–8706 (2011).
258. Racké, K. *et al.* Activation of l-arginine transport by protein kinase C in rabbit, rat and mouse alveolar macrophages. *J. Physiol.* 511, 813–825 (1998).
259. Samluk, Ł., Czeredys, M., Skowronek, K. & Nałęcz, K. A. Protein kinase C regulates amino acid transporter ATB0,+ *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 422, 64–69 (2012).
260. Yang, J. *et al.* Cloning and molecular characterization of cationic amino acid transporter  $\gamma^+LAT1$  in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Fish Physiol. Biochem.* 40, 93–104 (2014).
261. Nitzan, T., Rozenberg, P. & Cnaani, A. 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 (2017).
262. Orozco, Z. G. A., Soma, S., Kaneko, T. & Watanabe, S. 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, 212 (2018).
263. Song, F. *et al.* The differences in postprandial free amino acid concentrations and the gene expression of PepT1 and amino acid transporters after fishmeal partial replacement by meat and bone meal in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquac. Res.* 48, 3766–3781 (2017).
264. Wu, P. *et al.* 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 (2016).
265. Brezas, A., Kumar, V., Overturf, K. & Hardy, R. W. 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 (2021).



266. Zhang, Y.-L. *et al.* 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 (2019).
267. Skiba-Cassy, S., Geurden, I., Panserat, S. & Seiliez, I. 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 (2016).
268. Gomes, A. S. *et al.* Identification and characterization of the Atlantic salmon peptide transporter 1a. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 318, C191–C204 (2020).
269. Gu, Q. *et al.* Genetic ablation of solute carrier family 7a3a leads to hepatic steatosis in zebrafish during fasting. *Hepatology* 60, 1929–1941 (2014).
270. Asaoka, Y., Nagai, Y., Namae, M., Furutani-Seiki, M. & Nishina, H. 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 (2016).
271. Deval, C. *et al.* 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 (2009).
272. Sikalidis, A. K., Lee, J.-I. & Stipanuk, M. H. Gene expression and integrated stress response in HepG2/C3A cells cultured in amino acid deficient medium. *Amino Acids* 41, 159–171 (2011).
273. Hellsten, S. V., Lekholm, E., Ahmad, T. & Fredriksson, R. The gene expression of numerous SLC transporters is altered in the immortalized hypothalamic cell line N25/2 following amino acid starvation. *FEBS Open Bio* 7, 249–264 (2017).
274. Shan, J., Lopez, M.-C., Baker, H. V. & Kilberg, M. S. Expression profiling after activation of amino acid deprivation response in HepG2 human hepatoma cells. *Physiol. Genomics* 41, 315–327 (2010).
275. Kokkinakis, D. M. *et al.* Modulation of Gene Expression in Human Central Nervous System Tumors under Methionine Deprivation-induced Stress. *Cancer Res.* 64, 7513–7525 (2004).
276. Lopez-Bergami, P. *et al.* Re-wired ERK-JNK signaling pathways in melanoma. *Cancer Cell* 11, 447–460 (2007).
277. Liu, H. *et al.* Mutual regulation of c-Jun and ATF2 by transcriptional activation and subcellular localization. *EMBO J.* 25, 1058–1069 (2006).
278. Harding, H. P., Zhang, Y. & Ron, D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397, 271–274 (1999).
279. Ron, D. & Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 519–529 (2007).
280. Levin, D. H., Petryshyn, R. & London, I. M. Characterization of double-stranded-RNA-activated kinase that phosphorylates  $\alpha$  subunit of eukaryotic initiation factor 2 (eIF-2 $\alpha$ ) in reticulocyte lysates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 832–836 (1980).
281. Lemaire, P. A., Lary, J. & Cole, J. L. Mechanism of PKR activation: dimerization and kinase activation in the absence of double-stranded RNA. *J. Mol. Biol.* 345, 81–90 (2005).
282. Han. Heme-regulated eIF2 $\alpha$  kinase (HRI) is required for translational regulation and survival of erythroid precursors in iron deficiency. *EMBO J.* 20, 6909–6918 (2001).
283. Chefalo, P. J., Oh, J., Rafie-Kolpin, M., Kan, B. & Chen, J.-J. Heme-regulated eIF-2 $\alpha$  kinase purifies as a hemoprotein. *Eur. J. Biochem.* 258, 820–830 (1998).

284. Berlanga, J. J., Santoyo, J. & Haro, C. de. Characterization of a mammalian homolog of the GCN2 eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinase. *Eur. J. Biochem.* 265, 754–762 (1999).
285. Dittmar, K. A., Sørensen, M. A., Elf, J., Ehrenberg, M. & Pan, T. Selective charging of tRNA isoacceptors induced by amino-acid starvation. *EMBO Rep.* 6, 151–157 (2005).
286. Wek, S. A., Zhu, S. & Wek, R. C. The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 $\alpha$  protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4497–4506 (1995).
287. Zhu, S., Sobolev, A. Y. & Wek, R. C. Histidyl-tRNA synthetase-related sequences in GCN2 protein kinase regulate in vitro phosphorylation of eIF-2. *J. Biol. Chem.* 271, 24989–24994 (1996).
288. Narasimhan, J., Staschke, K. A. & Wek, R. C. Dimerization Is Required for Activation of eIF2 Kinase Gcn2 in Response to Diverse Environmental Stress Conditions \*. *J. Biol. Chem.* 279, 22820–22832 (2004).
289. Lageix, S., Zhang, J., Rothenburg, S. & Hinnebusch, A. G. Interaction between the tRNA-Binding and C-Terminal Domains of Yeast Gcn2 Regulates Kinase Activity In Vivo. *PLoS Genet.* 11, e1004991 (2015).
290. Romano, P. R. *et al.* Autophosphorylation in the activation loop is required for full kinase activity in vivo of human and yeast eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinases PKR and GCN2. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2282–2297 (1998).
291. Sood, R., Porter, A. C., Olsen, D., Cavener, D. R. & Wek, R. C. A Mammalian Homologue of GCN2 Protein Kinase Important for Translational Control by Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor-2 $\alpha$ . *Genetics* 154, 787–801 (2000).
292. Vaughan, M. H. & Hansen, B. S. Control of initiation of protein synthesis in human cells. Evidence for a role of uncharged transfer ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 248, 7087–7096 (1973).
293. Hansen, B. S., Vaughan, M. H. & Wang, L. Reversible Inhibition by Histidinol of Protein Synthesis in Human Cells at the Activation of Histidine. *J. Biol. Chem.* 247, 3854–3857 (1972).
294. Zhang, P. *et al.* The GCN2 eIF2 $\alpha$  kinase is required for adaptation to amino acid deprivation in mice. *Mol. Cell. Biol.* 22, 6681–6688 (2002).
295. Keller, T. L. *et al.* Halofuginone and other febrifugine derivatives inhibit prolyl-tRNA synthetase. *Nat. Chem. Biol.* 8, 311–317 (2012).
296. Lu, W., László, C. F., Miao, Z., Chen, H. & Wu, S. The Role of Nitric-oxide Synthase in the Regulation of UVB Light-induced Phosphorylation of the  $\alpha$  Subunit of Eukaryotic Initiation Factor 2 \*. *J. Biol. Chem.* 284, 24281–24288 (2009).
297. Berlanga, J. J. *et al.* Antiviral effect of the mammalian translation initiation factor 2 $\alpha$  kinase GCN2 against RNA viruses. *EMBO J.* 25, 1730–1740 (2006).
298. Krishnamoorthy, J., Mounir, Z., Raven, J. & Koromilas, A. The eIF2 $\alpha$  kinases inhibit vesicular stomatitis virus replication independently of eIF2 phosphorylation. *Cell Cycle* 7, 2346–2351 (2008).
299. Won, S. *et al.* Increased Susceptibility to DNA Virus Infection in Mice with a GCN2 Mutation. *J. Virol.* 86, 1802–1808 (2012).
300. Ye, J. *et al.* The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *EMBO J.* 29, 2082–2096 (2010).
301. Pali, S. S. *et al.* Specificity of amino acid regulated gene expression: analysis of genes subjected to either complete or single amino acid deprivation. *Amino Acids* 37, 79–88 (2009).

302. Harding, H. P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H. & Ron, D. Perk Is Essential for Translational Regulation and Cell Survival during the Unfolded Protein Response. *Mol. Cell* 5, 897–904 (2000).
303. Harding, H. P. *et al.* Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk<sup>-/-</sup> mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol. Cell* 7, 1153–1163 (2001).
304. Lu, P. D., Harding, H. P. & Ron, D. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J. Cell Biol.* 167, 27–33 (2004).
305. Hinnebusch, A. G. Translational regulation of yeast GCN4. A window on factors that control initiator-trna binding to the ribosome. *J. Biol. Chem.* 272, 21661–21664 (1997).
306. Vattam, K. M. & Wek, R. C. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 11269–11274 (2004).
307. Hai, T. & Curran, T. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 3720–3724 (1991).
308. Guerrini, L., Gong, S. S., Mangasarian, K. & Basilico, C. Cis- and trans-acting elements involved in amino acid regulation of asparagine synthetase gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3202–3212 (1993).
309. Barbosa-Tessmann, I. P. *et al.* Activation of the Human Asparagine Synthetase Gene by the Amino Acid Response and the Endoplasmic Reticulum Stress Response Pathways Occurs by Common Genomic Elements \*. *J. Biol. Chem.* 275, 26976–26985 (2000).
310. Zhong, C., Chen, C. & Kilberg, M. S. Characterization of the nutrient-sensing response unit in the human asparagine synthetase promoter. *Biochem. J.* 372, 603–609 (2003).
311. Bruhat, A. *et al.* Amino Acid Limitation Induces Expression of CHOP, a CCAAT/Enhancer Binding Protein-related Gene, at Both Transcriptional and Post-transcriptional Levels \*. *J. Biol. Chem.* 272, 17588–17593 (1997).
312. 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).
313. Bruhat, A. *et al.* Differences in the Molecular Mechanisms Involved in the Transcriptional Activation of the CHOP and Asparagine Synthetase Genes in Response to Amino Acid Deprivation or Activation of the Unfolded Protein Response \*. *J. Biol. Chem.* 277, 48107–48114 (2002).
314. Bain, P. J. *et al.* The Mechanism for Transcriptional Activation of the Human ATA2 Transporter Gene by Amino Acid Deprivation is Different than That for Asparagine Synthetase. *J. Nutr.* 132, 3023–3029 (2002).
315. Pan, Y.-X., Chen, H., Thiaville, M. M. & Kilberg, M. S. Activation of the ATF3 gene through a co-ordinated amino acid-sensing response programme that controls transcriptional regulation of responsive genes following amino acid limitation. *Biochem. J.* 401, 299–307 (2006).
316. Lopez, A. B. *et al.* A feedback transcriptional mechanism controls the level of the arginine/lysine transporter cat-1 during amino acid starvation. *Biochem. J.* 402, 163–173 (2007).
317. Kilberg, M. S., Shan, J. & Su, N. ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 20, 436–443 (2009).
318. Watatani, Y. *et al.* Stress-induced Translation of ATF5 mRNA Is Regulated by the 5'-Untranslated Region\*. *J. Biol. Chem.* 283, 2543–2553 (2008).

319. Zhou, D. *et al.* Phosphorylation of eIF2 Directs ATF5 Translational Control in Response to Diverse Stress Conditions \*. *J. Biol. Chem.* 283, 7064–7073 (2008).
320. Sarraj, J. A., Vinson, C. & Thiel, G. Regulation of asparagine synthetase gene transcription by the basic region leucine zipper transcription factors ATF5 and CHOP. *Biol. Chem.* 386, 873–879 (2005).
321. Harding, H. P. *et al.* An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress. *Mol. Cell* 11, 619–633 (2003).
322. Pan, Y.-X., Chen, H., Thiaville, M. M. & Kilberg, M. S. Activation of the ATF3 gene through a co-ordinated amino acid-sensing response programme that controls transcriptional regulation of responsive genes following amino acid limitation. *Biochem. J.* 401, 299–307 (2007).
323. Jiang, H.-Y. *et al.* Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response. *Mol. Cell. Biol.* 24, 1365–1377 (2004).
324. Pan, Y., Chen, H., Siu, F. & Kilberg, M. S. Amino Acid Deprivation and Endoplasmic Reticulum Stress Induce Expression of Multiple Activating Transcription Factor-3 mRNA Species That, When Overexpressed in HepG2 Cells, Modulate Transcription by the Human Asparagine Synthetase Promoter \*. *J. Biol. Chem.* 278, 38402–38412 (2003).
325. Pan, Y.-X., Chen, H. & Kilberg, M. S. Interaction of RNA-binding Proteins HuR and AUF1 with the Human ATF3 mRNA 3'-Untranslated Region Regulates Its Amino Acid Limitation-induced Stabilization \*. *J. Biol. Chem.* 280, 34609–34616 (2005).
326. Fujita, Y. *et al.* CHOP (C/EBP homologous protein) and ASNS (asparagine synthetase) induction in cybrid cells harboring MELAS and NARP mitochondrial DNA mutations. *Mitochondrion* 7, 80–88 (2007).
327. Jousse, C. *et al.* Inhibition of CHOP translation by a peptide encoded by an open reading frame localized in the chop 5'UTR. *Nucleic Acids Res.* 29, 4341–4351 (2001).
328. Su, N. & Kilberg, M. S. 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 (2008).
329. Jousse, C. *et al.* TRB3 inhibits the transcriptional activation of stress-regulated genes by a negative feedback on the ATF4 pathway. *J. Biol. Chem.* 282, 15851–15861 (2007).
330. Marciniak, S. J. *et al.* CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 18, 3066–3077 (2004).
331. Ma, Y. & Hendershot, L. M. Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* 278, 34864–34873 (2003).
332. Brush, M. H., Weiser, D. C. & Shenolikar, S. Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein GADD34 Targets Protein Phosphatase 1 $\alpha$  to the Endoplasmic Reticulum and Promotes Dephosphorylation of the  $\alpha$  Subunit of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1292–1303 (2003).
333. Novoa, I., Zeng, H., Harding, H. P. & Ron, D. Feedback Inhibition of the Unfolded Protein Response by GADD34-Mediated Dephosphorylation of eIF2 $\alpha$ . *J. Cell Biol.* 153, 1011–1022 (2001).
334. Choy, M. S. *et al.* Structural and functional analysis of the GADD34:PP1 eIF2 $\alpha$  phosphatase. *Cell Rep.* 11, 1885–1891 (2015).
335. Puthalakath, H. *et al.* ER Stress Triggers Apoptosis by Activating BH3-Only Protein Bim. *Cell* 129, 1337–1349 (2007).

336. Ghosh, A. P., Klocke, B. J., Ballestas, M. E. & Roth, K. A. CHOP Potentially Co-Operates with FOXO3a in Neuronal Cells to Regulate PUMA and BIM Expression in Response to ER Stress. *PLoS ONE* 7, e39586 (2012).
337. Galehdar, Z. *et al.* Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF4-CHOP-mediated induction of the Bcl-2 homology 3-only member PUMA. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 16938–16948 (2010).
338. Li, T. *et al.* DDIT3 and KAT2A Proteins Regulate TNFRSF10A and TNFRSF10B Expression in Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Apoptosis in Human Lung Cancer Cells \*. *J. Biol. Chem.* 290, 11108–11118 (2015).
339. Chen, P. *et al.* Neddylation Inhibition Activates the Extrinsic Apoptosis Pathway through ATF4–CHOP–DR5 Axis in Human Esophageal Cancer Cells. *Clin. Cancer Res.* 22, 4145–4157 (2016).
340. Edagawa, M. *et al.* Role of Activating Transcription Factor 3 (ATF3) in Endoplasmic Reticulum (ER) Stress-induced Sensitization of p53-deficient Human Colon Cancer Cells to Tumor Necrosis Factor (TNF)-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL)-mediated Apoptosis through Up-regulation of Death Receptor 5 (DR5) by Zerumbone and Celecoxib \*. *J. Biol. Chem.* 289, 21544–21561 (2014).
341. Liu, K. *et al.* CHOP mediates ASPP2-induced autophagic apoptosis in hepatoma cells by releasing Beclin-1 from Bcl-2 and inducing nuclear translocation of Bcl-2. *Cell Death Dis.* 5, e1323–e1323 (2014).
342. McCullough, K. D., Martindale, J. L., Klotz, L.-O., Aw, T.-Y. & Holbrook, N. J. Gadd153 Sensitizes Cells to Endoplasmic Reticulum Stress by Down-Regulating Bcl2 and Perturbing the Cellular Redox State. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1249–1259 (2001).
343. Edlich, F. *et al.* Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* 145, 104–116 (2011).
344. Wang, X. & Proud, C. G. A Novel Mechanism for the Control of Translation Initiation by Amino Acids, Mediated by Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor 2B. *Mol. Cell. Biol.* 28, 1429–1442 (2008).
345. Bruhat, A. *et al.* Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. *J. Biol. Chem.* 272, 17588–17593 (1997).
346. Hutson, R. G. & Kilberg, M. S. Cloning of rat asparagine synthetase and specificity of the amino acid-dependent control of its mRNA content. *Biochem. J.* 304, 745–750 (1994).
347. Jousse, C., Bruhat, A., Ferrara, M. & Fafournoux, P. Evidence for Multiple Signaling Pathways in the Regulation of Gene Expression by Amino Acids in Human Cell Lines. *J. Nutr.* 130, 1555–1560 (2000).
348. Vallejo, M., Ron, D., Miller, C. P. & Habener, J. F. C/ATF, a member of the activating transcription factor family of DNA-binding proteins, dimerizes with CAAT/enhancer-binding proteins and directs their binding to cAMP response elements. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 4679–4683 (1993).
349. Ohoka, N., Yoshii, S., Hattori, T., Onozaki, K. & Hayashi, H. TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J.* 24, 1243–1255 (2005).
350. Carraro, V. *et al.* Amino acid availability controls TRB3 transcription in liver through the GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway. *PLoS One* 5, e15716 (2010).
351. Du, K., Herzig, S., Kulkarni, R. N. & Montminy, M. TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* 300, 1574–1577 (2003).

352. Brüning, A., Rahmeh, M. & Friese, K. Nelfinavir and bortezomib inhibit mTOR activity via ATF4-mediated sestrin-2 regulation. *Mol. Oncol.* 7, 1012–1018 (2013).
353. Ding, B. *et al.* Sestrin2 is induced by glucose starvation via the unfolded protein response and protects cells from non-canonical necroptotic cell death. *Sci. Rep.* 6, 22538 (2016).
354. Xu, D. *et al.* ATF4-Mediated Upregulation of REDD1 and Sestrin2 Suppresses mTORC1 Activity during Prolonged Leucine Deprivation. *J. Nutr.* 150, 1022–1030 (2020).
355. B'chir, W. *et al.* The eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* 41, 7683–7699 (2013).
356. Chen, H., Pan, Y.-X., Dudenhausen, E. E. & Kilberg, M. S. Amino Acid Deprivation Induces the Transcription Rate of the Human Asparagine Synthetase Gene through a Timed Program of Expression and Promoter Binding of Nutrient-responsive Basic Region/Leucine Zipper Transcription Factors as Well as Localized Histone Acetylation \*. *J. Biol. Chem.* 279, 50829–50839 (2004).
357. Siu, F., Bain, P. J., LeBlanc-Chaffin, R., Chen, H. & Kilberg, M. S. ATF4 Is a Mediator of the Nutrient-sensing Response Pathway That Activates the Human Asparagine Synthetase Gene \*. *J. Biol. Chem.* 277, 24120–24127 (2002).
358. Richards, N. G. J. & Kilberg, M. S. Asparagine synthetase chemotherapy. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 629–654 (2006).
359. Ye, J. *et al.* The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *EMBO J.* 29, 2082–2096 (2010).
360. Averous, J. *et al.* Induction of CHOP Expression by Amino Acid Limitation Requires Both ATF4 Expression and ATF2 Phosphorylation \*. *J. Biol. Chem.* 279, 5288–5297 (2004).
361. Séité, S. *et al.* Dietary methionine deficiency affects oxidative status, mitochondrial integrity and mitophagy in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Sci. Rep.* 8, 10151 (2018).
362. Sato, H. *et al.* Transcriptional control of cystine/glutamate transporter gene by amino acid deprivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325, 109–116 (2004).
363. Palii, S. S., Thiaville, M. M., Pan, Y.-X., Zhong, C. & Kilberg, M. S. Characterization of the amino acid response element within the human sodium-coupled neutral amino acid transporter 2 (SNAT2) System A transporter gene. *Biochem. J.* 395, 517–527 (2006).
364. Huang, C. C. *et al.* A Bifunctional Intronic Element Regulates the Expression of the Arginine/Lysine Transporter Cat-1 via Mechanisms Involving the Purine-rich Element Binding Protein A (Pur $\alpha$ ) \*. *J. Biol. Chem.* 284, 32312–32320 (2009).
365. Skiba-Cassy, S., Geurden, I., Panserat, S. & Seilliez, I. 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 (2016).
366. Harper, A. E., Benevenga, N. J. & Wohlhueter, R. M. Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. *Physiol. Rev.* 50, 428–558 (1970).
367. Gietzen, D. W. Neural Mechanisms in the Responses to Amino Acid Deficiency. *J. Nutr.* 123, 610–625 (1993).
368. Leung, P. & Rogers, Q. Importance of prepyriform cortex in food-intake response of rats to amino acids. *Am. J. Physiol.-Leg. Content* 221, 929–935 (1971).
369. Firman, J. D. & Kuenzel, W. J. Neuroanatomical regions of the chick brain involved in monitoring amino acid deficient diets. *Brain Res. Bull.* 21, 637–642 (1988).

370. Beverly, J. L., Gietzen, D. W. & Rogers, Q. R. Effect of dietary limiting amino acid in prepyriform cortex on food intake. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 259, R709–R715 (1990).
371. Blevins, J. E., Dixon, K. D., Hernandez, E. J., Barrett, J. A. & Gietzen, D. W. Effects of threonine injections in the lateral hypothalamus on intake of amino acid imbalanced diets in rats. *Brain Res.* 879, 65–72 (2000).
372. Hao, S. *et al.* Uncharged tRNA and Sensing of Amino Acid Deficiency in Mammalian Piriform Cortex. *Science* 307, 1776–1778 (2005).
373. Maurin, A.-C. *et al.* The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores. *Cell Metab.* 1, 273–277 (2005).
374. Maurin, A.-C. *et al.* Hypothalamic eIF2 $\alpha$  Signaling Regulates Food Intake. *Cell Rep.* 6, 438–444 (2014).
375. Garner, J. N., Joshi, B. & Jagus, R. Characterization of rainbow trout and zebrafish eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  and its response to endoplasmic reticulum stress and IPNV infection. *Dev. Comp. Immunol.* 27, 217–231 (2003).
376. Belghit, I. *et al.* Dietary methionine availability affects the main factors involved in muscle protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nutr.* 112, 493–503 (2014).
377. Séité, S. *et al.* Early feeding of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with methionine-deficient diet over a 2 week period: consequences for liver mitochondria in juveniles. *J. Exp. Biol.* 222, jeb203687 (2019).
378. Vézina, C., Kudelski, A. & Sehgal, S. N. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot. (Tokyo)* 28, 721–726 (1975).
379. Brown, E. J. *et al.* A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin–receptor complex. *Nature* 369, 756–758 (1994).
380. Feldman, M. E. *et al.* Active-Site Inhibitors of mTOR Target Rapamycin-Resistant Outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLOS Biol.* 7, e1000038 (2009).
381. Sarbassov, D. D. *et al.* Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. *Mol. Cell* 22, 159–168 (2006).
382. Kim, D.-H. *et al.* G $\beta$ L, a Positive Regulator of the Rapamycin-Sensitive Pathway Required for the Nutrient-Sensitive Interaction between Raptor and mTOR. *Mol. Cell* 11, 895–904 (2003).
383. Schalm, S. S., Fingar, D. C., Sabatini, D. M. & Blenis, J. TOS Motif-Mediated Raptor Binding Regulates 4E-BP1 Multisite Phosphorylation and Function. *Curr. Biol.* 13, 797–806 (2003).
384. Nojima, H. *et al.* The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *J. Biol. Chem.* 278, 15461–15464 (2003).
385. Schalm, S. S. & Blenis, J. Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. *Curr. Biol. CB* 12, 632–639 (2002).
386. Yang, H. *et al.* Mechanisms of mTORC1 activation by RHEB and inhibition by PRAS40. *Nature* 552, 368–373 (2017).
387. Peterson, T. R. *et al.* DEPTOR Is an mTOR Inhibitor Frequently Overexpressed in Multiple Myeloma Cells and Required for Their Survival. *Cell* 137, 873–886 (2009).
388. Guertin, D. A. *et al.* Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC $\alpha$ , but not S6K1. *Dev. Cell* 11, 859–871 (2006).

389. Hwang, Y. *et al.* Disruption of the Scaffolding Function of mLST8 Selectively Inhibits mTORC2 Assembly and Function and Suppresses mTORC2-Dependent Tumor Growth In Vivo. *Cancer Res.* 79, 3178–3184 (2019).
390. Aimbetov, R. *et al.* Integrity of mTORC2 is dependent on the rictor Gly-934 site. *Oncogene* 31, 2115–2120 (2012).
391. Jacinto, E. *et al.* SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 127, 125–137 (2006).
392. Pearce, L. R. *et al.* Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem. J.* 405, 513–522 (2007).
393. Hara, K. *et al.* Regulation of eIF-4E BP1 Phosphorylation by mTOR \*. *J. Biol. Chem.* 272, 26457–26463 (1997).
394. Gingras, A.-C. *et al.* Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev.* 13, 1422–1437 (1999).
395. Brunn, G. J. *et al.* Phosphorylation of the Translational Repressor PHAS-I by the Mammalian Target of Rapamycin. *Science* (1997).
396. Burnett, P. E., Barrow, R. K., Cohen, N. A., Snyder, S. H. & Sabatini, D. M. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 1432–1437 (1998).
397. Frödin, M. *et al.* A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation. *EMBO J.* 21, 5396–5407 (2002).
398. Alessi, D. R., Kozlowski, M. T., Weng, Q. P., Morrice, N. & Avruch, J. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. *Curr. Biol. CB* 8, 69–81 (1998).
399. Pullen, N. *et al.* Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science* 279, 707–710 (1998).
400. Hannan, K. M. *et al.* mTOR-Dependent Regulation of Ribosomal Gene Transcription Requires S6K1 and Is Mediated by Phosphorylation of the Carboxy-Terminal Activation Domain of the Nucleolar Transcription Factor UBF<sup>†</sup>. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8862–8877 (2003).
401. Holz, M. K., Ballif, B. A., Gygi, S. P. & Blenis, J. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* 123, 569–580 (2005).
402. Ruvinsky, I. *et al.* Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev.* 19, 2199–2211 (2005).
403. Chung, J., Kuo, C. J., Crabtree, G. R. & Blenis, J. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell* 69, 1227–1236 (1992).
404. Shima, H. *et al.* Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *EMBO J.* 17, 6649–6659 (1998).
405. Peng, T., Golub, T. R. & Sabatini, D. M. The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5575–5584 (2002).
406. Mauvoisin, D. *et al.* Role of the PI3-kinase/mTor pathway in the regulation of the stearoyl CoA desaturase (SCD1) gene expression by insulin in liver. *J. Cell Commun. Signal.* 1, 113–125 (2007).



407. Li, S., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 3441–3446 (2010).
408. Li, S. *et al.* Role of S6K1 in regulation of SREBP1c expression in the liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412, 197–202 (2011).
409. Düvel, K. *et al.* Activation of a Metabolic Gene Regulatory Network Downstream of mTOR Complex 1. *Mol. Cell* 39, 171–183 (2010).
410. Porstmann, T. *et al.* SREBP Activity Is Regulated by mTORC1 and Contributes to Akt-Dependent Cell Growth. *Cell Metab.* 8, 224–236 (2008).
411. Peterson, T. R. *et al.* mTOR Complex 1 Regulates Lipin 1 Localization to Control the SREBP Pathway. *Cell* 146, 408–420 (2011).
412. Schieke, S. M. *et al.* The Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Pathway Regulates Mitochondrial Oxygen Consumption and Oxidative Capacity \*. *J. Biol. Chem.* 281, 27643–27652 (2006).
413. Cunningham, J. T. *et al.* mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 $\alpha$  transcriptional complex. *Nature* 450, 736–740 (2007).
414. Bentzinger, C. F. *et al.* Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy. *Cell Metab.* 8, 411–424 (2008).
415. Land, S. C. & Tee, A. R. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *J. Biol. Chem.* 282, 20534–20543 (2007).
416. Dodd, K. M., Yang, J., Shen, M. H., Sampson, J. R. & Tee, A. R. mTORC1 drives HIF-1 $\alpha$  and VEGF-A signalling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3. *Oncogene* 34, 2239–2250 (2015).
417. Myers, M. G. *et al.* IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10350–10354 (1992).
418. Alessi, D. R. *et al.* Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 15, 6541–6551 (1996).
419. Alessi, D. R. *et al.* Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B $\alpha$ . *Curr. Biol. CB* 7, 261–269 (1997).
420. Nascimento, E. B. M. *et al.* Phosphorylation of PRAS40 on Thr246 by PKB/AKT facilitates efficient phosphorylation of Ser183 by mTORC1. *Cell. Signal.* 22, 961–967 (2010).
421. Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K. & Avruch, J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr. Biol. CB* 15, 702–713 (2005).
422. Manning, B. D., Tee, A. R., Logsdon, M. N., Blenis, J. & Cantley, L. C. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol. Cell* 10, 151–162 (2002).
423. Inoki, K., Zhu, T. & Guan, K.-L. TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. *Cell* 115, 577–590 (2003).
424. Menon, S. *et al.* Spatial Control of the TSC Complex Integrates Insulin and Nutrient Regulation of mTORC1 at the Lysosome. *Cell* 156, 771–785 (2014).
425. Demetriades, C., Doumpas, N. & Teleman, A. A. Regulation of TORC1 in response to amino acid starvation via lysosomal recruitment of TSC2. *Cell* 156, 786–799 (2014).
426. Garami, A. *et al.* Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol. Cell* 11, 1457–1466 (2003).

427. Sancak, Y. *et al.* Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 141, 290–303 (2010).
428. Schürmann, A., Brauers, A., Maßmann, S., Becker, W. & Joost, H.-G. Cloning of a Novel Family of Mammalian GTP-binding Proteins (RagA, RagBs, RagB1) with Remote Similarity to the Ras-related GTPases \*. *J. Biol. Chem.* 270, 28982–28988 (1995).
429. Hirose, E., Nakashima, N., Sekiguchi, T. & Nishimoto, T. RagA is a functional homologue of *S. cerevisiae* Gtr1p involved in the Ran/Gsp1-GTPase pathway. *J. Cell Sci.* 111, 11–21 (1998).
430. Sekiguchi, T., Hirose, E., Nakashima, N., Li, M. & Nishimoto, T. Novel G Proteins, Rag C and Rag D, Interact with GTP-binding Proteins, Rag A and Rag B \*. *J. Biol. Chem.* 276, 7246–7257 (2001).
431. Baba, M. *et al.* Folliculin encoded by the BHD gene interacts with a binding protein, FNIP1, and AMPK, and is involved in AMPK and mTOR signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 15552–15557 (2006).
432. Petit, C. S., Rocznik-Ferguson, A. & Ferguson, S. M. Recruitment of folliculin to lysosomes supports the amino acid-dependent activation of Rag GTPases. *J. Cell Biol.* 202, 1107–1122 (2013).
433. Lawrence, R. E. *et al.* Structural mechanism of a Rag GTPase activation checkpoint by the lysosomal folliculin complex. *Science* (2019).
434. Stransky, L. A. & Forgac, M. Amino Acid Availability Modulates Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase Assembly. *J. Biol. Chem.* 290, 27360–27369 (2015).
435. Bar-Peled, L., Schweitzer, L. D., Zoncu, R. & Sabatini, D. M. Ragulator Is a GEF for the Rag GTPases that Signal Amino Acid Levels to mTORC1. *Cell* 150, 1196–1208 (2012).
436. Shen, K. *et al.* Architecture of the human GATOR1 and GATOR1–Rag GTPases complexes. *Nature* 556, 64–69 (2018).
437. Bar-Peled, L. *et al.* A Tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *Science* 340, 1100–1106 (2013).
438. Chantranupong, L. *et al.* The CASTOR Proteins Are Arginine Sensors for the mTORC1 Pathway. *Cell* 165, 153–164 (2016).
439. Saxton, R. A. *et al.* Structural basis for leucine sensing by the Sestrin2-mTORC1 pathway. *Science* 351, 53–58 (2016).
440. Wolfson, R. L. *et al.* Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway. *Science* (2016).
441. Mentch, S. J. *et al.* Histone Methylation Dynamics and Gene Regulation Occur through the Sensing of One-Carbon Metabolism. *Cell Metab.* 22, 861–873 (2015).
442. Quinlan, C. L. *et al.* Targeting S-adenosylmethionine biosynthesis with a novel allosteric inhibitor of Mat2A. *Nat. Chem. Biol.* 13, 785–792 (2017).
443. Gu, X. *et al.* SAMTOR is an S-adenosylmethionine sensor for the mTORC1 pathway. *Science* (2017).
444. Shen, K. & Sabatini, D. M. Ragulator and SLC38A9 activate the Rag GTPases through noncanonical GEF mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 9545–9550 (2018).
445. Beaumatin, F. *et al.* mTORC1 Activation Requires DRAM-1 by Facilitating Lysosomal Amino Acid Efflux. *Mol. Cell* 76, 163–176.e8 (2019).
446. Amick, J., Rocznik-Ferguson, A. & Ferguson, S. M. C9orf72 binds SMCR8, localizes to lysosomes, and regulates mTORC1 signaling. *Mol. Biol. Cell* 27, 3040–3051 (2016).
447. Nicklin, P. *et al.* Bidirectional Transport of Amino Acids Regulates mTOR and Autophagy. *Cell* 136, 521–534 (2009).

448. Bröer, A., Wagner, C. A., Lang, F. & Bröer, S. The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/y+LAT2 mediates arginine efflux in exchange with glutamine. *Biochem. J.* 349, 787–795 (2000).
449. Colombani, J. *et al.* A Nutrient Sensor Mechanism Controls Drosophila Growth. *Cell* 114, 739–749 (2003).
450. Coothankandaswamy, V. *et al.* Amino acid transporter SLC6A14 is a novel and effective drug target for pancreatic cancer. *Br. J. Pharmacol.* 173, 3292–3306 (2016).
451. Babu, E. *et al.* Deletion of the amino acid transporter Slc6a14 suppresses tumour growth in spontaneous mouse models of breast cancer. *Biochem. J.* 469, 17–23 (2015).
452. Inoki, K. *et al.* TSC2 Integrates Wnt and Energy Signals via a Coordinated Phosphorylation by AMPK and GSK3 to Regulate Cell Growth. *Cell* 126, 955–968 (2006).
453. Liu, L. *et al.* Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Mol. Cell* 21, 521–531 (2006).
454. Gwinn, D. M. *et al.* AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* 30, 214–226 (2008).
455. Seilliez, 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–R335 (2008).
456. Seilliez, I. *et al.* Amino acids downregulate the expression of several autophagy-related genes in rainbow trout myoblasts. *Autophagy* 8, 364–375 (2012).
457. Lansard, M., Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Seilliez, I. & Skiba-Cassy, S. 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 (2010).
458. 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).
459. Payne, E. M. *et al.* L-leucine improves the anemia and developmental defects associated with Diamond-Blackfan anemia and del(5q) MDS by activating the mTOR pathway. *Blood* 120, 2214–2224 (2012).
460. Han, S.-L. *et al.* The regulation of rapamycin on nutrient metabolism in Nile tilapia fed with high-energy diet. *Aquaculture* 520, 734975 (2020).
461. Vélez, E. J. *et al.* IGF-I and amino acids effects through TOR signaling on proliferation and differentiation of gilthead sea bream cultured myocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 205, 296–304 (2014).
462. Hu, K. *et al.* Effect of dietary glutamine on growth performance, non-specific immunity, expression of cytokine genes, phosphorylation of target of rapamycin (TOR), and anti-oxidative system in spleen and head kidney of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Fish Physiol. Biochem.* 41, 635–649 (2015).
463. Feng, L. *et al.* Threonine Affects Intestinal Function, Protein Synthesis and Gene Expression of TOR in Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *PLOS ONE* 8, e69974 (2013).
464. Fuentes, E. N. *et al.* Nutritional status modulates plasma leptin, AMPK and TOR activation, and mitochondrial biogenesis: Implications for cell metabolism and growth in skeletal muscle of the fine flounder. *Gen. Comp. Endocrinol.* 186, 172–180 (2013).
465. Lansard, M. *et al.* 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 (2009).

466. Dai, W. *et al.* Post-prandial regulation of hepatic glucokinase and lipogenesis requires the activation of TORC1 signalling in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 216, 4483–4492 (2013).
467. Dai, W., Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Seilliez, I. & Skiba-Cassy, S. Amino Acids Attenuate Insulin Action on Gluconeogenesis and Promote Fatty Acid Biosynthesis via mTORC1 Signaling Pathway in trout Hepatocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* 36, 1084–1100 (2015).
468. Skiba-Cassy, S., Lansard, M., Panserat, S. & Médale, F. 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, R1421–1429 (2009).
469. Boya, P., Reggiori, F. & Codogno, P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat. Cell Biol.* 15, 713–720 (2013).
470. Ashford, T. P. & Porter, K. R. CYTOPLASMIC COMPONENTS IN HEPATIC CELL LYSOSOMES. *J. Cell Biol.* 12, 198–202 (1962).
471. De Duve, C. The lysosome. *Sci. Am.* 208, 64–72 (1963).
472. Deter, R. L. & De Duve, C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J. Cell Biol.* 33, 437–449 (1967).
473. Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T. & Ohsumi, Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol.* 119, 301–311 (1992).
474. Tsukada, M. & Ohsumi, Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 333, 169–174 (1993).
475. Yang, Z. & Klionsky, D. J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 124–131 (2010).
476. Mizushima, N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 132–139 (2010).
477. Funderburk, S. F., Wang, Q. J. & Yue, Z. The Beclin 1–VPS34 complex – at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends Cell Biol.* 20, 355–362 (2010).
478. Simonsen, A. & Tooze, S. A. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J. Cell Biol.* 186, 773–782 (2009).
479. Park, J.-M. *et al.* The ULK1 complex mediates MTORC1 signaling to the autophagy initiation machinery via binding and phosphorylating ATG14. *Autophagy* 12, 547–564 (2016).
480. Zhong, Y. *et al.* Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1–phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat. Cell Biol.* 11, 468–476 (2009).
481. Kabeya, Y. *et al.* LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J. Cell Sci.* 117, 2805–2812 (2004).
482. Kabeya, Y. *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19, 5720–5728 (2000).
483. Pankiv, S. *et al.* p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy \*. *J. Biol. Chem.* 282, 24131–24145 (2007).
484. Mathew, R. *et al.* Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 137, 1062–1075 (2009).
485. Bjørkøy, G. *et al.* p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* 171, 603–614 (2005).

486. Kirisako, T. *et al.* Formation Process of Autophagosome Is Traced with Apg8/Aut7p in Yeast. *J. Cell Biol.* 147, 435–446 (1999).
487. Nair, U. *et al.* A role for Atg8–PE deconjugation in autophagosome biogenesis. *Autophagy* 8, 780–793 (2012).
488. Nakatogawa, H., Ishii, J., Asai, E. & Ohsumi, Y. Atg4 recycles inappropriately lipidated Atg8 to promote autophagosome biogenesis. *Autophagy* 8, 177–186 (2012).
489. Yu, Z.-Q. *et al.* Dual roles of Atg8–PE deconjugation by Atg4 in autophagy. *Autophagy* 8, 883–892 (2012).
490. Betin, V. M. S., Singleton, B. K., Parsons, S. F., Anstee, D. J. & Lane, J. D. Autophagy facilitates organelle clearance during differentiation of human erythroblasts. *Autophagy* 9, 881–893 (2013).
491. Fader, C. M. & Colombo, M. I. Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death Differ.* 16, 70–78 (2009).
492. Dunn, W. A., Jr. Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol.* 110, 1935–1945 (1990).
493. Tanaka, Y. *et al.* Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* 406, 902–906 (2000).
494. Stenmark, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 513–525 (2009).
495. Jackson, C. L. & Bouvet, S. Arfs at a Glance. *J. Cell Sci.* 127, 4103–4109 (2014).
496. Gu, Y. *et al.* Mammalian Atg8 proteins regulate lysosome and autolysosome biogenesis through SNAREs. *EMBO J.* 38, e101994 (2019).
497. Langemeyer, L., Fröhlich, F. & Ungermann, C. Rab GTPase Function in Endosome and Lysosome Biogenesis. *Trends Cell Biol.* 28, 957–970 (2018).
498. Gutierrez, M. G., Munafó, D. B., Berón, W. & Colombo, M. I. Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *J. Cell Sci.* 117, 2687–2697 (2004).
499. Hegedús, K. *et al.* The Ccz1-Mon1-Rab7 module and Rab5 control distinct steps of autophagy. *Mol. Biol. Cell* 27, 3132–3142 (2016).
500. Jahreiss, L., Menzies, F. M. & Rubinsztein, D. C. The Itinerary of Autophagosomes: From Peripheral Formation to Kiss-and-Run Fusion with Lysosomes. *Traffic* 9, 574–587 (2008).
501. Kimura, S., Noda, T. & Yoshimori, T. Dynein-dependent Movement of Autophagosomes Mediates Efficient Encounters with Lysosomes. *Cell Struct. Funct.* 33, 109–122 (2008).
502. Jiang, P. *et al.* The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Mol. Biol. Cell* 25, 1327–1337 (2014).
503. Mauthe, M. *et al.* Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* 14, 1435–1455 (2018).
504. Klionsky, D. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1. *Autophagy* 17, 1–382 (2021).
505. Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. In Vivo Analysis of Autophagy in Response to Nutrient Starvation Using Transgenic Mice Expressing a Fluorescent Autophagosome Marker. *Mol. Biol. Cell* 15, 1101–1111 (2004).
506. Kuma, A. *et al.* The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432, 1032–1036 (2004).
507. Mariño, G. *et al.* Regulation of Autophagy by Cytosolic Acetyl-Coenzyme A. *Mol. Cell* 53, 710–725 (2014).

508. Mortimore, G. E. & Schworer, C. M. Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver. *Nature* 270, 174–176 (1977).
509. Kristensen, A. R. *et al.* Ordered organelle degradation during starvation-induced autophagy. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 7, 2419–2428 (2008).
510. B'chir, W. *et al.* The eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* 41, 7683–7699 (2013).
511. Ogata, M. *et al.* Autophagy Is Activated for Cell Survival after Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol. Cell. Biol.* 26, 9220–9231 (2006).
512. B'chir, W. *et al.* Dual role for CHOP in the crosstalk between autophagy and apoptosis to determine cell fate in response to amino acid deprivation. *Cell. Signal.* 26, 1385–1391 (2014).
513. Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. & Guan, K.-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* 13, 132–141 (2011).
514. Hosokawa, N. *et al.* Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* 20, 1981–1991 (2009).
515. Shang, L. *et al.* Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 4788–4793 (2011).
516. Jung, C. H. *et al.* ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Mol. Biol. Cell* 20, 1992–2003 (2009).
517. Yuan, H.-X., Russell, R. C. & Guan, K.-L. Regulation of PIK3C3/VPS34 complexes by MTOR in nutrient stress-induced autophagy. *Autophagy* 9, 1983–1995 (2013).
518. Wan, W. *et al.* mTORC1-Regulated and HUWE1-Mediated WIPI2 Degradation Controls Autophagy Flux. *Mol. Cell* 72, 303-315.e6 (2018).
519. Palmieri, M. *et al.* Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Hum. Mol. Genet.* 20, 3852–3866 (2011).
520. Braunbeck, T. & Storch, V. Senescence of hepatocytes isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in primary culture. *Protozoa* 170, 138–159 (1992).
521. Seilliez, I. *et al.* An in vivo and in vitro assessment of autophagy-related gene expression in muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 157, 258–266 (2010).
522. Belghit, I. *et al.* Macronutrient Composition of the Diet Affects the Feeding-Mediated Down Regulation of Autophagy in Muscle of Rainbow Trout (*O. mykiss*). *PLOS ONE* 8, e74308 (2013).
523. Yabu, T., Imamura, S., Mizusawa, N., Touhata, K. & Yamashita, M. Induction of Autophagy by Amino Acid Starvation in Fish Cells. *Mar. Biotechnol.* 14, 491–501 (2012).
524. Balasubramanian, M. N. *et al.* Molecular pathways associated with the nutritional programming of plant-based diet acceptance in rainbow trout following an early feeding exposure. *BMC Genomics* 17, 449 (2016).
525. Callet, T. *et al.* 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 (2018).
526. Fryer, J. L., McCain, B. B. & Leong, J. C. A Cell Line Derived from Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Hepatoma. *Fish Pathol.* 15, 193–200 (1981).
527. Lee, L. E. J. *et al.* Development and characterization of a rainbow trout liver cell line expressing cytochrome P450-dependent monooxygenase activity. *Cell Biol. Toxicol.* 9, 279–294 (1993).

528. Kawano, A. *et al.* Development of a rainbow trout intestinal epithelial cell line and its response to lipopolysaccharide. *Aquac. Nutr.* 17, e241–e252 (2011).
529. Wolf, K. & Quimby, M. C. Established Eurythermic Line of Fish Cells in vitro. *Science* (1962).
530. Long, X., Ortiz-Vega, S., Lin, Y. & Avruch, J. Rheb Binding to Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Is Regulated by Amino Acid Sufficiency \*. *J. Biol. Chem.* 280, 23433–23436 (2005).
531. Hutson, R. G. & Kilberg, M. S. Cloning of rat asparagine synthetase and specificity of the amino acid-dependent control of its mRNA content. *Biochem. J.* 304, 745–750 (1994).
532. Seilliez, I. *et al.* Amino acids downregulate the expression of several autophagy-related genes in rainbow trout myoblasts. *Autophagy* 8, 364–375 (2012).
533. Kaizuka, T. *et al.* An Autophagic Flux Probe that Releases an Internal Control. *Mol. Cell* 64, 835–849 (2016).
534. Belghit, I. *et al.* Macronutrient Composition of the Diet Affects the Feeding-Mediated Down Regulation of Autophagy in Muscle of Rainbow Trout (*O. mykiss*). *PLOS ONE* 8, e74308 (2013).
535. Chen, H., Pan, Y.-X., Dudenhausen, E. E. & Kilberg, M. S. Amino acid deprivation induces the transcription rate of the human asparagine synthetase gene through a timed program of expression and promoter binding of nutrient-responsive basic region/leucine zipper transcription factors as well as localized histone acetylation. *J. Biol. Chem.* 279, 50829–50839 (2004).
536. Manifava, M. *et al.* Dynamics of mTORC1 activation in response to amino acids. *eLife* 5, e19960 (2016).
537. Hara, K. *et al.* Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J. Biol. Chem.* 273, 14484–14494 (1998).
538. Wang, X., Campbell, L. E., Miller, C. M. & Proud, C. G. Amino acid availability regulates p70 S6 kinase and multiple translation factors. *Biochem. J.* 334 ( Pt 1), 261–267 (1998).
539. Pasquariello, R. *et al.* New Stable Cell Lines Derived from the Proximal and Distal Intestine of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Retain Several Properties Observed In Vivo. *Cells* 10, 1555 (2021).
540. To, V. P. T. H., Masagounder, K. & Loewen, M. E. SLC transporters ASCT2, B0AT1-like, y+LAT1, and LAT4-like associate with methionine electrogenic and radio-isotope flux kinetics in rainbow trout intestine. *Physiol. Rep.* 7, e14274 (2019).
541. Mastrototaro, L., Sponder, G., Saremi, B. & Aschenbach, J. R. Gastrointestinal methionine shuttle: Priority handling of precious goods. *IUBMB Life* 68, 924–934 (2016).
542. Pasquier, J. *et al.* Gene evolution and gene expression after whole genome duplication in fish: the PhyloFish database. *BMC Genomics* 17, 368 (2016).
543. Bröer, S. & Bröer, A. Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms. *Biochem. J.* 474, 1935–1963 (2017).
544. Petro-Sakuma, C., Celino-Brady, F. T., Breves, J. P. & Seale, A. P. Growth hormone regulates intestinal gene expression of nutrient transporters in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 292, 113464 (2020).
545. Sikalidis, A. K., Lee, J.-I. & Stipanuk, M. H. Gene Expression and Integrated Stress Response in HepG2/C3A cells Cultured in Amino Acid Deficient Medium. *Amino Acids* 41, 159–171 (2011).

546. Gjymishka, A., Su, N. & Kilberg, M. S. Transcriptional induction of the human asparagine synthetase gene during the unfolded protein response does not require the ATF6 and IRE1/XBP1 arms of the pathway. *Biochem. J.* 417, 695–703 (2009).
547. Fauconneau, B., Basseres, A. & Kaushik, S. J. Oxidation of phenylalanine and threonine in response to dietary arginine supply in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 101, 395–401 (1992).
548. Korte, J. J. *et al.* Expression of carbamoyl-phosphate synthetase III mRNA during the early stages of development and in muscle of adult rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Biol. Chem.* 272, 6270–6277 (1997).
549. Chiu, Y. N., Austic, R. E. & Rumsey, G. L. Urea Cycle Activity and Arginine Formation in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *J. Nutr.* 116, 1640–1650 (1986).
550. Smith, H. W. THE EXCRETION OF AMMONIA AND UREA BY THE GILLS OF FISH. *J. Biol. Chem.* 81, 727–742 (1929).
551. Cowey, C. B. & Walton, M. J. Studies on the uptake of (<sup>14</sup>C) amino acids derived from both dietary (<sup>14</sup>C) protein and dietary (<sup>14</sup>C) amino acids by rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* 33, 293–305 (1988).
552. Schuhmacher, A., Wax, C. & Gropp, J. M. Plasma amino acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed intact protein or a crystalline amino acid diet. *Aquaculture* 151, 15–28 (1997).
553. Tantikitti, C. & March, B. E. Dynamics of plasma free amino acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* under variety of dietary conditions. *Fish Physiol. Biochem.* 14, 179–194 (1995).
554. Brezas, A. & Hardy, R. W. Improved performance of a rainbow trout selected strain is associated with protein digestion rates and synchronization of amino acid absorption. *Sci. Rep.* 10, 4678 (2020).
555. Bröer, A., Wagner, C. A., Lang, F. & Bröer, S. The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/y+LAT2 mediates arginine efflux in exchange with glutamine. *Biochem. J.* 349 Pt 3, 787–795 (2000).
556. Dehler, C. E., Boudinot, P., Martin, S. A. M. & Collet, B. Development of an Efficient Genome Editing Method by CRISPR/Cas9 in a Fish Cell Line. *Mar. Biotechnol. N. Y.* N 18, 449–452 (2016).





**Abstract : Study of the metabolism of cationic amino acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): focus on cationic amino acid transporters**

The imperative of sustainable aquaculture leads to orient the feeding of farmed fish towards the substitution of fishmeal by renewable plant products. However, this replacement is often limited by low levels of certain cationic amino acids (CAAs), such as lysine (K) and arginine (R), in plant raw materials. Thus, supplementation with these CAAs in these new plant-based diets improves the growth of various fish species, without however reaching the results obtained with conventional feeds based on fish meal. In this context, and in order to improve our understanding of the mechanisms of the use of CAAs by fish, the work carried out during this thesis focused on the study of the regulation of CAA transporter (CAAT) expression. CAAT represent a gateway for CAA at cellular level, and we suspect that dysregulations of their expression, in trout fed on plant-based diets and supplemented with free CAA, can be, at least, in part, responsible of poorer growth performance observed under these nutritional conditions. To carry out this study, we chose an original approach in the field of fish nutrition, based on the use of rainbow trout cell lines. These have the advantage to test quickly, directly and with high reproducibility the effect of various biotic (nutrients, xenobiotics, etc.) or abiotic factors (temperature, oxidative stress, etc.) on a given cell function, by deleting the systemic effects of the factors studied and without the use and sacrifice of fish. The results obtained show firstly that the amino acid response pathways (the GCN2 pathway, the mTOR pathway and macroautophagy) are well conserved in the 3 cell lines studied, validating their use for the study undertaken and, more generally, for their use in fish nutrition studies. Regarding CAAT, the data obtained show the presence of 42 orthologous genes to human CAATs in the rainbow trout genome and the expression of 16 of them in the 3 cell lines studied. Some of these genes (including  $\gamma^+$ LAT2 and 4 homologous CAT2 transporters), are overexpressed during AA or CAA (K and/or R) deficiencies, suggesting that, as we suspect, a dietary imbalance in these AAs may disrupt the expression of CAAT in trout fed novel plant-based feeds. Although the accurate mechanisms underlying the effect of AA or CAA deficiency on the expression of the studied genes are not clearly elucidated in our cell models, our data point to an involvement of the GCN2 pathway. Finally, we show for the first time in a species of fish that a deficiency in R, and to a lesser extent in K, disrupts the activation of mTOR, establishing a close link between the dysregulations of the expression of some CAAT and that of a major pathway controlling cell growth. Surprisingly, the decrease in mTOR activation during R deficiency is not accompanied by a decrease in cell proliferation, suggesting the development of adaptation mechanisms to R deficiency that remain to be discovered. Overall, our data provide a base of knowledge essential to a better understanding of the mechanisms governing the use of CAAs by fish and validate the use of trout cell lines in the field of fish nutrition in order to define more finely the molecular mechanisms linked to physiological deregulation induced by plant foods.

**Key words : Amino acid transporters, Nutrition, Metabolism, mTOR, GCN2, Fish cell lines, Rainbow trout**

## **Résumé : Etude du métabolisme des acides aminés cationiques chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) : focus sur les transporteurs d'acides aminés cationiques**

L'impératif d'une aquaculture durable conduit à orienter l'alimentation des poissons d'élevage vers la substitution de la farine de poisson par des produits végétaux renouvelables. Toutefois, ce remplacement est souvent limité par des niveaux trop faibles en certains acides aminés cationiques (AAC), comme la lysine (K) et l'arginine (R), dans les matières premières végétales. Ainsi la supplémentation en ces AAC de ces nouveaux régimes à base végétale améliore la croissance de différentes espèces de poissons, sans pour autant atteindre les résultats obtenus avec les aliments classiques à base de farine de poissons. Dans ce contexte, et afin d'améliorer notre compréhension des mécanismes régissant l'utilisation des AAC par les poissons, les travaux réalisés au cours de cette thèse ont porté sur l'étude de la régulation de l'expression des transporteurs aux AAC (TAAC). Ceux-ci constituent de véritables « portes d'entrée » des AAC au niveau cellulaire, et nous suspectons que des dérégulations de leur expression, chez des truites nourries avec des régimes à base de végétaux et supplémentés en AAC libres, puisse être impliquées, du moins en partie, dans les moins bonnes performances de croissance observées dans ces conditions nutritionnelles. Pour mener à bien cette étude, nous avons choisi une approche originale dans le domaine de la nutrition des poissons, basée sur l'utilisation de lignées cellulaires de truite arc-en-ciel. Celles-ci, présentent l'avantage ne pouvoir tester rapidement, directement et de façon très reproductible l'effet de divers facteurs biotiques (nutriments, xénobiotiques, ...) ou abiotiques (température, stress oxydant, ...) sur une fonction cellulaire donnée, en s'affranchissant des effets systémiques des facteurs étudiés et sans avoir recours à l'utilisation et le sacrifice de poissons. Les résultats obtenus montrent premièrement que les principales voies de réponses aux acides aminés (la voie GCN2, la voie mTOR et la macroautophagie) sont bien conservées dans les 3 lignées cellulaires étudiées, validant ainsi leur utilisation pour l'étude entreprise et, plus généralement, pour les études en nutrition des poissons. Concernant les TAAC, les données obtenues montrent la présence de 42 gènes orthologues des TAAC humains dans le génome de la truite arc-en-ciel et l'expression de 16 d'entre eux dans les 3 lignées cellulaires étudiées. Certains de ces gènes (dont  $\gamma$ -LAT2 et 4 transporteurs homologues de CAT2), sont surexprimés lors de carences en AA ou en AAC (K et/ou R), suggérant que, comme nous le suspectons, un déséquilibre alimentaire en ces AA puisse perturber l'expression des TAAC chez des truites nourries avec de nouveaux aliments à base de végétaux. Bien que les mécanismes précis sous-jacent l'effet de la carence en AA ou en AAC sur l'expression des gènes étudiés ne soient pas clairement élucidés dans nos modèles cellulaires, nos données tendent vers une implication de la voie GCN2. Enfin, nous montrons pour la première fois chez une espèce de poisson qu'une carence en R, et dans une moindre mesure en K, perturbe l'activation de mTOR, établissant un lien étroit entre la dérégulation de l'expression de certains TAAC et celle d'une voie majeure de contrôle de la croissance cellulaire. Etrangement, la baisse d'activation de mTOR lors d'une carence en R ne s'accompagne pas d'une baisse de la prolifération cellulaire, suggérant la mise en place de mécanismes d'adaptation à la carence en R qui restent à découvrir. Dans l'ensemble, nos données apportent un socle de connaissances indispensables à une meilleure compréhension des mécanismes régissant l'utilisation des AAC par les poissons et valident l'utilisation des lignées cellulaires de truite dans le domaine de la nutrition des poissons afin de définir plus finement les mécanismes moléculaires liés aux dérégulation physiologiques induites par les aliments végétaux.

**Mots-clés : Transporteurs d'acides aminés, Nutrition, Métabolisme, mTOR, GCN2, Lignées cellulaires de poissons, Truite arc-en-ciel**