



HAL
open science

Effet de la composition en macronutriments de l'aliment sur les mécanismes de contrôle de l'autophagie chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)

Khadidja Ikram Belghit

► To cite this version:

Khadidja Ikram Belghit. Effet de la composition en macronutriments de l'aliment sur les mécanismes de contrôle de l'autophagie chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Biologie animale. Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2015. Français. NNT: . tel-02800037

HAL Id: tel-02800037

<https://hal.inrae.fr/tel-02800037>

Submitted on 5 Jun 2020

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

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

N° d'ordre :



THÈSE

Présentée à

L'UNIVERSITÉ DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR

ÉCOLE DOCTORALE 211-SCIENCES EXACTES ET LEURS APPLICATIONS

Par **Khadidja Ikram Belghit**

Pour obtenir le grade de

Docteur

SPÉCIALITÉ : **Sciences agronomiques, biotechnologies agro-alimentaires**

Effet de la composition en macronutriments de l'aliment sur les mécanismes de contrôle de l'autophagie chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)

Soutenue le : 29 Janvier 2015

Devant la commission d'examen formée de :

Mme Sophie TESSERAUD, Directrice de Recherches, INRA
Mr Alain BRUHAT, Directeur de Recherches, INRA

Rapporteurs

Mme Valérie BOLLIET, Professeur, Université de Pau
Mr Xavier ROLLIN, Professeur, Université Catholique de Louvain
Mr Stéphane PANSERAT, Directeur de Recherches, INRA
Mr Iban SEILIEZ, Chargé de Recherches, INRA

**Présidente
Examineurs**

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été financé par l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) et le projet européen Arraina. Il a été réalisé à l'INRA de Saint Pée-sur-Nivelle au sein de l'unité UR1067 Nutrition Métabolisme Aquaculture dirigée par Françoise Médale puis par Sandrine Skiba-Cassy que je remercie vivement pour leur accueil au sein du laboratoire.

Tout d'abord, je tiens à remercier Sophie Tesseraud et Alain Bruhat, rapporteurs de ce manuscrit, ainsi que Valérie Bolliet et Xavier Rollin qui ont accepté respectivement d'être président et examinateur de cette thèse.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Iban Seiliez, responsable scientifique de cette thèse, pour la qualité de son encadrement scientifique et le partage de ses connaissances. Je souhaite aussi le remercier pour sa grande disponibilité, ses conseils, son enthousiasme, sa grande gentillesse et son soutien au quotidien.

Je remercie également très sincèrement, Stéphane Panserat, directeur de ma thèse, pour sa contribution à mes travaux de doctorat. Je le remercie pour ses conseils, son dynamisme et son aide précieuse tout au long de ces années.

Mes travaux de thèse ont fait l'objet de trois articles et j'aimerais exprimer toute ma gratitude à tous ceux qui m'ont permis d'aboutir à ces résultats : Karine Dias, Anne Surget, Alexandre Herman, Vincent Véron et bien évidemment Iban Seiliez et Stéphane Panserat. Merci aussi à ceux qui, par leurs suggestions et commentaires lors de la relecture de mes manuscrits, m'ont permis d'en améliorer le contenu. Je pense notamment à Sachi Kaushik, Sandrine Skiba-Cassy et Inge Geurden.

Je tiens à remercier Frédéric Terrier, Franck Sandres, Fred Vallée et Patrick Maunas de la Pisciculture de Donzacq et Lées Athas, ainsi que Peyo Aguirre et Yvan Mercier d'avoir patiemment pris soin de mes précieuses petites truites. Je remercie également Pilou de s'être occupé de nombreuses fois de mon ordinateur si capricieux.

Je souhaite aussi remercier Pascale Avril, pour avoir accepté de corriger ce manuscrit.

Il m'est impossible de ne pas remercier ici *ma citronette préférée*, Karine Dias. Notre amitié a grandi tout au long de cette thèse et à ta façon, tu as toujours été là pour moi. Merci de ta présence et de ton amitié, je te souhaite le meilleur pour l'avenir !

Un grand merci à tous mes nouveaux amis que j'ai rencontré durant cette thèse et avec qui j'ai partagé d'agréables moments. Merci particulièrement à Alexandre Herman, qui était toujours présent pour moi. Merci également à Vivi, zozo, Tarouche, lulu, weiwei et anthony. Merci également à Fouad Sadok, qui m'a soutenu avant de commencer cette thèse.

Mes remerciements vont aussi à tous les membres de la station pour leur accueil chaleureux et notamment, Aurélie Inda, Elisabeth Azcarraga, Elisabeth Plagnes-Juan, Hélène Alami, Christine Burel, Lucie Marandel, Geneviève Corraze, Marie-Josée Elissalde, Maryse Pin, Laurence Larroquet, Didier Bazin, Marianne Cluzeaud, Vincent Véron, Stéphanie Fontagné, Marion Borey, Anne Surget et Maïté Jorajuria pour leur soutien et leur sympathie. Un grand merci aussi à tous les étudiants que j'ai pu rencontrer et en particulier à Imad, Taty-Taty, Laura, Mélanie, Carolina, Filipa et Jan.

Enfin, mes profonds remerciements vont vers mes proches, famille et amis. Je tiens à remercier de tout cœur mes parents et mes sœurs, surtout imenou, pour leur affection et leur soutien indéfectible. Je souhaite également remercier du fond du cœur Pedro qui m'a soutenu et encouragé continuellement tout au long de la réalisation de ce projet.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Liste des publications dans des journaux internationaux à comité de lecture

Ikram Belghit, Stéphane Panserat, Bastien Sadoul, Karine Dias, Sandrine Skiba-Cassy, Iban Seiliez (2013). Macronutrient composition of the diet affects the feeding-mediated down regulation of autophagy in muscle of rainbow trout (*O. mykiss*). PLOS ONE; 8 (9): p. e74308.

Ikram Belghit, Sandrine Skiba-Cassy, Inge Geurden, Karine Dias, Anne Surget, Sadasivam Kaushik, Stéphane Panserat, Iban Seiliez (2014). Dietary methionine availability affects the main factors involved in muscle protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Br J Nutr; 112 (4): p.493-503.

Article en cours d'écriture :

Ikram Belghit, Sandrine Skiba-Cassy, Karine Dias, Stéphane Panserat, Iban Seiliez. Looking at the limits of *in vivo* autophagic flux assays. Autophagy

Liste des communications dans des congrès nationaux et internationaux :

Communications orales :

Belghit I, Skiba-Cassy S, Geurden I, Dias K, Surget A, Kaushik S, Panserat S, Seiliez I. Dietary methionine level affects the main factors involved in muscle protein turnover in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*). Aquaculture Europe, Oct 14-17, 2014, San Sebastian, Spain.

Belghit I, Thesis assessment. PhD third year.

Journées de l'Ecole Doctorale sciences exactes et leurs applications, 5-6 June 2014, Pau, France.

Belghit I, Panserat S, Seiliez I. The nutritional regulation of autophagy in the muscle of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Séminaires des PhD et Post-docs, 17 December 2012, INRA-NuMeA, St Pée-sur-Nivelle, France.

Communications affichées :

Belghit I, Panserat S, Seiliez I. Role of amino acids in the regulation of autophagy in the muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journées de l'Ecole Doctorale sciences exactes et leurs applications, 4-5 July 2013, Pau, France.

Belghit I, Panserat S, Sadoul B, Dias K, Skiba-Cassy S, Seiliez I. Antagonist role of amino acids and glucose in the control of autophagy in muscle of rainbow trout (*O. mykiss*). 6ème Colloque Protéolyse Cellulaire de la SFBBM, 28-30 November 2012, Clermont-Ferrand, France.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
1-Définition et différents types d'autophagie.....	5
1-1-Définition de l'autophagie.....	5
1-2- Les différents types d'autophagie.....	7
1-2-1-La microautophagie.....	7
1-2-2-L'autophagie médiée par des protéines chaperones.....	7
1-2-3-La macroautophagie.....	9
1-3-Sélectivité de l'autophagie.....	10
1-3-1- La voie sélective du cytoplasme à la vacuole CVT.....	10
1-3-2-Mitophagie.....	11
1-3-3-Pexophagie.....	11
1-3-4-Ribophagie.....	12
1-3-5-Xénophagie.....	12
2-Les différentes étapes du processus autophagique.....	13
2-1-Induction de l'autophagie.....	13
2-2-Nucléation.....	15
2-3-Elongation de la membrane des vésicules autophagiques et séquestration des substrats à dégrader.....	15
2-3-1-Elongation.....	15
2-3-2- Séquestration des substrats à dégrader.....	19
2-4-Fermeture des vésicules et recyclage de la machinerie autophagique.....	19
2-5-Trafic des vésicules autophagiques et fusion avec les lysosomes.....	20
3-Mesure et quantification de l'autophagie.....	23
3-1-Méthodes de détection des autophagosomes.....	23
3-1-1-La microscopie électronique.....	23
3-1-2-Marqueurs biochimiques.....	23
3-2-Mesure du flux autophagique.....	25
3-2-1-Mesure du flux autophagique <i>in vitro</i>	25
3-2-2-Mesure du flux autophagique <i>in vivo</i>	26
4-Régulation de l'autophagie.....	27
4-1-Régulation à court terme.....	27
4-1-1-Le complexe mTORC1.....	27
4-1-2-Le senseur énergétique AMPK.....	31
4-1-3-Baseline 1.....	31
4-1-4-La voie de signalisation MAPKs.....	32
4-1-5-Glutamate déshydrogénase.....	32
4-1-6-Stress oxydatif.....	33
4-2-Régulation à long terme.....	33
4-2-1-FoxO (Forkhead box transcription factor class O).....	33
4-2-2-La voie GCN2 (eIF-2 α -ATF4/CHOP).....	36
4-2-3-TFEB.....	37
4-2-4-ZKSCAN3 (ZNF306).....	37
4-2-5-Autres facteurs de transcription.....	39

5-Les fonctions physiologiques de l'autophagie.....	39
5-1-Fonction de l'autophagie dans la régulation de la masse musculaire.....	39
5-2-Fonction de l'autophagie dans le métabolisme intermédiaire.....	41
5-2-1-Métabolisme glucidique.....	41
5-2-2-Métabolisme lipidique.....	42
6- Autophagie chez les espèces d'intérêt aquacole.....	44
6-1-Existence de l'autophagie chez les espèces d'intérêt aquacole.....	44
6-2-Autophagie et dégradation des protéines musculaires.....	45
6-3-Autophagie et stress cellulaire.....	45
6-4-Régulation du système autophagique-lysosomal.....	46
OBJECTIFS.....	49
RESULTATS.....	51
1-Effet du rapport protéines/glucides dans l'aliment sur les déterminants majeurs de l'autophagie dans le muscle de truite arc-en-ciel.....	57
2-Effet d'une carence ou d'un excès en méthionine dans l'aliment sur les déterminants majeurs de l'autophagie et du renouvellement des protéines musculaires dans le muscle de truite arc-en-ciel.....	63
3-Caractérisation des limites de la mesure du « flux autophagique » <i>in vivo</i>	69
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	97
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	113

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Evolution du nombre de publications scientifiques portant sur l'autophagie.....	5
Figure 2: Différents types d'autophagie	6
Figure 3: Biogénèse des autophagosomes.....	8
Figure 4: Les protéines impliquées dans l'étape d'initiation, de nucléation et d'élongation.....	14
Figure 5: Séquestration et dégradation des substrats lysosomaux.....	18
Figure 6: Détection de LC3 par microscopie à fluorescence.....	22
Figure 7: Détection de LC3-I, LC3-II et tubuline par western blot.....	22
Figure 8: Mesure du flux autophagique, en utilisant plusieurs drogues qui agissent à différents niveaux au cours du processus autophagique.....	24
Figure 9: Induction de l'autophagie par privation d'hormones, nutrition et d'énergie.....	28
Figure 10: Régulation de l'autophagie par Becline 1.....	30
Figure 11: FoxO régule l'induction de l'autophagie en favorisant l'expression de la glutamine synthétase.....	34
Figure 12: Interaction entre l'autophagie et le métabolisme protéique, glucidique et lipidique.....	40
Figure 13: Effet de la composition en macronutriments de l'aliment sur la formation de l'autophagosome (ratio LC3-II/ β -tubuline) dans le muscle de la truite.....	58
Figure 14 : Effet des acides aminés et/ou du glucose sur le rapport LC3-II/ β -actine dans les myoblastes de truites.....	58
Figure 15: Effet d'un déséquilibre en méthionine alimentaire sur le taux de LC3-II et l'expression de SQSTM1 dans le muscle de truite.....	64
Figure 16: Effet d'un déséquilibre en méthionine alimentaire sur l'expression des gènes du système ubiquitine protéasome (Fbx32et Trim32) dans le muscle de truite.....	64
Figure 17: Effet d'un déséquilibre en méthionine alimentaire sur le niveau de phosphorylation de S6 et eIF2 α dans le muscle de truite.....	64
Figure 18 : Evolution de la quantité de LC3-II dans le muscle de truites traitées avec différent inhibiteurs du flux autophagique	70
Figure 19 : Evolution de la quantité de LC3-II dans le foie de truites traitées avec différent inhibiteurs du flux autophagique.....	70

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Les protéines clés impliquées dans la machinerie de base de l'autophagie.....	16
Tableau 2: Contrôle transcriptionnel de l'autophagie.....	38

INTRODUCTION

Christian de Duve fut le premier à avoir attribué des propriétés d'"auto-cannibalisme" à la cellule, qu'il appela autophagie en 1963. Ce n'est pourtant qu'à partir des années 90 que la découverte des gènes Atg (Autophagy related genes) a relancé les recherches sur ce mécanisme et démontré son importance au niveau métabolique, physiologique et/ou physiopathologique. Cette fonction cellulaire est ainsi décrite comme une voie majeure du catabolisme lysosomal, conservée au cours de l'évolution, qui en réponse à des stress environnementaux (carence nutritionnelle, stress énergétique...) assure l'approvisionnement en nutriments et énergie et garantit ainsi l'homéostasie cellulaire.

La recherche sur l'autophagie connaît depuis une dizaine d'années une très forte accélération et on assiste à une explosion du nombre d'études portant sur les mécanismes fins de son activation. De nombreuses études *in vitro* ont ainsi décrit les mécanismes impliqués dans l'activation de l'autophagie en situation de carence totale en acides aminés ou en glucose. Paradoxalement, très peu de données sont aujourd'hui disponibles sur le rôle des nutriments et de leurs interactions *in vivo* en situation physiologique. L'objectif principal de cette thèse était donc d'étudier l'effet de la qualité nutritionnelle de l'aliment sur le contrôle de l'autophagie. En d'autres termes, il s'agissait de vérifier si la composition d'un aliment peut affecter la réponse de l'autophagie à l'alimentation et de déterminer les mécanismes impliqués.

Le modèle d'étude utilisé dans cette thèse était la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Outre son importance agronomique (la France est aujourd'hui le troisième producteur européen de truites élevées en eau douce), cette espèce carnivore présente des spécificités nutritionnelles qui en font un modèle original et pertinent pour l'étude de la régulation nutritionnelle du métabolisme dans son ensemble et de l'autophagie en particulier. En effet, elle présente des besoins relatifs élevés en protéines (40 à 55% de l'aliment contre moins de 20% pour les autres animaux d'élevage) et une faible capacité à utiliser le glucose alimentaire comme source d'énergie, deux caractéristiques au cœur de la régulation et de la fonction de l'autophagie.

Après une étude bibliographique détaillée du mécanisme autophagique et de sa régulation, les résultats de la thèse sont présentés sous forme de publications. Nous avons tout

d'abord étudié l'effet du rapport protéines/glucides dans l'aliment sur les déterminants majeurs de l'autophagie dans le muscle de truite. La deuxième partie de cette thèse a porté sur la fraction protéique de l'aliment et plus particulièrement sur l'effet d'une carence ou d'un excès en méthionine sur la régulation de l'autophagie et le renouvellement des protéines dans le muscle. Enfin, nous avons réalisé une troisième étude visant à déterminer les limites de la mesure du "flux autophagique" *in vivo*. Cette étude nous a ouvert un nouveau champ d'investigations sur les principales fonctions de l'autophagie au niveau du métabolisme hépatique. La dernière partie de ce manuscrit a été consacrée à discuter les principaux résultats obtenus et tirer des conclusions sur l'intérêt et/ou l'impact de ce travail.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1-Définition et différents types d'autophagie

1-1-Définition de l'autophagie

Le terme d'autophagie dérivé du grec '*autos*' (soi-même) et '*phagein*' (manger) signifie se manger soi-même. Cette voie catabolique a été mise en évidence pour la première fois en 1963 par Christian de Duve et ses collaborateurs (De Duve and Wattiaux, 1966). Après avoir stagné pendant quarante ans, l'intérêt pour cette voie de dégradation a augmenté de façon exponentielle au fur et à mesure de l'avancée des connaissances sur l'implication de l'autophagie dans les fonctions physiologiques et physiopathologiques (Figure 1).

L'autophagie est une fonction cellulaire très conservée au cours de l'évolution, de la levure à l'homme (Klionsky, 2005). Cette voie de dégradation englobe une série de processus par lesquels les cellules séquestrent des composés intracellulaires puis les dégradent dans le lysosome (ou vacuole chez la levure et les plantes), permettant ainsi la libération et la réutilisation de leurs propres produits de dégradation (Cuervo, 2004; Klionsky and Emr, 2000; Mizushima and Komatsu, 2011). Ce processus d'autodigestion peut être constitutif ou adaptatif. L'autophagie constitutive permet d'assurer la balance énergétique basale en éliminant des organelles sénescents ou endommagés. En revanche, l'autophagie adaptative est caractérisée par la mobilisation des réserves énergétiques intracellulaires en situation de stress ou de carences nutritionnelles (Komatsu et al., 2006; Komatsu et al., 2005).

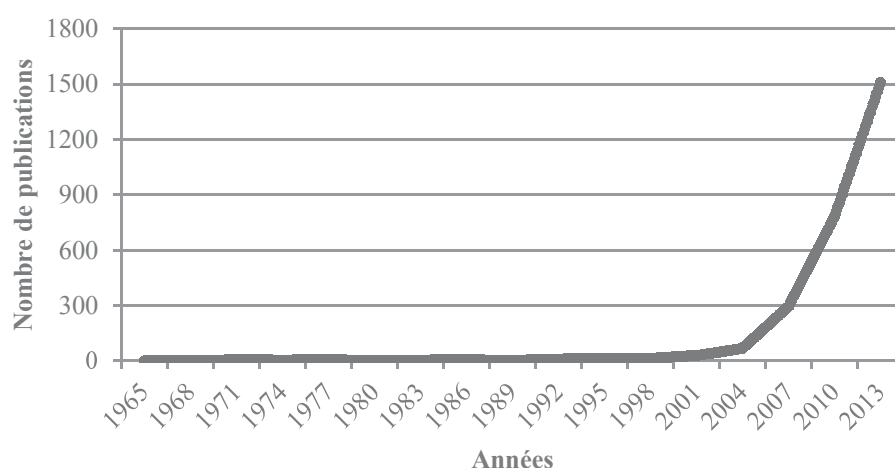


Figure 1 : Evolution du nombre de publications scientifiques portant sur l'autophagie.

Source : Pubmed, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

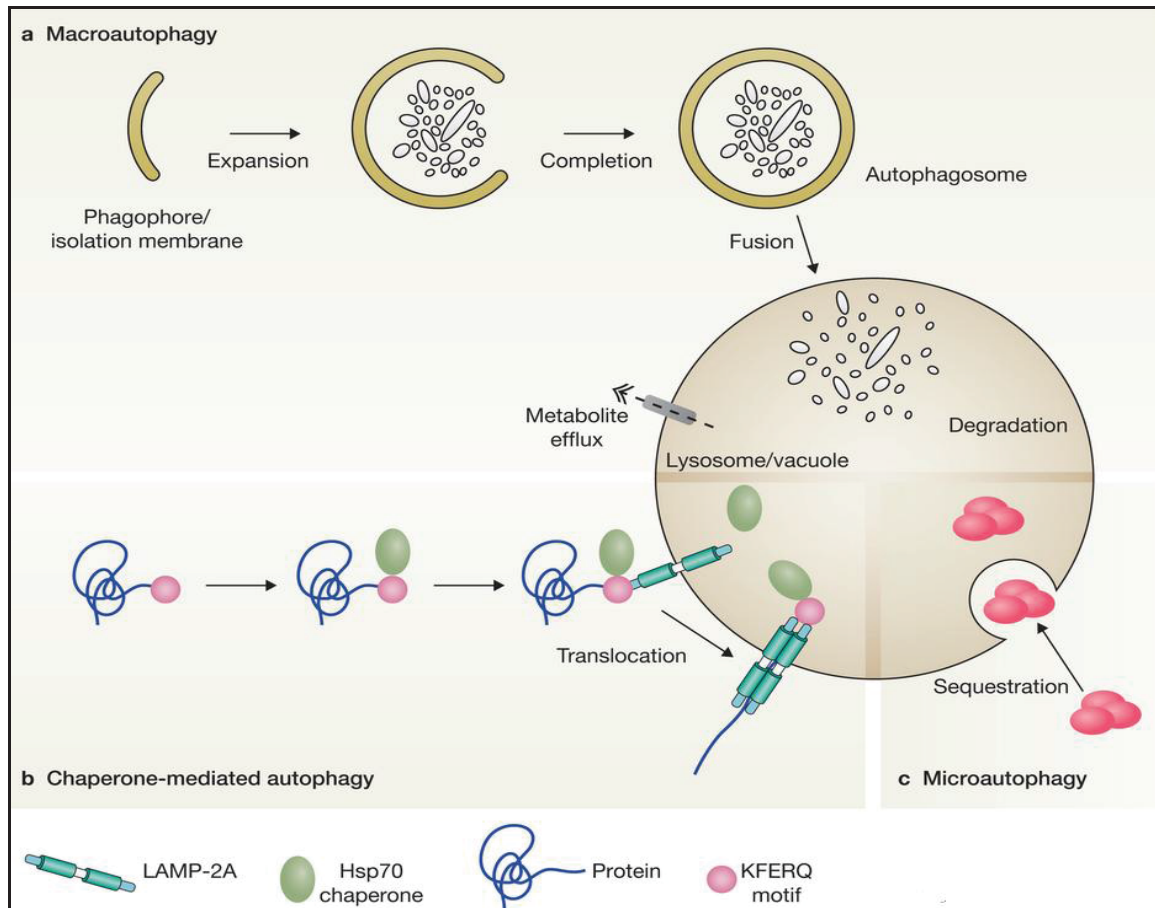


Figure 2: Différents types d'autophagie (d'après Boya et al., 2013).

(a) La macroautophagie, consiste en la séquestration d'une portion du cytoplasme dans une vésicule à double membrane appelée autophagosome. La fusion de ce dernier avec le lysosome permet de dégrader le matériel séquestré. (b) Durant l'autophagie médiée par les protéines chaperones, les protéines possédant la séquence KFERQ sont reconnues par la protéine chaperone Hsc70, qui s'associe alors à Lamp-2a et déclenche ainsi son oligomérisation. Le complexe ainsi formé est transloqué vers le lysosome afin de dégrader les protéines cytosoliques marquées. (c) Au cours de la microautophagie, des invaginations de la membrane lysosomale englobent une portion du cytoplasme entraînant sa dégradation.

1-2-Les différents types d'autophagie

Selon les différentes voies par lesquelles le matériel séquestré est délivré aux lysosomes (ou aux vacuoles), l'autophagie est divisée en trois principaux types : la microautophagie, l'autophagie médiée par des protéines chaperones et la macroautophagie (Figure 2).

1-2-1-La microautophagie

Au cours de ce processus, des portions du cytoplasme et des organites sont directement internalisés dans le lysosome par invagination ou déformation de la membrane lysosomale (Marzella et al., 1981). L'internalisation est rendue possible grâce la formation d'une vésicule bourgeonnant dans le lumen du compartiment lysosomal, menant ainsi à la dégradation des composés cytoplasmiques internalisés (Figure 2) (Li et al., 2012; Mijaljica et al., 2011).

La microautophagie est un processus de dégradation majoritairement non-sélectif. Cependant, il existe plusieurs formes de microautophagies sélectives qui vont dégrader spécifiquement certaines structures cellulaires, comme par exemple la "Picemeal Microautophagy of the nucleus" (PMN), qui intervient dans l'élimination de parties non-essentiels du noyau en cas de carence nutritive (Dawaliby and Mayer, 2010; Li et al., 2012).

La microautophagie est largement méconnue en termes d'importance physiologique et de machinerie moléculaire. Elle est étudiée essentiellement chez les levures. Il a ainsi été démontré que la microautophagie jouerait un rôle important dans la régulation de la taille des lysosomes (Todde et al., 2009), ainsi que dans le transport du glycogène dans le lysosome (Takikita et al., 2009). Ce processus assure également la survie cellulaire lors d'une privation en azote, en dégradant spécifiquement des mitochondries ou des peroxisomes (Li et al., 2012).

1-2-2-L'autophagie médiée par des protéines chaperones

L'autophagie médiée par les chaperones (Chaperone Mediated Autophagy, CMA), est un mécanisme protéolytique sélectif concernant environ 30% des protéines solubles cytosoliques. Contrairement à la macro- et à la micro-autophagie, la CMA dégrade le matériel cytoplasmique dans les lysosomes sans formation de vésicules intermédiaires (Cuervo, 2004). Les protéines cytosoliques possédant des séquences consensus Lys-Phe-Glu-Arg-Gln (KFERQ) vont être reconnues par une protéine de choc thermique de 70KDa

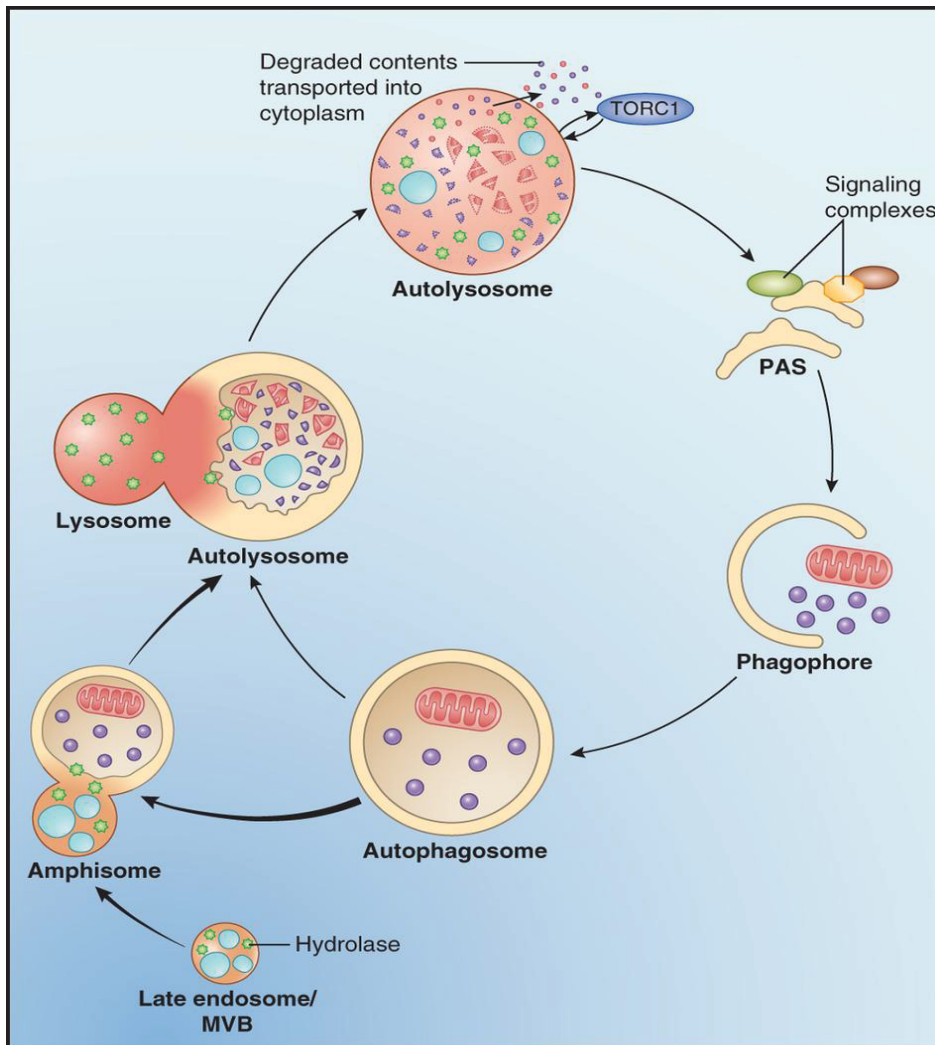


Figure 3: Biogénèse des autophagosomes (d'après Nixon, 2013).

La première étape de la macroautophagie nécessite le recrutement de plusieurs complexes protéiques au niveau du site spécifique d'initiation de l'autophagosome appelé site d'assemblage du phagophore (Pre-autophagosomal structure, PAS). Une partie du cytoplasme contenant les organelles et les protéines à dégrader est entourée d'une membrane, appelée phagophore. Le phagophore va ensuite croître et s'allonger puis se refermer sur lui-même, formant ainsi une vésicule nommée autophagosome. L'autophagosome fusionne principalement avec les compartiments de la voie endosomale, pour former un amphisome, puis avec le lysosome permettant la formation d'un autolysosome, qui va dégrader le matériel séquestré par les hydrolases lysosomales.

MVB, corps multivésiculaires.

(Hsc70) (Heat shock cognate protein of 70 KDa) (Cuervo and Wong, 2014). L'interaction entre Hsc70 et les protéines cytosoliques cibles est modulée par des protéines co-chaperonnes tels que Hsp 40 (Heat shock protein of 40 kDa), Hsp 90 (Heat shock protein of 90 kDa), Hip (Hsc 70-interacting protein), Hop (Hsc70-Hsp90 organizing protein) ou encore des protéines de la famille Bag1 (Bcl-2 associated athanogene 1 protein) (Agarraberes and Dice, 2001). Le complexe formé va ensuite être transloqué vers la membrane lysosomale et interagir avec une protéine associée à la membrane lysosomale, Lamp-2a (Lysosome-associated membrane protein 2) (Majeski and Fred Dice, 2004). Lamp-2a est un récepteur lysosomal qui contient des résidus chargés positivement permettant ainsi la fixation du complexe protéine-Hsc70. Après cette fixation, les protéines cytosoliques possédant la séquence peptidique KFERQ sont internalisées dans le lysosome pour être dégradées. Afin que les protéines cytosoliques puissent être transloquées dans le lysosome, Lamp-2a doit être multimérisée (Cuervo, 2004) (Figure 2).

L'activité basale de la CMA peut être détectée pratiquement dans tous les types cellulaires mais son activité est maximale lorsque la cellule est soumise à un stress tel qu'une privation prolongée de nutriments ou un stress oxydatif. Contrairement à la macroautophagie qui est rapidement induite suite à une privation de nutriments, la CMA est progressivement induite et son activité maximale peut persister jusqu'à trois jours chez les mammifères (Massey et al., 2006). Cette dégradation prolongée suggère que les protéines dégradées par cette voie ne sont pas nécessaires pour les cellules en situation de jeûne, et sont plutôt utilisées pour recycler des acides aminés afin de maintenir la synthèse protéique (Cuervo and Wong, 2014).

1-2-3-La macroautophagie

La macroautophagie constitue la forme majeure du catabolisme lysosomal. C'est un mécanisme extrêmement bien conservé chez tous les eucaryotes (Hughes and Rusten, 2007; Shintani and Klionsky, 2004). Durant la macroautophagie, une partie du cytoplasme contenant des organelles et protéines à dégrader est entourée d'une membrane unique appelée phagophore ou membrane d'isolation (structure pré-autophagosomale chez la levure, PAS) (Figure 3). Le phagophore va ensuite croître et s'allonger puis se refermer sur lui-même, formant ainsi une vésicule entourée par deux membranes, nommée autophagosome. Ce dernier utilise les dynéines pour se déplacer le long des microtubules vers le centre organisateur des microtubules (riche en lysosomes) puis fusionne avec le lysosome pour

former un autolysosome (Parzych and Klionsky, 2014; Ravikumar et al., 2009). En outre, avant de fusionner avec les lysosomes, les autophagosomes peuvent interagir avec les compartiments endosomaux (endosomes précoces, tardifs ou *corps multivésiculaires (MVB)*) pour former une organelle hybride appelée amphisome (Fader and Colombo, 2008). Cette structure représente un compartiment pré-lysosomal dans lequel les voies d'endocytose et autophagique convergent (Berg et al., 1998). L'amphisome s'avère nécessaire pour la fusion terminale avec les lysosomes puisque l'inactivation de protéines impliquées dans le fonctionnement de la voie endosomale n'aboutit pas à la maturation des autophagosomes (Fader and Colombo, 2008). Toutefois, l'autophagosome semble également pouvoir fusionner directement avec le lysosome sans formation d'amphisome (Fader and Colombo, 2008). La convergence des autophagosomes avec les compartiments endosomaux dépend du type cellulaire. Des analyses morphométriques ont ainsi révélé que les autophagosomes des cellules hépatiques sont 5 à 6 fois plus susceptibles de former un amphisome que de fusionner directement avec le lysosome (Liou et al., 1997).

1-3-Sélectivité de l'autophagie

A l'origine, l'autophagie a été décrite par Christian de Duve comme un mécanisme de dégradation non sélectif. Par la suite, avec la découverte de protéines Atg (autophagy related genes) requises pour la dégradation spécifique d'organites tels que les mitochondries et les peroxysomes, les termes de mitophagie, pexophagie sont apparus dans la littérature.

1-3-1-La voie sélective du cytoplasme à la vacuole CVT

Le CVT pathway signifie "Cytoplasm to Vacuole Targeting pathway". Cette forme d'autophagie n'a été décrite que chez la levure. Cette voie cible deux enzymes qu'elle véhicule spécifiquement à la vacuole : une aminopeptidase 1 appelée prApe1 et une alpha-mannosidase appelée Ams1 (Huang and Klionsky, 2002). Les précurseurs de ces enzymes forment des oligomères puis s'assemblent en complexes protéiques comprenant une protéine de la machinerie autophagosomale, Atg19 (Scott et al., 2001). Ces derniers sont alors séquestrés au niveau du PAS grâce au motif LIR-like WXXL d'Atg19 permettant de se fixer à la protéine Atg8 localisée à la membrane du PAS. Après allongement et fermeture de la double membrane, la vésicule appelée CVT est transportée vers la vacuole où sa membrane externe fusionne avec celle de la vacuole, libérant ainsi dans la lumière de la vacuole le corps protéique qu'elle contient. Aucun homologue de la protéine Atg19 n'a été identifié chez les

végétaux et chez les animaux, laissant supposer que cette voie est spécifique de la levure. Toutefois les études récentes montrent que tous les eucaryotes étudiés exploitent les motifs de type LIR pour sélectionner le contenu des vésicules autophagiques.

1-3-2-Mitophagie

La mitophagie correspond à la dégradation sélective de mitochondries endommagées par voie autophagique impliquant la macroautophagie ou la microautophagie (Jin et al., 2013). Ce processus permet le maintien d'une population mitochondriale fonctionnelle par l'élimination dirigée des mitochondries altérées (Kim et al., 2007). Des études ont montré qu'un défaut de la mitophagie est responsable d'une accumulation des mitochondries dysfonctionnelles avec production accrue d'espèces réactives de l'oxygène connues sous le nom de ROS (pour Reactive Oxygen Species) et augmentation du stress oxydatif (Kurihara et al., 2012; Zhang et al., 2007).

Les mitochondries endommagées sont généralement reconnues par la machinerie autophagique grâce à l'intervention d'une kinase mitochondriale, PINK1 (PTEN induced putative *kinase*), sensible au changement de potentiel transmembranaire (Narendra et al., 2010). Ainsi, PINK1 s'accumule à la surface des mitochondries à dégrader, et permet le recrutement de l'ubiquitine ligase de type E3 Parkin (Lazarou et al., 2013). Parmi les cibles de Parkin, on trouve VDAC (Voltage-dependent anion channels), une protéine majoritaire de la membrane mitochondriale externe. L'ubiquitination de VDAC par Parkin permet sa reconnaissance par la protéine p62 (également appelée SQSTM1), et donc la prise en charge des mitochondries concernées au niveau des autophagosomes grâce au motif de type LIR de p62 (Narendra et al., 2010).

1-3-3-Pexophagie

La pexophagie fait référence à la dégradation sélective de peroxysomes par la voie autophagique, impliquant soit la macroautophagie soit la microautophagie. Cette voie de dégradation est spécialement étudiée chez les levures. Elle fait intervenir une protéine de la machinerie autophagique, Atg30, qui joue le rôle de récepteur des peroxysomes. En situation de carence nutritionnelle, Atg30 est phosphorylée et interagit avec deux protéines adaptatrices (Atg11 et Atg17) présentes au niveau du PAS. Ces interactions permettent la formation de l'autophagosome autour du peroxysome ciblé, puis sa dégradation (Manjithaya et al., 2010).

La contribution de la machinerie autophagique dans la dégradation des peroxisomes a également été mise en évidence chez les mammifères. En effet, l'invalidation d'un gène essentiel à la macroautophagie (*Atg7*) chez la souris, entraîne une accumulation des peroxisomes dans le foie, indiquant que cette voie de dégradation est importante pour éliminer les peroxisomes en excès (Iwata et al., 2006).

1-3-4-Ribophagie

Les ribosomes sont des complexes nucléoprotéiques qui représentent à peu près la moitié des protéines totales dans les cellules jeunes où la synthèse protéique est très active. La dégradation des ribosomes en situation de carence nutritionnelle peut représenter une source non négligeable d'acides aminés. De plus, l'intégrité des ribosomes étant essentielle au bon fonctionnement de la machinerie traductionnelle et à la reprogrammation cellulaire face aux changements environnementaux, il est essentiel que leur renouvellement soit assuré et régulé. L'observation de ribosomes dans des autophagosomes en microscopie électronique, était attribuée à leur forte probabilité de présence dans des structures autophagosomales non sélectives, du fait de leur très grand nombre dans la cellule. En montrant que les ribosomes sont dégradés plus rapidement que les autres protéines cytosoliques, Kraft et ses collaborateurs suggérèrent que leur dégradation est sélective (Kraft et al., 2008). Cette voie de dégradation peut aussi baisser la traduction des ribosomes, afin d'économiser de l'énergie lorsque la cellule se retrouve en conditions de carence (Kraft et al., 2008).

1-3-5-Xénophagie

La xénophagie est une autre classe spécifique d'autophagie qui joue un rôle crucial en tant qu'acteur de l'immunité innée engagée dans la lutte contre des microorganismes pathogènes. En effet, des pathogènes infectieux sont efficacement dégradés, dans des cellules infectées, par un processus autophagique (Levine and Deretic, 2007). Néanmoins, certains pathogènes ont développé des subterfuges afin d'éviter leur destruction, en s'échappant des autophagosomes. D'autres encore, semblent bénéficier du microenvironnement des autophagosomes pour s'y répliquer. De plus, il a également été récemment démontré que l'autophagie peut servir de lien entre immunités innées et adaptatives : des fragments peptidiques dégradés par l'autophagie peuvent être présentés en surface des molécules du CMH-II et activer des lymphocytes T CD4 (Paludan et al., 2005).

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés particulièrement à la voie majoritaire, la macroautophagie. Par souci de simplification nous utiliserons le terme d'autophagie pour évoquer ce processus.

2-Les différentes étapes du processus autophagique

Le processus autophagique se divise en différentes phases successives qu'on peut morphologiquement et biochimiquement caractériser et qui sont ; l'initiation, la nucléation, l'élongation, la fusion et la terminaison.

La découverte des gènes Atg chez la levure, puis de leur homologue chez les mammifères a permis de mieux comprendre le processus complexe d'autophagie et son rôle dans des conditions physiologiques mais aussi physiopathologiques. A ce jour, 38 protéines associées à l'autophagie ont été identifiées chez la levure, et dont la majorité ont des orthologues chez les eucaryotes supérieurs (Ohsumi, 2014). Parmi ces protéines, 18 sont impliquées dans la machinerie de base. Ces protéines gouvernent les différentes étapes du processus de l'autophagie, incluant la formation des autophagosomes, la fusion avec les lysosomes et la dégradation du matériel séquestré (Tableau 1).

2-1-Induction de l'autophagie

L'initiation de l'autophagie nécessite la présence du complexe ULK composé d'ULK1, ULK2 (UNC-51-like Ser/Thr kinase), Atg13, FIP200 (FAK (Focal adhesion kinase) family Interacting Protein of 200 kD) et Atg101 (Akers et al., 2012) (Tableau 1 et Figure 4). Ce complexe est régulé par de nombreux facteurs dont le "nutrient-sensor" mTORC1 et l'"energy-sensor" AMPK que nous décrirons plus loin dans le manuscrit (section 4.1.1 et 4.1.2). En situation anabolique, le complexe ULK est lié à mTORC1 et reste inactif. En revanche, en situation de stress nutritionnel et/ou énergétique, mTORC1 est inactivé et se dissocie du complexe ULK, entraînant l'activation d'ULK1 qui va phosphoryler ses partenaires (Atg13 et Fip200) et permettre le recrutement au niveau du phagophore de diverses protéines ou complexes protéiques nécessaires à l'initiation de la formation de l'autophagosome (Hosokawa et al., 2009; Jung et al., 2009) (Figure 4).

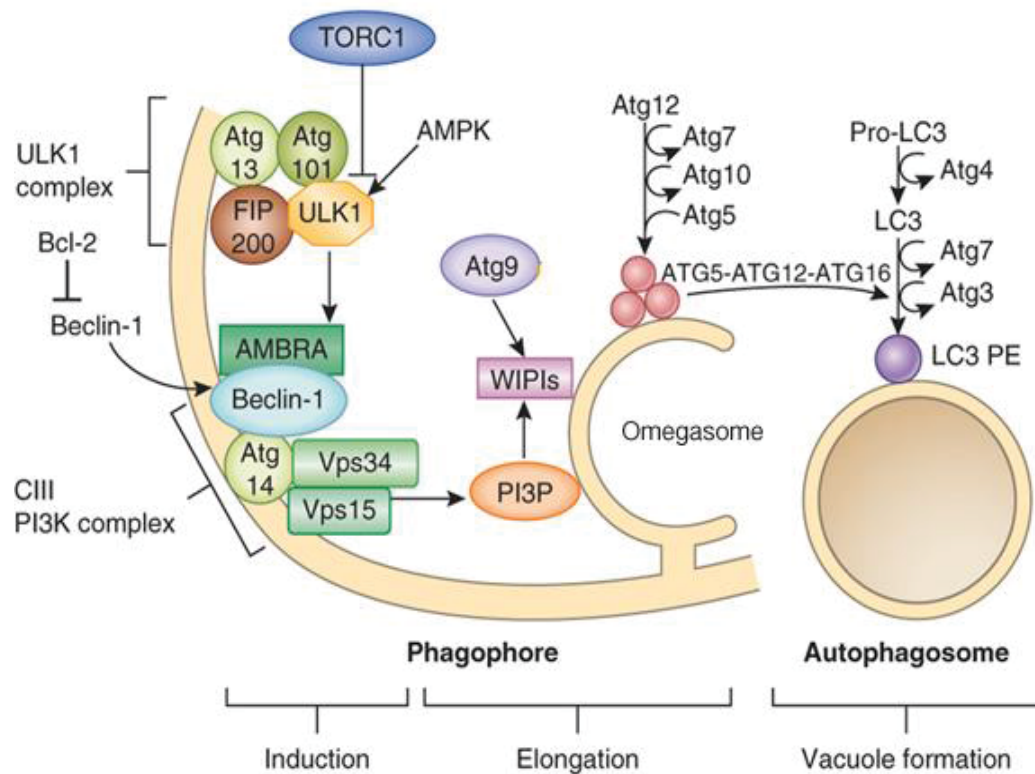


Figure 4: Les protéines impliquées dans l'étape d'initiation, de nucléation et d'élongation (d'après Nixon, 2013).

En situation catabolique, le complexe ULK est induit suite à l'inactivation de mTORC1 ou bien à l'activation de l'AMPK. Ce complexe va permettre d'augmenter l'activité du complexe PI3K III (composé de Beclin 1, Vps34, Vps15 et Atg14) via la phosphorylation d'AMBRA.

Cette induction va permettre la production de la Phosphatidylinositol 3 Phosphate (PI3P) au niveau du RE.

Ces événements conduisent à la nucléation de la membrane ainsi qu'au recrutement de protéines Atg et d'effecteurs spécifiques de la PI3P, telle que la protéine WIPI.

Après la nucléation, le complexe Atg5-atg12-Atg16L est formé grâce à Atg7 et Atg10 (deux enzymes de type E1 et E2, respectivement). Le complexe recruté au niveau de la membrane, agit comme une enzyme E3 ligase afin d'initier la lipidation de LC3. La protéine LC3 est clivée par la protéase Atg4 donnant la forme cytosolique de LC3 (LC3-I). LC3-I se conjugue à la phosphatidylethanolamine (PE) grâce à l'action d'Atg7, Atg3 (autre enzyme de type E2) et le complexe Atg5-Atg12-Atg16L pour aboutir à la forme LC3-PE (LC3-II).

2-2-Nucléation

Parmi les protéines recrutées au niveau du phagophore par le complexe ULK1, le complexe PI3K (PhosphoInositide-3-Kinase) de classe III a fait l'objet d'intenses investigations (Jaber et al., 2012; Tassa et al., 2003). Ce complexe est composé de la protéine Becline 1 (orthologue d'Atg6 chez les mammifères), Atg14 (appelée aussi Barkor), Vps34 (vacuolar protein sorting 34) et Vps15 (vacuolar protein sorting 15) (Tableau 1 et Figure 4). Les mécanismes impliqués dans le recrutement et l'activation de ce complexe par ULK1 restent encore controversés et mettent en jeu de nombreux facteurs (Russell et al., 2014). Toutefois, il est aujourd'hui admis que l'activation de ce complexe permet la production de Phosphatidylinositol 3 phosphate (PI3P) au niveau du phagophore et ainsi la formation d'un omégasome, une structure émergente du réticulum endoplasmique en forme d'oméga (Axe et al., 2008) (Figure 4). Ces événements conduisent au recrutement d'effecteurs spécifiques de PI3P, telles que les protéines DFCP1 (double FYVE-containing protein 1) et WIPI (WD repeat domain phosphoinositide-interacting), constituant ainsi une plateforme pour l'élongation de la membrane autophagosomale (Polson et al., 2010).

2-3-Elongation de la membrane des vésicules autophagiques et séquestration des substrats à dégrader

2-3-1-Elongation

Juste après la nucléation, le complexe Atg5-atg12-Atg16L est recruté au niveau de la membrane, où il agit comme une enzyme E3 ligase afin d'initier la lipudation d'un deuxième système de conjugaison, LC3 (Figure 4).

Atg12 est activée par la protéine Atg7 (enzyme de type E1), puis transférée sur Atg10 (enzyme de type E2) pour se lier finalement de façon covalente à Atg5. Le complexe de conjugaison Atg5-Atg12 s'associe à Atg16L, formant un complexe multimérique Atg12-Atg5-Atg16L qui s'associe à la membrane externe du phagophore (Fujita et al., 2008; Tanida et al., 2004). Atg12-Atg5-Atg16L, recrute alors le second complexe de conjugaison LC3 (Tanida et al., 2004).

La protéine pro-LC3, précurseur de LC3 est clivée sur le résidu glycine 120 en C-terminal par la protéase Atg4b donnant ainsi la forme cytosolique de LC3 (LC3-I). LC3-I se conjugue subséquemment à la phosphatidylethanolamine (PE) membranaire présent dans la membrane lipidique du phagophore (forme alors appelée LC3-II). Cette conjugaison nécessite l'activité d'Atg7 (E1), d'Atg3 (E2) et du complexe Atg5-Atg12-Atg16L (E3) (Fujita et al., 2008; Kabeya et al., 2004).

Tableau 1: Les protéines clés impliquées dans la machinerie de base de l'autophagie

Machinerie de base	Levures	Mammifères	Fonctions
Complexe Atg/ULK	Atg1	ULK1/2	Sérine/thréonine kinase, phosphorylation d'Atg13 et Atg17
	Atg13	Atg13	Module l'activité d'Atg1 et nécessaire pour l'initiation de l'autophagie
	Atg17	FIP200	Modifie l'activité d'Atg1 et nécessaire pour l'initiation de l'autophagie
	Atg29		Complexe ternaire avec Atg17 et Atg31
	Atg31		Complexe ternaire avec Atg17 et Atg29
	Atg11	Atg101	Protéine d'échafaudage pour l'organisation du PAS Composante du complexe avec Atg13 FIP200
PI3K	Vps34	Vps34	PI3K III
	Vps15	Vps15	Sérine/thréonine Kinase
	Vps30	Becline 1	Composante du complexe PI3K I et II
	Atg14	Atg14	Composante du complexe PI3K I
Système de conjugaison Ub1 Atg12	Atg12	Atg12	Protéine de type ubiquitine
	Atg7	Atg7	Enzyme de type E1
	Atg10	Atg10	Enzyme de type E2
	Atg16	Atg16L	Interagit avec Atg5 et Atg12
	Atg5	Atg5	Système de conjugaison avec Atg12
Système de conjugaison Ub1 Atg8	Atg8	LC3	Protéine de type ubiquitine
	Atg7	Atg7	Enzyme de type E1
	Atg3	Atg3	Enzyme de type E2
	Atg4	Atg4	Cystéine protéase, qui permet le clivage d'Atg8
Système Atg9	Atg2	Atg2	Interagit avec Atg18
	Atg9	Atg9A/B	Protéine transmembranaire
	Atg18	Wipi1/2	Protéine de liaison à la PIP3

Vps, vacuolar protein sorting.

PI3K, phosphoInositide-3-Kinase de classe I (PI3K I) ou III (PI3K III).

PIP3, phosphatidyInositide 3 phosphate.

En réalité, 8 orthologues de LC3 ont été décrits, classés en deux sous-familles : LC3 et GATE16/GABARAP. Les membres de ces deux sous-familles sont impliqués dans la biogenèse des autophagosomes mais leurs fonctions ne sont pas redondantes (Weidberg et al., 2010). L'inhibition spécifique de chaque membre par interférence à ARN a permis de montrer que la sous-famille LC3 est impliquée dans l'élongation de la membrane du PAS (autophagosomes de très petite taille) alors que GATE16/GABARAP interviendrait plutôt dans des stades plus tardifs du processus autophagiques (Weidberg et al., 2010).

Dans l'ensemble, les différents complexes protéiques décrits ci-dessus sont nécessaires pour l'élongation de la membrane mais leur rôle reste encore mal compris. Ils semblent jouer un rôle d'échafaudage pour la formation correcte des vésicules, notamment au niveau de leur taille et de leur courbure. La fourniture des vésicules et/ou des lipides à la membrane autophagosomale durant toutes les étapes d'élongation serait assurée par la protéine Atg9 (Orsi et al., 2012; Yamamoto et al., 2012). Cette dernière est la seule protéine Atg possédant des domaines transmembranaires qui lui permettent d'être enchâssée dans les membranes lipidiques. Une récente étude chez les levures a identifié Atg9 comme substrat d'ULK1. La phosphorylation directe d'Atg9 par ULK1 serait essentielle pour son interaction avec Atg18 (WIPI chez les mammifères) et son recrutement avec Atg8 (LC3-II chez les mammifères) au niveau de PAS. Cette étape semble nécessaire pour l'isolation et l'élongation de la membrane autophagosomale (Papinski et al., 2014).

Plusieurs hypothèses s'opposent au vu des récentes publications traitant l'origine de la membrane de l'autophagosome ainsi que l'identification du site de formation de l'autophagosome (Rubinsztein et al., 2012). Le RE est supposé être le candidat le plus probable permettant d'expliquer l'origine de l'autophagosome (Axe et al., 2008). Toutefois, la contribution du RE dans la formation des autophagosomes reste ambiguë. Des données contradictoires montrent que seulement 30% des autophagosomes sont associés au RE (Hayashi-Nishino et al., 2009). Les travaux de Rubinsztein suggèrent que la membrane plasmique participe également à la formation de l'autophagosome, et plus précisément à la formation des structures pré-autophagosomales (Ravikumar et al., 2010). Deux autres études montrent que les membranes autophagosomales proviennent de l'appareil de Golgi (Bodemann et al., 2011; Geng and Klionsky, 2010). Récemment, des études proposent l'implication des mitochondries dans la formation des autophagosomes lors de l'autophagie basale et induite dans les cellules de mammifères (Cook et al., 2014).

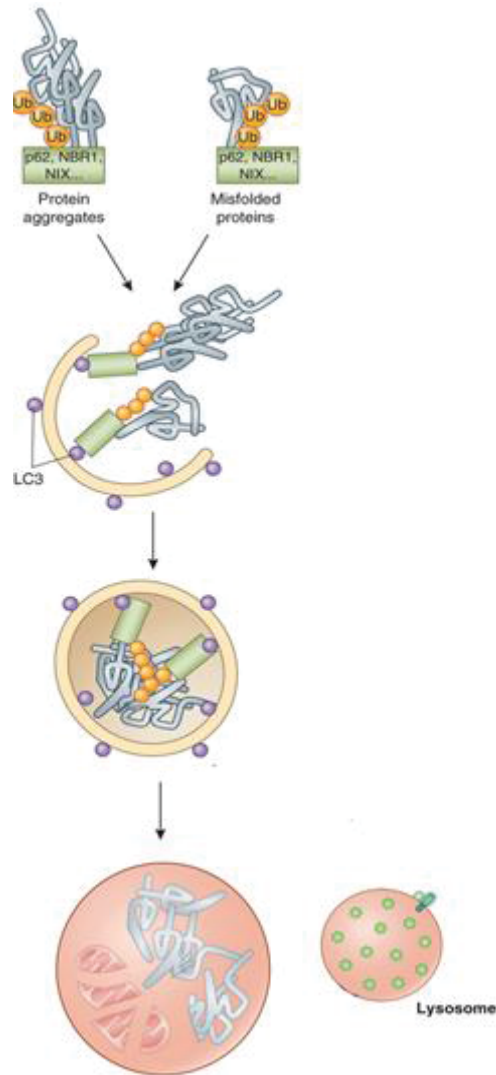


Figure 5: Séquestration et dégradation des substrats lysosomaux (d'après Nixon, 2013).

Les protéines et les organelles destinées à la dégradation vont être prises en charge par des récepteurs ou des adaptateurs spécifiques d'autophagie (p62, NBR1, NIX). Ces protéines possèdent des motifs peptidiques LIR (LC3-interacting region) permettant leur interaction avec LC3-II, mais aussi un domaine UBA (Ubiquitin-associated domain) qui permet leur liaison à des substrats altérés et ubiquitinylés. Une fois la formation des autophagosomes terminée, ceux-ci vont rejoindre les lysosomes avec lesquels ils vont fusionner pour former un autophagolysosome (autolysosomes), où les organelles et les protéines liées aux récepteurs d'autophagie sont digérées par les enzymes lysosomales

Enfin, la membrane des autophagosomes pourrait être également une mosaïque dérivée de plusieurs organelles. Ainsi, la membrane plasmique pourrait contribuer à la formation du phagophore, tandis que le RE, la mitochondrie et/ou l'appareil de Golgi pourraient intervenir dans l'étape d'élongation de l'autophagosome (Mari et al., 2011).

2-3-2-Séquestration des substrats à dégrader

Les protéines et les organelles destinées à la dégradation vont être prises en charge par des récepteurs ou des adaptateurs spécifiques d'autophagie incluant p62, NDP52, NBR1 et Alfy. Parmi ces protéines, p62 est la mieux caractérisée. Elle possède un domaine UBA (Ubiquitin-associated domain) qui permet sa liaison spécifique avec des substrats altérés et ubiquitylés aussi variés que les agrégats protéiques (Bjorkoy et al., 2005), les mitochondries (Geisler et al., 2010), les bactéries intracellulaires (Zheng et al., 2009) ou les peroxisomes (Kim and Klionsky, 2000) (Figure 5). Cette protéine possède également des motifs peptidiques LIR (LC3-interacting region) décrits précédemment (section 1.3.1), permettant d'interagir avec LC3-II qui est associé à membrane interne de l'autophagosome. La reconnaissance de LC3-II va permettre le recrutement de p62 (ainsi que des substrats associés) dans les autophagosomes (Ichimura et al., 2008).

2-4-Fermeture des vésicules et recyclage de la machinerie autophagique

Lorsque l'élongation de la membrane est suffisante, un mécanisme mal connu intervient afin de clore la vésicule. Chez les mammifères, ce sont les protéines de la sous-famille GATE16/GABARAP qui semblent impliquées dans la fermeture des vésicules autophagiques. En effet, leur inhibition par interférence à ARN conduit à une accumulation de vésicules autophagiques ouvertes (Weidberg et al., 2010). Noda et coll. émettent l'hypothèse que, chez les mammifères, la fermeture des autophagosomes serait conduite par l'homo-oligomérisation de ces protéines suivie de l'hémifusion des membranes, formant ainsi un autophagosome complet (Noda et al., 2009).

C'est également à cette étape que l'ensemble de la machinerie autophagique présentée ci-dessus (excepté Atg9 et LC3-II) est décroché de la membrane autophagique afin d'être recyclé dans le cytoplasme et ainsi servir à la formation d'un nouvel autophagosome (Xie and Klionsky, 2007). Pour la plupart des protéines, ces étapes de décrochage et de recyclage restent mal comprises pour le moment. Pour LC3-II, la fraction située sur la membrane

interne reste en place, alors que la fraction présente sur la membrane externe est clivée par la protéase Atg4b et recyclée.

2-5-Trafic des vésicules autophagiques et fusion avec les lysosomes

Le cytosquelette joue un rôle très important dans l'autophagie, notamment le réseau de microtubules qui permet le déplacement des vésicules autophagiques grâce aux moteurs moléculaires associés. Il a été montré que le mécanisme autophagique suit un mouvement centripète au sein des cellules de mammifères. Bien que le déplacement le long des microtubules se fasse de façon bidirectionnelle, les autophagosomes tendent à se diriger et à s'accumuler au niveau du centre organisateur des microtubules (MTOC pour MicroTubules Organizing Center), tout comme les lysosomes. Le mouvement centripète des autophagosomes le long des microtubules est dépendant de la protéine dynéine et est important pour la fusion avec les lysosomes (Jahreiss et al., 2008).

La dégradation du matériel présent au sein des autophagosomes est réalisée par les enzymes lysosomales. L'accomplissement d'un processus autophagique complet nécessite donc la fusion des autophagosomes avec des lysosomes. De nombreuses protéines sont impliquées dans ces mécanismes de fusion et sont pour la plupart conservées de la levure à l'Homme. Il a été montré que la fusion est réalisée grâce à de nombreuses protéines, comme Rubicon (RUN domain and cystein-rich domain containing, Beclin-1-interacting protein) et UVRAG (UV irradiation resistance-associated gene) qui jouent un rôle dans la maturation et le trafic endocyttaire des autophagosomes (Liang et al., 2006; Zhong et al., 2009). La fusion et la maturation des autophagosomes nécessitent aussi l'intervention de protéines impliquées dans d'autres types de transport vésiculaire comme certaines GTPases (Rab22, Rab24, Rab7), des protéines ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) (Rusten and Stenmark, 2009), et SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptor) (Gurkan et al., 2007).

Les protéines lysosomales sont, elles aussi, importantes pour la maturation des autophagosomes. Les protéines lysosomales membranaires, ou LMP (pour Lysosomal Membrane Protein), sont au nombre d'environ vingt-cinq chez les mammifères mais il existe de nombreuses protéines additionnelles. Ces LMP ont plusieurs rôles importants pour les lysosomes comme l'acidification des vésicules, la fusion membranaire, le transport des lysosomes ou encore l'import de protéines cytosoliques, endosomales ou autophagiques. Des mutations ou des déplétions de ces différentes protéines sont à l'origine de maladies

lysosomales. Pour certaines de ces maladies, un des phénotypes observés est une accumulation de vésicules autophagiques immatures qui pourrait être impliquée dans le développement de la pathologie (Saftig and Klumperman, 2009).

Outre les complexes protéiques impliqués dans la mécanistique de la fusion, cette dernière ne peut avoir lieu sans l'acidification des lysosomes. Elle est contrôlée par une pompe à protons appelée V-type H⁺ ATPase Complex. Cette pompe permet l'import de protons H⁺ au sein du lysosome, ce qui entraîne l'acidification de la vésicule et donc l'activation des hydrolases solubles lysosomales (Forgacs, 2007). Une mutation dans le gène vma21, qui code pour une sous-unité de l'ATPase, conduit à une myopathie avec autophagie excessive liée au chromosome X, dont la caractéristique principale est une accumulation de vésicules autophagiques immatures (Ramachandran et al., 2009). Ce phénotype cellulaire est également observé suite à l'utilisation de Bafilomycine A1 qui bloque l'acidification des lysosomes en inhibant la sous-unité V0 de l'ATPase.

Après la fusion de la membrane externe des autophagosomes avec la membrane lysosomale, les hydrolases acides dégradent la membrane interne des autolysosomes et le matériel séquestré, finalisant le processus autophagique.

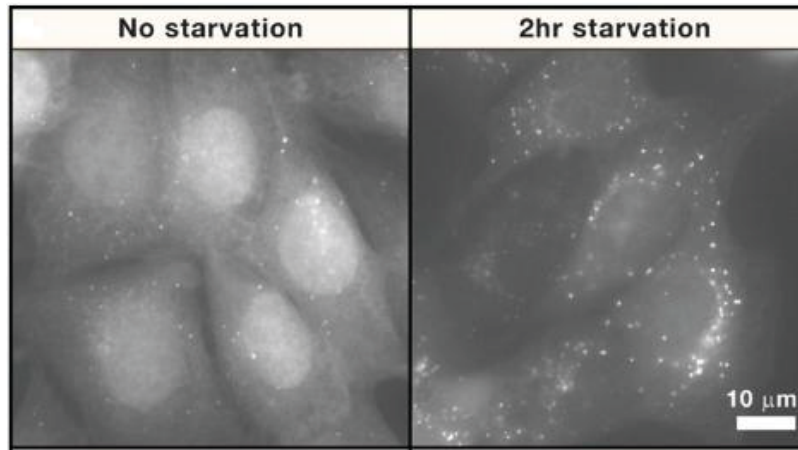


Figure 6: Détection de LC3 par microscopie à fluorescence (d'après Mizushima et al., 2010).

Les cellules NIH 3T3, exprimant de façon stable la protéine recombinée GFP-LC3, ont été incubées dans un milieu contrôle (à gauche), ou sans acides aminés et sans sérum (à droite).

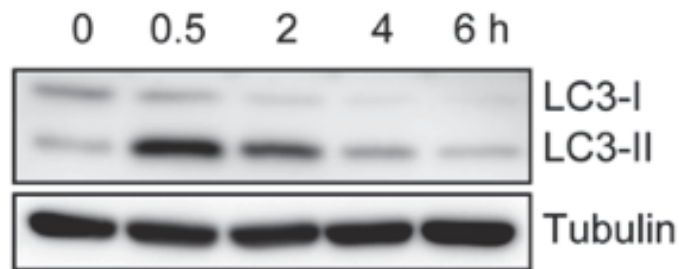


Figure 7: Détection de LC3-I, LC3-II et tubuline par western blot (d'après Mizushima et Yoshimori, 2010).

Des cellules MEF (mouse embryonic fibroblast) ont été incubées dans un milieu de culture sans acides aminés et sans sérum pendant 0.5, 2, 4 et 6h.

3-Mesure et quantification de l'autophagie

3-1-Méthodes de détection des autophagosomes

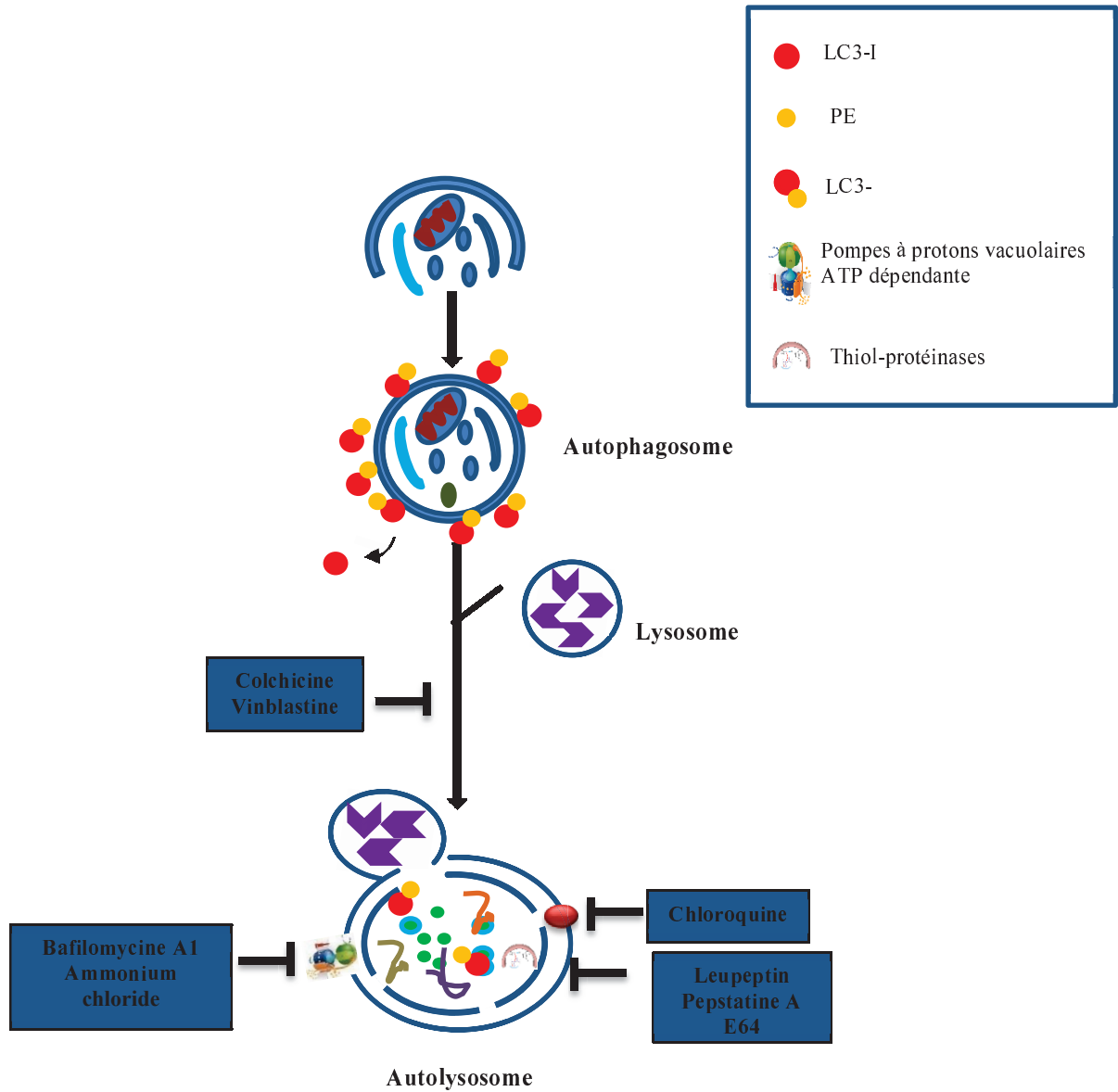
Différentes méthodes complémentaires ont été développées pour mesurer et quantifier les autophagosomes.

3-1-1-La microscopie électronique

La microscopie électronique est la méthode traditionnellement utilisée pour quantifier les différentes structures autophagiques (Yla-Anttila et al., 2009). Toutefois, cet outil requiert une grande expertise et son accès n'est pas possible en routine. Au fil du temps, la microscopie électronique a été remplacée par d'autres méthodes plus simples et accessibles, comme par exemple le microscope à fluorescence et/ou l'utilisation de marqueurs biochimiques.

3-1-2-Marqueurs biochimiques

Comme décrit précédemment (chapitre 2-3-1), la protéine LC3 existe sous deux formes, LC3-I (localisation cytosolique) et LC3-II (associée à la membrane interne et externe de l'autophagosome). En imagerie (immunofluorescence indirecte ou expression exogène d'une protéine LC3 couplée à une protéine fluorescente), LC3-II, apparaît sous forme de ponctuations définies, alors que la forme non-liée (LC3-I) présente une localisation cytoplasmique diffuse qui peut parfois suivre la répartition des microtubules (Mizushima et al., 2010) (Figure 6). Ce changement de distribution peut également être détecté par Western blot (Figure 7). En effet, la conjugaison de LC3 à la PE augmente la mobilité électrophorétique de LC3-II par rapport à LC3-I. En condition basale, LC3-I est plus abondante que LC3-II, et l'induction de l'autophagie provoque un changement dans cette distribution. Il a tout d'abord été recommandé de présenter les densités relatives des signaux LC3-I et LC3-II sous forme d'un rapport LC3-I/LC3-II (Mizushima and Yoshimori, 2007). Toutefois, en raison de la différence d'affinité des anticorps pour LC3-I comparé à LC3-II, ainsi que des variations tissulaires et cellulaires dans la distribution relative des deux formes de LC3 (Mizushima et al., 2004; Tanida et al., 2005), cette méthode s'est avérée peu précise. Ainsi, il a récemment été proposé de normaliser le niveau de LC3-II par rapport à une protéine de référence, α -actine ou β -tubuline (Klionsky et al., 2012).



Certains inhibiteurs comme la vinblastine ou la colchicine agissent indirectement en dépolymérisant les microtubules et empêchant ainsi la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes. D'autres drogues comme la bafilomycine A1 ou l'ammonium chlorure, agissent à une phase tardive de l'autophagie, en inhibant directement les pompes à protons vacuolaires ATP dépendante au niveau des lysosomes. La leupeptin, la pepstatine A et l'E64 (Cystein proteinase inhibitor), agissent différemment en inhibant les thiol-protéinases, et bloquant ainsi l'activité des hydrolases lysosomales. Enfin, la chloroquine, est un agent lysosomotropique qui s'accumule dans les compartiments acides, augmente le pH en neutralisant les protons et inhibe la fusion des autophagosomes avec les lysosomes

En plus de LC3-II, d'autres substrats autophagiques peuvent être utilisés pour mesurer le nombre d'autophagosomes cellulaires. Le niveau total de p62 dans la cellule est par exemple inversement proportionnel à l'activité autophagique dans de nombreux modèles d'étude. Bien que p62 semble être un bon candidat pour mesurer le nombre d'autophagosomes, ce marqueur présente plusieurs inconvénients. En effet, p62 est dégradé par l'autophagie mais aussi par le système ubiquitine protéasome, et son niveau peut augmenter lorsque le protéasome est inhibé (Bardag-Gorce et al., 2005). Ce substrat possède également des domaines qui interagissent avec plusieurs molécules de signalisation, impliquant p62 dans d'autres fonctions que l'autophagie (Moscato and Diaz-Meco, 2009). En outre, l'expression de *p62* est induite sous certaines conditions de stress (B'chir et al., 2013), rendant l'interprétation du niveau de la protéine correspondante difficile.

3-2-Mesure du flux autophagique

Une des principales limites à la mesure du taux de LC3-II comme marqueur de la formation des autophagosomes est que cette protéine est à la fois produite et dégradée au cours de l'autophagie ; on parle de "flux autophagique". En effet, l'augmentation du taux de LC3-II peut tout aussi bien représenter une induction de la formation des autophagosomes qu'une anomalie des étapes qui suivent leur formation (fusion avec le lysosome ou dégradation du contenu séquestré par les autophagosomes dont LC3-II). Une solution pour pallier à ce problème est de bloquer le flux autophagique par l'emploi d'agents pharmacologiques capables d'inhiber l'une des étapes en aval de la formation des autophagosomes. Dans ces conditions, une variation du taux de LC3-II ne peut être attribuée qu'à une variation de la formation des autophagosomes. Cette démarche appelée "mesure du flux autophagique" est aujourd'hui très répandue dans les études *in vitro* mais reste encore peu développée *in vivo* (Klionsky et al., 2012). Nous détaillerons ici les principales données sur le sujet.

3-2-1-Mesure du flux autophagique *in vitro*

L'utilisation d'inhibiteurs capables de bloquer la dégradation des autophagosomes par le lysosome chez les cellules de mammifères a été largement rapportée dans la littérature ces derniers temps (Klionsky et al., 2008; Mizushima et al., 2010; Xie et al., 2010). Ces drogues agissent à différents niveaux au cours du processus autophagique (Figure 8). Certains inhibiteurs comme la vinblastine, la colchicine ou le nocodazole agissent indirectement en dépolymérisant les microtubules et empêchant ainsi la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes (figure 8). D'autres drogues comme la bafilomycine A1 ou l'ammonium chloride,

agissent à une phase tardive de l'autophagie, en inhibant directement les pompes à protons vacuolaires ATP dépendantes au niveau des lysosomes. La leupeptin, la pepstatine A et l'E64 (Cystein proteinase inhibitor), agissent différemment en inhibant les thiol-protéinases telles que la cathepsine B, et bloquant ainsi l'activité des hydrolases lysosomales. Enfin, la chloroquine, est un agent lysosomotropique qui s'accumule dans les compartiments acides, augmente le pH en neutralisant les protons et inhibe ainsi la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Yoon et al., 2010).

Ainsi, quel que soit le mode d'action de ces drogues, le résultat est un arrêt de la dégradation du contenu séquestré par les autophagosomes dont fait partie LC3-II (Tanida et al., 2005). Dans ces conditions, un changement du niveau de LC3-II (observé par immunofluorescence ou par immunoblot), ne peut être attribué qu'à une variation de la formation des autophagosomes.

3-2-2-Mesure du flux autophagique *in vivo*

La mesure du flux autophagique *in vivo* n'est pas aussi développée qu'en cultures cellulaires (Klionsky et al., 2012). Le principal obstacle *in vivo* est la capacité des agents pharmacologiques à bloquer la dégradation des autophagosomes. Cependant quelques études ont montré la faisabilité d'utilisation des inhibiteurs d'autophagie *in vivo*. En ce sens, l'injection intra-péritonéale de colchicine ou de leupeptin augmente le niveau de LC3-II au niveau du muscle squelettique (Ju et al., 2010) et du foie (Haspel et al., 2011), chez la souris. La chloroquine est l'inhibiteur autophagique le plus communément utilisé. L'administration de cet agent chez la souris transgénique exprimant la protéine combinée LC3-mCherry, permet d'augmenter le nombre d'autophagosomes marqués avec cette protéine combinée (Iwai-Kanai et al., 2008). Bien que ces essais semblent très prometteurs, une limite importante à leur utilisation est le temps de traitement relativement long nécessaire au blocage du flux autophagique (Klionsky et al., 2012). En effet, tandis que dans les cellules en culture, un traitement avec la bafilomycine A1 pendant une courte période (2 à 4 h) permet de bloquer efficacement la fusion entre l'autophagosome et le lysosome, cela n'est pas faisable *in vivo* avec les drogues précédemment citées qui nécessitent un traitement de 12 à 24 h (Klionsky et al., 2012). Or, l'utilisation prolongée de ces agents pharmacologiques peut induire des effets non spécifiques qui pourraient en retour affecter directement ou indirectement le flux autophagique. Ainsi, il a été démontré qu'un traitement pendant une longue période avec la chloroquine entraîne des effets toxiques et inhibe la réponse

immunitaire (Paludan et al., 2005; Weber and Levitz, 2000). L'utilisation prolongée de la Bafilomycine A1 entraîne aussi des effets non spécifiques, en dégradant les substrats de la voie ubiquitine-protéasome (Korolchuk et al., 2009). Au-delà de cinq jours de traitement avec la colchicine, le niveau de LC3-I et LC3-II dans le muscle squelettique de souris augmente, suggérant que ces longs traitements permettent de bloquer le flux autophagique (le niveau de LC3-II augmente) mais entraînent aussi une induction de l'autophagie (le niveau de LC3-I augmente).

4-Régulation de l'autophagie

Chez les mammifères, l'autophagie est régulée principalement par deux mécanismes. Le premier, est une régulation rapide transcription indépendante (appelé régulation à court terme). La seconde voie de régulation est un mécanisme plus long, nécessitant l'expression des gènes (nommée régulation à long terme).

4-1-Régulation à court terme

Dans les cellules de mammifères, les voies de signalisation contrôlant l'activité de l'autophagie sont nombreuses et souvent interconnectées. Elles ont souvent un lien direct ou indirect avec la disponibilité des nutriments, de l'énergie, des facteurs de croissance, ou une période de stress.

4-1-1-Le complexe mTORC1

L'une des voies majeures de contrôle de l'autophagie fait intervenir la protéine kinase mTOR (mammalian Target Of Rapamycin ou mechanistic Target Of Rapamycin). La kinase mTOR existe sous deux complexes multiprotéiques distincts nommés mTORC1 et mTORC2, qui diffèrent par leurs composants protéiques, leur régulation, leurs fonctions et leur sensibilité à la rapamycine (Sengupta et al., 2010). Le complexe mTORC1, qui est impliqué dans le contrôle de l'autophagie, est composé de la protéine mTOR, Raptor (Regulatory-associated protein of mTOR), mLST8 (mammalian Lethal with Sec 13 protein 8), Pras 40 (Proline-rich Akt substrate 40 KDa) et Deptor (DEP-domain-containing mTOR-interacting protein).

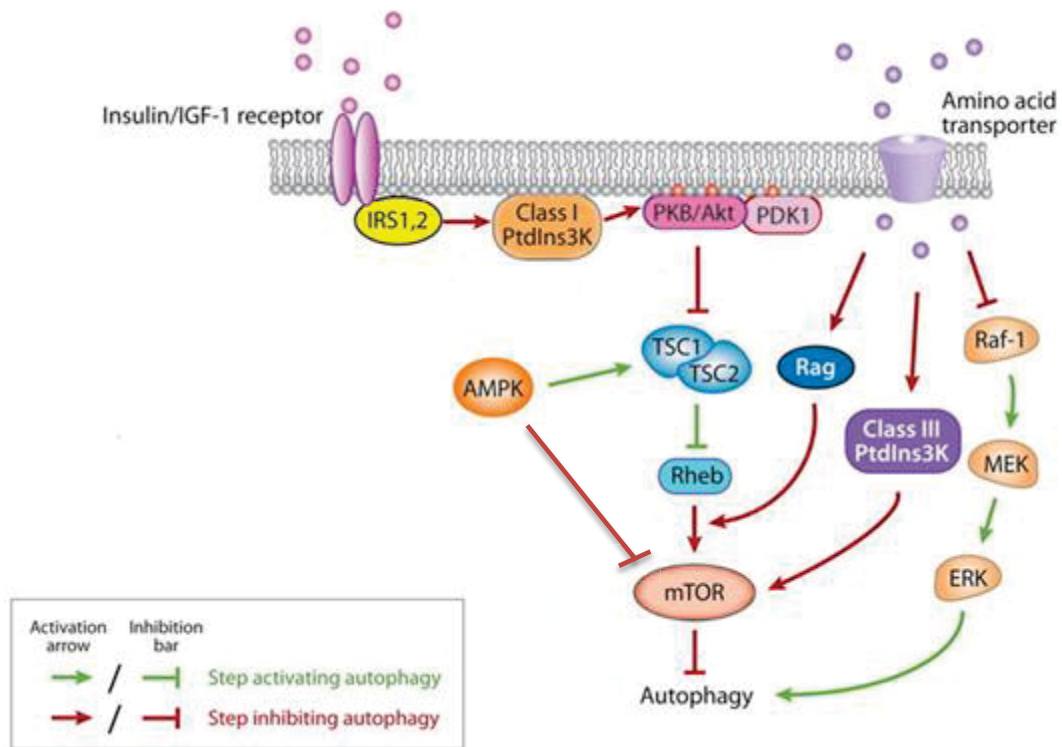


Figure 9: Induction de l'autophagie par privation d'hormones, de nutriments et d'énergie (d'après He et Klionsky., 2009b).

En présence des acides aminés et d'IGF et/ou d'insuline, la protéine kinase mTOR est activée, menant à une inhibition du déclenchement de l'autophagie. Flèche verte, les étapes d'activation de l'autophagie. Flèche rouge, étapes d'inhibition de l'autophagie

La régulation du complexe mTORC1 a fait l'objet d'intenses recherches et est aujourd'hui bien caractérisée (Laplante and Sabatini, 2012). Brièvement, l'activation du récepteur de l'insuline induit une cascade de signalisation impliquant la PI3K de classe I, la protéine Akt, le complexe TSC1/TSC2 et le facteur Rheb et aboutit à l'activation de mTORC1 (Figure 9).

Il est aujourd'hui bien établi que les acides aminés jouent également un rôle crucial dans la régulation du complexe mTORC1 (Jewell et al., 2013). Chez les mammifères, en réponse à la présence d'acides aminés, les protéines Rag GTPases (Ras-related GTPase) induisent l'activation de mTORC1. Ces protéines se retrouvent à la surface lysosomale, où elles interagissent avec un complexe appelé Ragulator (constitués de MP1, p14 et p18) qui sert de protéine d'ancrage pour le complexe Rag GTPase actif. Ce dernier active le complexe mTORC1 en assurant sa translocation à la surface du lysosome, où se trouve son coactivateur Rheb.

En présence de facteurs de croissance ou d'acides aminés, mTORC1 inhibe l'autophagie par interaction directe avec le complexe d'initiation ULK1 décrit précédemment. mTORC1 phosphoryle ULK1 sur la sérine 757. Cette phosphorylation semble être importante pour l'inhibition de l'autophagie par le complexe mTORC1 (Kim et al., 2011). En conditions de privation nutritionnelle ou suite à un traitement à la rapamycine, le complexe mTORC1 se dissocie du complexe ULK1, permettant son activation. Une fois activé, cette kinase va subir une autophosphorylation (sur le résidu T180) puis va phosphoryler par la suite ses partenaires de liaison Atg13 et FIP200, permettant ainsi l'initiation de l'autophagie.

ULK1 est un régulateur négatif du complexe mTORC1 via la phosphorylation de son partenaire raptor. Ce mécanisme représenterait une boucle de rétroaction positive importante lors des premières étapes d'autophagie, alors que les acides aminés sécrétés par les autolysosomes permettront de réactiver mTORC1 lors des dernières étapes de l'autophagie (Russell et al., 2014).

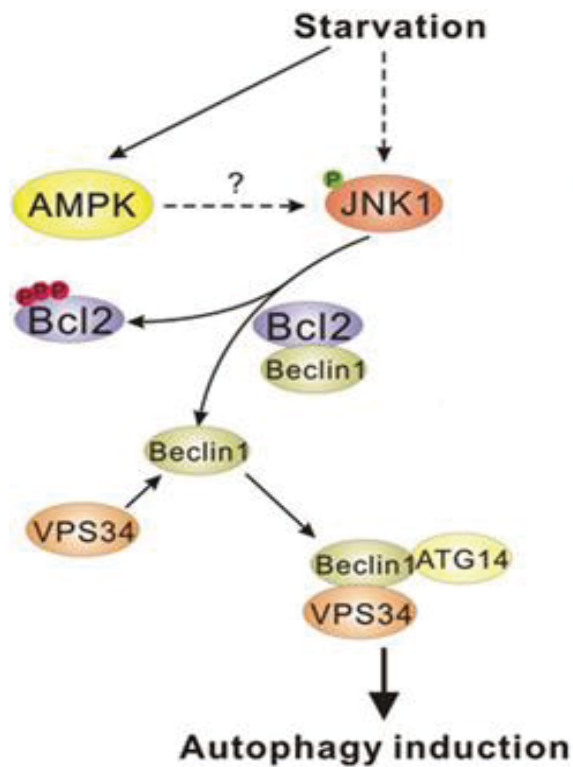


Figure 10: Régulation de l'autophagie par Becline 1 (d'après Russel et al., 2014).

La privation nutritionnelle induit l'activité kinase JNK (possibilité d'une phosphorylation directe par l'AMPK). JNK1 phosphoryle trois acides aminés au niveau N-terminal de la protéine Bcl2. Bcl2 perd alors son affinité pour Becline 1 et la libère, permettant ainsi de former le complexe d'initiation de l'autophagie Becline1-Vps34-Vps15.

4-1-2-Le senseur énergétique AMPK

Dans les cellules de mammifères, une réduction du niveau de l'énergie cellulaire (ATP) est directement détectée par l'AMPK (5'-AMP (Adénosine monophosphate)-activated protein Kinase). L'AMPK est une sérine/thréonine kinase constituée de trois sous-unités : une sous-unité catalytique α et deux sous-unités régulatrices β et γ . Lors des situations de carence en glucose ou de stress, les rapports [AMP]/[ATP] ou [ADP]/[ATP] augmentent, entraînant la phosphorylation (thréonine 172) de la sous-unité α de l'AMPK (Hawley et al., 1995; Hong et al., 2003; Momcilovic et al., 2006). Une fois activée, l'AMPK phosphoryle TSC2 et active le complexe TSC1/TSC2. Ce complexe actif stimule l'échange du GTP lié à Rheb par du GDP, inhibe le complexe mTORC1 et stimule ainsi l'autophagie. Alternativement, l'AMPK est capable de phosphoryler directement la sous-unité raptor du complexe mTORC1, induisant la liaison de ce complexe avec les protéines de la famille 14-3-3, et conduisant à inhiber l'activation de mTOR (Gwinn et al., 2008). Ainsi, par ces deux mécanismes l'AMPK est capable d'activer l'autophagie via l'inhibition du complexe mTORC1 (Figure 9).

Indépendamment du complexe mTORC1, l'AMPK est aussi capable de phosphoryler et activer les kinases ULKs (Egan et al., 2011; Kim et al., 2011). Chez la souris, la privation en glucose induit la phosphorylation d'ULK1 sur les résidus ser317 et ser777 par l'AMPK, permettant ainsi l'induction de l'autophagie (Kim et al., 2011). Par ailleurs, l'interaction entre ULK1 et l'AMPK est empêchée par la phosphorylation d'ULK1 (sur la ser 757) médiée par le complexe mTORC1. Ceci montre la régulation étroite de l'activité d'ULK1 en réponse aux niveaux des nutriments et d'énergie (Russell et al., 2014).

L'AMPK augmente également l'activité kinase de VPS34 dans les complexes contenant Atg14. Dans une récente étude il a été démontré que la privation de glucose dans les cellules de mammifères induit l'activation de la protéine Atg14 contenant le complexe VPS34 via la phosphorylation de Becline 1 (Kim et al., 2013).

4-1-3-Becline 1

La protéine Becline-1 appartient à (au moins) deux complexes régulateurs de l'autophagie : un activateur (avec la PI3K III, Vps34, Vps15 décrit précédemment dans le chapitre 2-2) et un inhibiteur (avec Bcl2). Cette interaction entre Bcl2 et Becline 1 au niveau du RE inhibe l'autophagie en séquestrant la protéine Becline 1 et interrompant la formation du complexe indispensable pour l'initiation de l'autophagie Becline1-Vps34-Vps15. L'activation de l'autophagie passe donc par la rupture des interactions entre Becline 1 et Bcl2. Cette interaction peut être interrompue par différents signaux permettant l'induction de

l'autophagie. La carence nutritive induit l'activation de la kinase JNK1 (c-Jun N-terminal kinase). Cette dernière phosphoryle trois acides aminés au niveau N-terminal de la protéine Bcl2 afin de libérer Becline-1 et donc d'induire l'autophagie grâce à la formation du complexe PI3K de classe III (Pattingre et al., 2005) (Figure 10).

Dans les cellules de mammifères, une récente étude a démontré que la kinase Akt est capable d'inhiber l'autophagie de façon indépendante du complexe mTORC1. En effet, Becline 1 est phosphorylée directement par Akt sur la Ser295 (Wang et al., 2012). Cette phosphorylation permet l'interaction de Becline 1 avec les protéines 14-3-3 mais également avec les protéines du filament intermédiaire (vimentine). Suite à cette liaison, Becline 1 est séquestré par la vimentine, et inhibe ainsi l'autophagie (Wang et al., 2012; Wei et al., 2013).

4-1-4-La voie de signalisation MAPKs

Les MAPKs (pour Mitogen Activated Protein Kinase) sont des sérine thréonine kinases activées par leur phosphorylation au niveau de résidus thréonine et tyrosine. Ces protéines transmettent le signal par une suite d'interaction entre protéines. De nombreux stimuli activent les cascades des MAPK parmi lesquels les hormones, les facteurs de croissance et les acides aminés. Les MAPK comptent cinq groupes, deux d'entre eux ont été impliqués dans la régulation de l'autophagie : la voie de signalisation ERK1 et ERK2 (Extracellular signal-Regulated protein Kinase) et la voie impliquant les protéines p38MAPK (Colecchia et al., 2012; Webber and Tooze, 2010) (Figure 9). Toutefois, le rôle de la voie des p38MAPK dans la régulation de l'autophagie reste encore très controversé. En effet, selon le type de stimulus, cette kinase peut être considérée comme un inducteur ou un inhibiteur d'autophagie (Doyle et al., 2011; Matsuzawa et al., 2012).

4-1-5-Glutamate déshydrogénase

La glutamine est l'acide aminé le plus abondant dans le sang. Elle est métabolisée dans la mitochondrie par deux réactions de désamination. Elle est d'abord désaminée par la glutaminase (GLS) afin de produire du glutamate. Celle-ci est ensuite désaminée par la glutamate déshydrogénase (GDH) pour produire du α -Ketoglutarate (α KG). En plus de son rôle dans le catabolisme des acides aminés, la GDH est impliquée dans la signalisation des acides aminés et le contrôle de l'autophagie (Meijer and Codogno, 2008). En effet, la GDH est capable de contrôler le taux de radicaux libres (ROS) dans la cellule, et donc l'activation de l'autophagie, en générant un puissant antioxydant (le NADP), lors de la déshydrogénation

du glutamate en α KG (Albracht et al., 2011). De plus, la GDH contrôle l'autophagie en activant mTORC1 via l'induction des protéines Rag et Rheb par la libération respective de GTP et l'ATP lors de la métabolisation de l' α KG au cours du cycle de Krebs (Duran et al., 2012).

4-1-6-Stress oxydatif

Le métabolisme respiratoire de la mitochondrie dans la cellule entraîne la production de ROS. Ces derniers participent à différents processus intracellulaires et notamment à l'induction de l'autophagie qui, à son tour, permet la réduction des dommages oxydatifs (Scherz-Shouval and Elazar, 2007). Il a été rapporté que la protéase à cystéine Atg4 sert de lien entre les ROS et l'autophagie. En effet, les ROS ciblent le résidu Cys81 conservée au niveau de la protéine Atg4, qui se trouve aux alentours de la sous-unité catalytique. L'oxydation de cette cystéine inhibe l'activité de la protéase Atg4 et favorise la lipidation de LC3, une étape essentielle à l'induction de l'autophagie (Scherz-Shouval and Elazar, 2007).

Dans cette partie, nous avons cité les principaux régulateurs (à court terme) de l'autophagie, mais il existe encore d'autres facteurs comme la céramide, le calcium et l'hypoxie, qui jouent un rôle important dans la régulation de l'autophagie.

4-2-Régulation à long terme

L'autophagie peut être également régulée par un mécanisme plus long, nécessitant l'expression des gènes. Ce type de régulation est induit généralement pendant des périodes de jeûne prolongé, en assurant la formation d'autophagosomes de façon continue.

4-2-1-FoxO (Forkhead box transcription factor class O)

C'est le premier facteur de transcription identifié comme étant nécessaire et suffisant pour induire l'autophagie (Juhász et al., 2007). Il existe chez les mammifères quatre membres de la famille des facteurs de transcription FoxO. Ils sont exprimés de façon ubiquitaire mais avec des niveaux variables selon les tissus. L'expression de FoxO1 est élevée au niveau du cerveau, de la rate, des tissus adipeux et du cœur. FoxO3 est principalement exprimé dans le muscle (Mammucari et al., 2007; Masiero et al., 2009), le cœur, la rate et les ovaires, tandis que FoxO4 présente une forte expression au niveau du cerveau, de la rate, du cœur et des poumons. L'expression de FoxO6 est restreinte au système nerveux, au thymus et aux reins (Naimi and Van Obberghen, 2008).

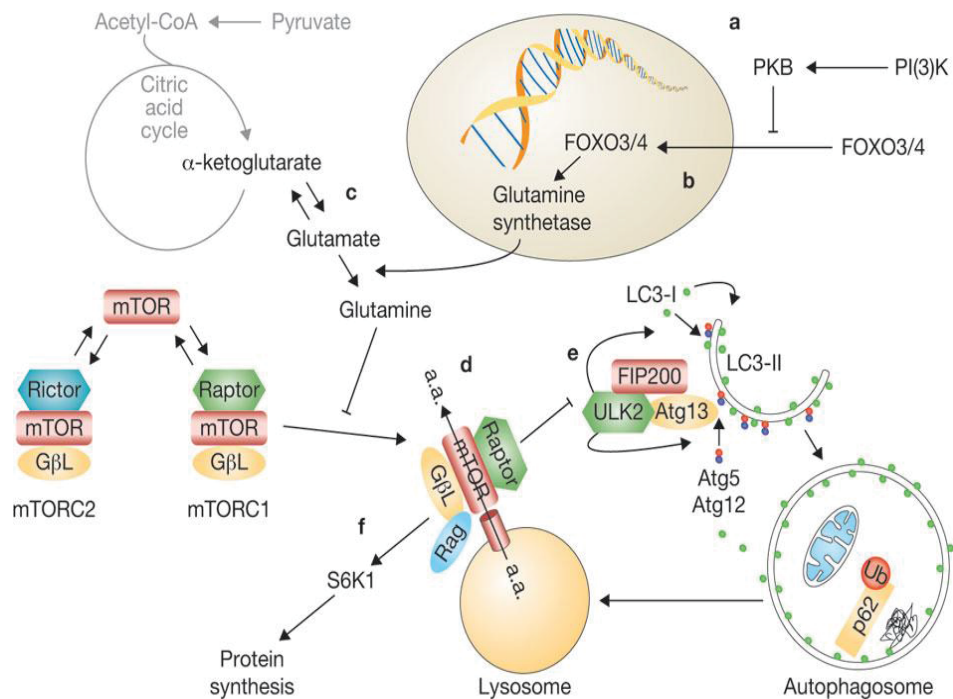


Figure 11: FoxO régule l'induction de l'autophagie en favorisant l'expression de la glutamine synthétase (d'après Sandri, 2012).

(a) : En présence de facteurs de croissance, la voie PI3K-Akt séquestre les facteurs de transcription FoxO1, FoxO3 et FoxO4 dans le cytoplasme. (b) : En absence de facteurs de croissance, Akt est inactive et FoxO est transloqué au noyau pour la transcription de nombreux gènes cibles. (c) : FoxO3 activé induit l'expression de la glutamine synthétase qui augmente le niveau de la glutamine, inhibant ainsi la translocation du complexe mTORC1 au niveau du lysosome. (d) : Le recrutement de mTORC1 au niveau du lysosome est médié par les Rag-GTPase. L'activation de mTORC1 (e) inhibe l'autophagie en bloquant la formation du complexe ULK1/ULK2 et (f) favorise la synthèse protéique via la kinase S6K1.

Ces facteurs de transcriptions sont caractérisés par un domaine de liaison à l'ADN nommée Forkhead. Les FoxOs sont bien conservés et jouent un rôle crucial dans différents processus cellulaires, incluant l'apoptose, le cycle cellulaire, le métabolisme du glucose, la réponse aux antioxydants et l'autophagie.

En réponse aux facteurs de croissance et à l'insuline, la protéine kinase Akt activée, reconnaît et phosphoryle les protéines FoxO (par l'intermédiaire des résidus Sérine et Thréonine au niveau des motifs consensus RxRxxS), conduisant à leur séquestration dans le cytoplasme et ainsi à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle. A l'inverse, l'inactivation de la kinase Akt, déphosphoryle les protéines FoxO, favorisant leur translocation dans le noyau où elles agissent comme activateur de transcription.

Plusieurs études ont mis en évidence l'importance de FoxO3 dans la régulation de l'autophagie en induisant l'expression de nombreux gènes de la protéolyse lysosomale, incluant LC3b, Bnip3, Bnip3l, Atg12l, Atg4b, Ulk2, Gabarapl1, Vps34 et Becline1 (Schiaffino and Mammucari, 2011; Sengupta et al., 2009; Warr et al., 2013; Zhao et al., 2007).

En outre, l'équipe de Van Der Vos, a mis en évidence un autre lien très original entre l'activité de FoxO et l'induction de l'autophagie (Van der Vos and Coffey, 2012; Van der Vos et al., 2012a; Van der Vos et al., 2012b). L'analyse par puce à ADN (microarray) dans différentes lignées cellulaires a permis d'identifier la glutamine synthétase (qui catalyse la réaction opposée à celle de la GLS décrite précédemment et produit de la glutamine à partir du glutamate) comme une cible de la voie de signalisation PI3K-Akt-FoxO. La translocation du facteur de transcription FoxO dans le noyau, lors de la privation des facteurs de croissance, va permettre d'induire l'expression de la glutamine synthétase. Cette dernière va ainsi augmenter le niveau de la glutamine dans la cellule et empêcher la translocation du complexe mTORC1 au niveau du lysosome, induisant ainsi l'autophagie (Van der Vos and Coffey, 2012; Van der Vos et al., 2012a) (Figure 11).

4-2-2-La voie GCN2 (eIF-2 α -ATF4/CHOP)

La phosphorylation de la sous unité α sur la sérine 51 du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α (eucaryotic translation initiation factor 2 α) est régulée en réponse à différents stimuli comme par exemple le stress du RE, l'hypoxie ou la privation d'acides aminés. Chez les mammifères, il existe quatre kinases connues pour induire la phosphorylation d'eIF2 α (Harding et al., 2000). Parmi-celles-ci, la kinase GCN2 (general control nonderepressible 2), a fait l'objet d'une attention particulière. Elle possède un domaine homologue à l'histidyl-tRNA synthétase lui permettant de se lier aux ARN de transfert non chargés, dont la concentration augmente à l'intérieur de la cellule lors d'une carence en acides aminés (Dong et al., 2000). De cette liaison résulte un changement de conformation permissif conduisant à l'autoactivation de GCN2. Une fois activée, GCN2 va phosphoryler la sérine 51 d'eIF2 α , seul substrat connu de cette kinase. Cette phosphorylation a pour conséquence d'inhiber la formation du complexe d'initiation de la traduction et par conséquent la synthèse protéique, et, paradoxalement, d'augmenter la traduction d'ARN messagers spécifiques comme par exemple le facteur de transcription ATF4.

ATF4 fait partie de la famille des facteurs de transcription ATF (Activating Transcription Factor) et possède un domaine basique leucine-zipper lui conférant la capacité de se lier sur des gènes cibles spécifiques contenant la séquence CARE (C/EBP-ATF Response Element) (Averous et al., 2004). Le principal rôle d'ATF4 est d'induire l'expression des gènes nommés IRS (Integrate Stress Response), impliqués dans le métabolisme des acides aminés, la résistance au stress oxydatif, l'angiogenèse et la résistance aux drogues (Rzymiski et al., 2009). Il a été démontré par cette même équipe chez une lignée de cellules tumorales mammaires (MCF-7) que le stress du RE et d'hypoxie induisent l'expression des gènes de l'autophagie, notamment *LC3b* via l'activation d'ATF4. Plus récemment, B'chir et al, ont mis en évidence dans des fibroblastes embryonnaires murins (MEF), l'implication de la voie eIF2 α /ATF4 dans la régulation de l'expression de différents gènes de l'autophagie lors d'une carence en acides aminés (B'chir et al., 2013). Cette même équipe démontrera par la suite que le facteur de transcription CHOP (C/EBP Homologous Protein), cible de ATF4, exerce un rôle important dans cet effet qui dépend du temps de carence en acides aminés (B'chir et al., 2014). A court terme (6h de carence), CHOP contribuerait à la résistance au stress nutritionnel en permettant de maintenir l'activité autophagique via l'induction de l'expression des gènes de l'autophagie. Par contre, à long terme (16-48h), lorsque la réponse au stress n'est plus suffisante pour maintenir la survie, CHOP inhiberait l'expression des gènes de l'autophagie et induirait l'expression des gènes apoptotiques. CHOP jouerait par conséquent

un double rôle au carrefour entre l'autophagie et l'apoptose afin de déterminer le destin des cellules en réponse à une privation en acides aminés.

4-2-3-TFEB

Récemment, l'implication du facteur de transcription TFEB (transcription factor EB) dans la régulation de l'autophagie a été mise en évidence. Ce facteur de transcription favorise la transcription de plusieurs gènes lysosomaux par liaison directe avec les sites E-box (CANNTG) au niveau de leur promoteur. Ce réseau de gènes est nommé CLEAR (Coordinated Lysosomal Expression and Regulation) (Palmieri et al., 2011). TFEB est retenu au niveau du cytosol via sa phosphorylation par ERK2. En revanche, en condition de privation d'acides aminés ou lorsque la fonction lysosomale est altérée, la baisse de sa phosphorylation par ERK2 permet sa translocation dans le noyau, et l'activation du programme transcriptionnel qui va générer des nouveaux lysosomes et augmenter le flux autophagique (Sardiello et al., 2009; Settembre and Ballabio, 2011). Cette équipe a démontré que ce facteur favorise la transcription de plusieurs gènes du lysosome mais aussi de l'autophagie en se liant directement au niveau de leur promoteur (Settembre and Ballabio, 2011). Un an après, la même équipe a montré que la translocation nucléaire de TFEB est également régulée par le complexe mTORC1. Selon le modèle proposé, une fraction de TFEB se lie à la surface lysosomale, où il est phosphorylé par mTORC1 et maintenu ainsi au niveau du cytoplasme. La privation en nutriments, inhibe les v-ATPases, et le stress lysosomal inactive les Rag-GTPases, empêchant la translocation de mTORC1 au niveau du lysosome et la phosphorylation de TFEB par mTORC1. Ainsi, TFEB s'accumule progressivement dans le noyau, où il active le programme d'expression des gènes du système autophagie-lysosomal (Settembre et al., 2012).

4-2-4-ZKSCAN3 (ZNF306)

Ce facteur semble avoir un rôle important dans différents processus cellulaires tels que, la prolifération cellulaire, l'apoptose et la maintenance du nucléole (Urrutia, 2003). Ce facteur semble être un homologue de TFEB (Chauhan et al., 2013). Contrairement à TFEB, ZKSCAN3 agit comme un répresseur transcriptionnel d'une large variété de gènes autophagiques. L'inactivation du gène ZKSCAN3 induit l'autophagie et augmente la biogénèse des lysosomes. Ainsi ZKSCAN3 et TFEB régulent la biogénèse des lysosomes et l'autophagie de façon opposée (Chauhan et al., 2013; Fullgrabe et al., 2014).

Tableau 2: Contrôle transcriptionnel de l'autophagie

Facteur de transcription	Inducteurs	Gènes cibles	Effet sur l'autophagie
ATF5	Stress oncogénique	mTOR	Inhibe l'autophagie
C/EBP β	Stimulus nutritionnel, signalisation des cytokines, rythme circadien	Bnip3, LC3 et ULK1	Augmente l'autophagie
CHOP	Stress du RE, hypoxie, infection virale	Atg5 et LC3	Augmente l'autophagie
EGR 1	Facteur de croissance, stress oxydatif	LC3	Augmente l'autophagie
GATA1	Signalisation des cytokines	LC3	Augmente l'autophagie
HIF1	Hypoxie	Bnip3	Augmente l'autophagie
Jun	Signalisation des cytokines, stress du RE, facteur de croissance	Becline 1 et LC3	Augmente l'autophagie
NF- κ B	Signalisation des cytokines, chimiothérapie, hypoxie, stress du RE	Bcl2, Becline 1, Bnip3 et p62	Augmente l'autophagie ou supprime l'autophagie
P53	Stress oxydatif et oncogénique, hypoxie	Atg2, Atg4, Atg7, Atg10, Bcl2, ULK1 et Uvrag	Cytosol : inhibe l'autophagie Noyau : augmente l'autophagie
P63	Stress génotoxique, chimiothérapie	Atg3, Atg4, Atg5, Atg7, Atg9, Atg10, Becline1, LC3 et ULK1	Augmente l'autophagie
P73	Stress génotoxique, chimiothérapie	Atg5, Atg7 et Uvrag	Augmente l'autophagie
Sox2	Signalisation des cytokines	Atg10	Augmente l'autophagie
SREBP2	Privation nutritionnelle	LC3, Atg4b et Atg4D	Augmente l'autophagie
STAT1	Signalisation des cytokines	Atg12 et Becline1	Inhibe l'autophagie
STAT3	Signalisation des cytokines, stress RE, hypoxie, stress oxydatif et oncogénique	Atg3, Bcl2 et Bnip3	Inhibe l'autophagie

ATF, activating transcription factor; C/EBP β , CCAAT/enhancer-binding protine- β ; CHOP, C/EBP-homologous protein ; HIF1, Hypoxia-inductible factor1 ; LC3, light chain 3 ; NF- κ B, nuclear factor κ B; Sox2, SRY box-containing factor 2; STAT, signal trasducer and activator of transcription; ULK, UNC-51-like kinase; Uvrag, ultraviolet irradiation resistance-associated gene.

4-2-5-Autres facteurs de transcription

L'identification des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'autophagie est en nette progression ces dernières années. Ils ont fait l'objet d'une revue de synthèse en 2013 (Pietrocola et al., 2013), et sont rapportés dans le tableau 2.

5-Les fonctions physiologiques de l'autophagie

5-1-Fonction de l'autophagie dans la régulation de la masse musculaire

La masse musculaire dépend de la balance dynamique entre la protéosynthèse et la protéolyse. Les protéines tissulaires sont en permanence synthétisées et dégradées et ce sont les intensités respectives de la protéosynthèse et de la protéolyse qui déterminent le bilan protéique. Il y a gain si la protéosynthèse est supérieure à la protéolyse et fonte dans le cas contraire. Chez les mammifères, la protéolyse est principalement assurée par deux voies : le système ubiquitine protéasome et le système autophagie-lysosomal (Sandri, 2010). Le système ubiquitine protéasome est considéré depuis longtemps comme le système majeure responsable de la dégradation des protéines durant l'atrophie musculaire (Lecker et al., 2004; Lecker et al., 1999). Cependant, ce rôle prédominant a été remis en question par des études montrant une forte induction de l'expression des gènes de la voie autophagique-lysosomal dans différents modèles d'atrophie musculaire (Bodine et al., 2001; Bonaldo and Sandri, 2013; Cao et al., 2005; Kee et al., 2003; Sandri, 2008).

Afin de préciser le rôle de l'autophagie dans le maintien de la masse musculaire, Masiero et al ont réalisé des expérimentations sur des souris dépourvues d'un gène essentiel (*Atg7*) au niveau du muscle squelettique (Masiero et al., 2009; Raben et al., 2008). Les souris KO *Atg7* présentent une désorganisation des sarcomères et un stress lié à l'accumulation de protéines anormales (Masiero et al., 2009). Cette étude montre que l'inhibition de l'autophagie ne protège pas de l'atrophie du muscle squelettique induite par la dénervation et le jeûne, mais au contraire, contribue largement à sa dégénérescence. Toutefois, une sur-activation de l'autophagie, altère également l'homéostasie des fibres musculaires, en éliminant excessivement les composants cellulaires nécessaires pour une activité normale, et conduit à une atrophie musculaire (Bonaldo and Sandri, 2013). Ainsi, ces études illustrent l'importance d'une régulation fine de l'autophagie dans le maintien de l'homéostasie musculaire.

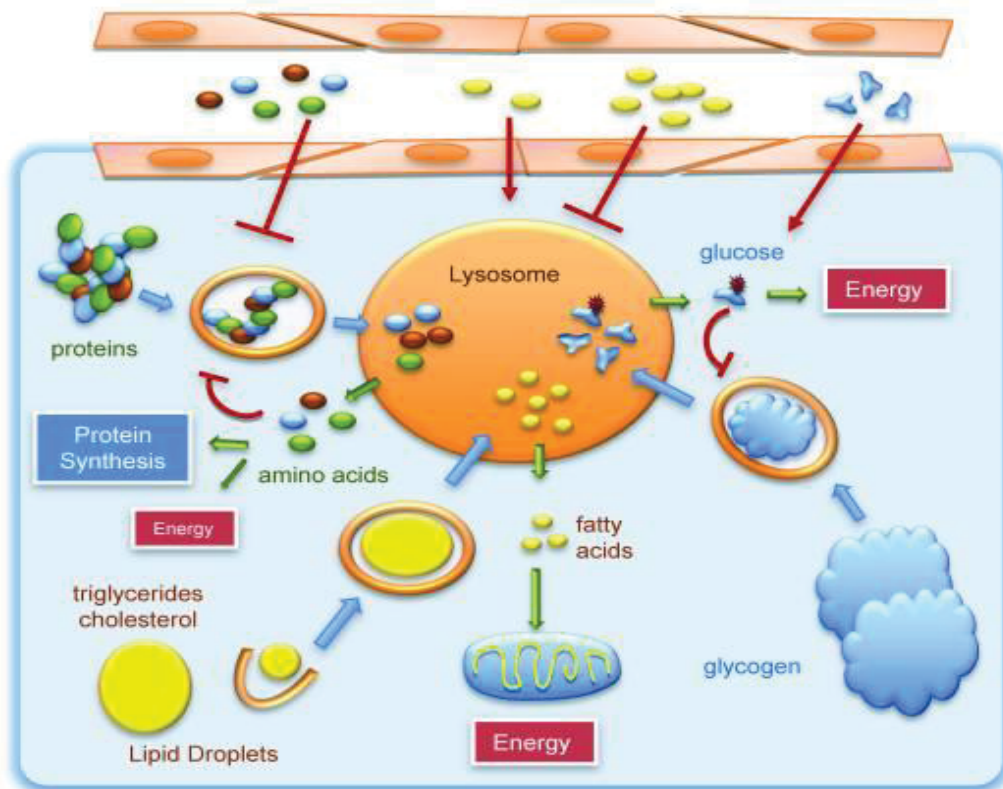


Figure 12: Interaction entre l'autophagie et le métabolisme protéique, glucidique et lipidique (d'après Singh et Cuervo, 2011).

L'autophagie contribue à la dégradation des protéines, des réserves lipidiques et du glycogène. Les éléments constitutifs de ces macromolécules sont relargués du lysosome afin de fournir de l'énergie. Dans le cas de la dégradation des protéines, les acides aminés qui en résultent peuvent avoir une valeur moins énergétique et être préférentiellement utilisés pour la synthèse de nouvelles protéines. Les niveaux d'acides aminés, d'acides gras libres et de sucres circulants dans le sang ou dans les milieux extracellulaires ont un impact direct sur l'autophagie intracellulaire.

5-2-Fonction de l'autophagie dans le métabolisme intermédiaire

L'autophagie mobilise plusieurs réserves énergétiques cellulaires afin de fournir un appui nutritionnel en cas de besoins. La première fonction connue de l'autophagie est la mobilisation des substrats protéiques. Dans le foie, l'autophagie est capable de dégrader respectivement 1.5% et 5% du protéome total par heure, en situation nourri et au cours du jeûne (Deter et al., 1967). Au niveau cellulaire, l'autophagie est responsable de la dégradation de 70% de protéines intracellulaires. Suite à la dégradation des protéines dans le lysosome, les acides aminés relargués sont souvent utilisés, soit pour la production d'énergie (ATP) via le catabolisme des acides aminés (Kuma et al., 2004), soit pour la synthèse de nouvelles protéines (Tsukamoto et al., 2008). En plus de son rôle dans le métabolisme des protéines, l'autophagie contribue aussi au métabolisme glucidique et lipidique. Cette interaction illustre ainsi l'existence d'une collaboration dynamique entre l'autophagie et la balance énergétique cellulaire (Figure 12).

5-2-1-Métabolisme glucidique

Production des acides aminés par l'autophagie : fourniture de substrats pour la production endogène de glucose via la voie de la néoglucogenèse

Récemment il a été démontré qu'en situation de jeûne et au moment de naissance, l'autophagie jouait un rôle crucial dans le maintien de la glycémie (Efeyan et al., 2013; Ezaki et al., 2011). Les auteurs de ces articles montrent qu'en situation de jeûne, la dégradation des protéines par l'autophagie permet la libération d'acides aminés, qui sont utilisés pour le maintien de la glycémie via la néoglucogenèse. La néoglucogenèse permet en effet la synthèse du glucose (principalement dans le foie) à partir des acides aminés glucoformateurs (alanine, sérine et cystéine). Il est ainsi clair que l'autophagie joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie glucidique en maintenant une production endogène de glucose satisfaisante.

Dégradation du glycogène par l'autophagie (la glycophagie)

L'autophagie semble également contribuer au métabolisme du glucose en dégradant spécifiquement le glycogène (Kotoulas et al., 2006) (Figure 12). Cette voie a été mise en évidence chez des rats nouveau-nés qui subissent après leur naissance une période de

privation nutritionnelle aigue. Afin de fournir de l'énergie, le glycogène hépatique stocké est hydrolysé en glucose (Kalamidas and Kotoulas, 2000).

Au niveau du foie, le glycogène est généralement dégradé dans le cytosol par la voie de la glycogénolyse, mais aussi par l'acide glycosidase lysosomale et donc la voie autophagique (glycophagie). Les deux enzymes mannose-6-lysosomal et glucose-6-phosphatase phosphorylent le glucose et favorisent sa sortie du lysosome. Dans le muscle, plusieurs études chez les mammifères ont montré qu'un dysfonctionnement de la dégradation des stocks de glycogène par l'autophagie est responsable de plusieurs troubles musculaires, connu sous le nom de myopathies autophagique vacuolaires (Fukuda et al., 2007; Nishino et al., 2000).

Elimination ciblée des enzymes glycolytiques par la CMA

Enfin, il a été démontré récemment que la CMA jouerait aussi un rôle crucial dans le métabolisme glucidique. En effet, l'équipe de Cuervo a montré chez des souris déficientes en Lamp-2a dans le foie (protéine importante de la CMA), que le niveau de glucose sanguin, ainsi que la teneur en glycogène, diminuent au niveau hépatique. Ceci est dû à une augmentation du niveau de protéines glycolytiques au niveau hépatique (Schneider et al., 2014). Cette équipe a ainsi mis en évidence le rôle important de la CMA dans le contrôle du renouvellement des protéines glycolytiques.

5-2-2-Métabolisme lipidique

Mobilisation des réserves lipidiques intracellulaires par l'autophagie (la lipophagie)

Toutes les cellules eucaryotes, de la levure aux cellules de mammifères, ont développé la capacité d'accumuler des lipides et de former des gouttelettes lipidiques en réponse à un afflux massif d'acides gras. Ces gouttelettes lipidiques contiennent des lipides neutres, qui constituent de très bons substrats pour stocker de l'énergie étant donné la structure hydrophobe de leur squelette et leur très grand nombre de carbones pouvant produire de l'ATP en grande quantité par oxydation mitochondriale. Par analogie aux granules de glycogène, qui constituent aussi une forme de stockage de l'énergie dérivée du glucose, les gouttelettes lipidiques ont longtemps été considérées comme des dépôts intra-cytoplasmiques inertes. Cependant, au cours de ces dernières années, notre connaissance de la biologie des gouttelettes s'est considérablement étoffée et, de simples réservoirs de lipides neutres, elles ont acquis le statut d'organelles dynamiques (Greenberg et al., 2011).

La mobilisation de ces lipides neutres au niveau de ces GL était attribuée aux lipases, jusqu'à la découverte de l'implication de l'autophagie dans ce processus. La dégradation des GL par l'autophagie, appelée lipophagie, a été décrite pour la première fois dans les cultures cellulaires d'hépatocyte (Singh et al., 2009a). L'inhibition pharmacologique ou génétique de l'autophagie au niveau des hépatocytes augmente le contenu en TG cellulaire mais aussi la taille et le nombre des GL. Cette inhibition n'affecte ni la lipogenèse ni la sécrétion des lipides mais entraîne une diminution de la libération des acides gras libres conduisant à un défaut de la β -oxydation mitochondriale (Singh et al., 2009a).

Les analyses par fluorescence et par microscope électronique ont pu confirmer que les lipides intracellulaires et les GL se déplacent à travers les autophagosomes et les lysosomes. Ces études *in vitro* ont été confirmées chez la souris transgénique déficiente en *Atg7* spécifiquement invalidées dans le foie. La délétion d'*Atg7* conduit à une augmentation drastique des TG et du cholestérol hépatique, montrant l'implication de l'autophagie dans la mobilisation des lipides contenus dans les GL (Singh et al., 2009a).

Mobilisation des réserves lipidiques intracellulaires par la CMA

En plus de son rôle joué dans la régulation du métabolisme glucidique, la CMA joue aussi un rôle important dans le métabolisme lipidique. En effet, 30% des protéines identifiées comme substrat de la CMA, participent au métabolisme lipidique, la synthèse des TG, le métabolisme des stéroïdes et la liaison et le transport des lipides. Le foie des souris déficientes en Lamp-2a présente une stéatose hépatique. Ce phénotype est accompagné par une augmentation des enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique, due à la réduction de leur dégradation par la CMA (Schneider et al., 2014). Chez les souris déficientes en Lamp-2A, les hépatocytes accumulent les lipides et plus précisément les TG avec réduction du taux de β -oxydation mitochondrial. Ceci peut être expliqué par l'augmentation des acides gras libres qui sont acheminés vers la lipogenèse mais aussi par la diminution de la dégradation des TG intracellulaires. Enfin, ce changement métabolique chez les souris déficientes en Lamp-2a pourrait également s'expliquer par l'étroite interconnexion entre le métabolisme lipidique et glucidique (Schneider et al., 2014). Ainsi, la CMA comme l'autophagie participe au maintien de l'homéostasie de l'organisme en contrôlant le métabolisme lipidique et glucidique.

Cas particulier du rôle de l'autophagie : les adipocytes

Le rôle de la lipophagie a été mis en évidence également dans d'autres types cellulaires tels que les fibroblastes embryonnaires de souris (Singh et al., 2009a), l'hypothalamus (Singh,

2011) et les neurones (Martinez-Vicente et al., 2010). En revanche, la fonction de l'autophagie dans les tissus adipeux semble être différente.

Il existe deux types de tissu adipeux, le blanc et le brun, dont les rôles métaboliques sont distincts et complémentaires. Le tissu adipeux blanc, accumule l'énergie en excès dans l'organisme sous forme de graisses. Au contraire le tissu adipeux brun augmente le catabolisme lipidique via la β -oxydation. La différenciation des adipocytes en tissus adipeux blanc et en tissus adipeux brun est modulée par divers facteurs de transcription et voies de signalisation. L'invalidation spécifique des gènes de l'autophagie dans le tissu adipeux n'a pas permis de mettre en évidence de lipophagie active dans les adipocytes. Par contre, elle conduit à un défaut de la différenciation adipocytaire qui se traduit par une accumulation d'adipocytes bruns au détriment des adipocytes blancs.(Baerga et al., 2009; Singh et al., 2009b). Les mécanismes impliqués dans cet effet ne sont toujours pas élucidés.

6- Autophagie chez les espèces d'intérêt aquacole

6-1-Existence de l'autophagie chez les espèces d'intérêt aquacole

Bien que la voie autophagie-lysosomale ait principalement été étudiée chez les levures et les mammifères, elle a également été mise en évidence chez différentes espèces de poissons. En effet, dès 1973, une étude *in vitro* menée sur des tubules rénaux de *Paralichthys lethostigma* (un poisson plat communément appelé Cardeau de Floride) a montré, par microscopie électronique, l'existence de vacuoles autophagiques délimitées par une double membrane et contenant des organelles, comme les mitochondries (Shelburne et al., 1973). Une heure après l'extraction des tubules, les auteurs observaient une induction du nombre de vacuoles. Après cinq heures d'incubation, le nombre de ces vacuoles dans les cellules restait approximativement similaire. Par contre, la majorité d'entre-elles n'était plus délimitées que par une seule membrane et les organelles séquestrées était complètement dégradées. Les auteurs montraient également, en utilisant différents inhibiteurs, que la formation de cette vacuole était dépendante de l'énergie, et qu'elle était probablement formée à partir d'enzymes et d'un pool de membranes préexistantes (Shelburne et al., 1973). Ainsi ces premières données montraient déjà l'existence d'un processus de dégradation indépendant, dynamique et complexe ; il s'agissait de l'autophagie.

6-2-Autophagie et dégradation des protéines musculaires

Par la suite, d'autres études ont montré l'existence de ce système chez différentes espèces de poissons, principalement au niveau du muscle squelettique. Chez les poissons, ce tissu représente 45 à 65% du poids vif et constitue le réservoir majeur d'acides aminés et d'énergie. Il est particulièrement affecté durant les longues périodes de jeûne pendant la maturation sexuelle ou au cours des migrations chez certaines espèces migratrices (saumons, anguilles). Ainsi, de nombreuses études ont montré chez différentes espèces de poissons, une augmentation de l'expression et de l'activité des cathepsines, lors de la dégradation des protéines musculaires induite par le jeûne, ou lors de périodes de migration (Guderley et al., 2003; Mommsen et al., 1980; Salem et al., 2006; von der Decken, 1992; Yamashita and Konagaya, 1990). Ceci conduit de nombreux auteurs à considérer la voie autophagie-lysosomale comme le système majeur de dégradation des protéines musculaire chez les poissons (Mommsen, 2004).

6-3-Autophagie et stress cellulaire

De nombreuses études ont également montré l'effet de certains types de polluants (métaux lourds, xénobiotiques organiques et hydrocarbures) sur l'activité du système autophagique-lysosomal, chez certaines espèces de poissons mais aussi chez les mollusques (Moore et al., 2006a; Moore et al., 2006b). Une exposition à de tels polluants conduirait à la production de protéines oxydées et de lipofuscines (pigment lipoprotéique insoluble) (Brunk and Terman, 2002; Moore, 1990). Ces pigments sont générés probablement par l'accumulation d'organelles endommagées, de phospholipides et de lipides, qui n'ont pas pu être dégradés par le système autophagique-lysosomal. A l'inverse, l'induction de l'autophagie par une privation de nutriments chez les moules, permettrait de protéger les cellules soumises à un stress, en réduisant la formation de lipofuscines (Moore, 2004; Moore et al., 2006a). Dans le même ordre d'idée, une stimulation régulière de l'autophagie par des épisodes répétés de stress oxydant est également présentée comme un possible mécanisme de résistance et de protection de la cellule chez les mollusques (Moore et al., 2006b).

D'autre part, il a été démontré qu'une salinité accrue provoque une induction de l'activité lysosomale chez les moules (*Mytilus edulis*). Ce phénomène permettrait d'induire le catabolisme des protéines (par autophagie), pour disposer d'acides aminés libres pouvant être re-mobilisés et assurer l'osmorégulation (Pipe and Moore, 1985). Le rôle de l'autophagie

dans la régulation de la pression osmotique a également été démontré chez le poisson chat (*Clarias batrachus*). Elle permettrait aux cellules hépatiques d'ajuster leurs volumes cellulaires en situation de stress osmotique (Biswas et al., 2009).

Dans l'ensemble, ces études montrent le rôle du système autophagique-lysosomal dans la protection de la cellule à différents stress biologiques (polluants, stress oxydatif et stress osmotique) chez les poissons mais aussi chez les mollusques. L'induction de ce système de dégradation est aujourd'hui utilisée comme un biomarqueur de stress liés aux polluants environnementaux (Moore et al., 2006a).

6-4-Régulation du système autophagique-lysosomal

Comme nous venons de le voir, le système autophagique-lysosomal a fait l'objet d'un certain nombre d'études chez les poissons. Toutefois, jusqu'à récemment, très peu de données étaient disponibles sur les mécanismes de contrôle de cette voie catabolique chez ces espèces. Ainsi, la première étude portant réellement sur les mécanismes de régulation de l'autophagie chez les poissons ne date que de 2009 (He et al., 2009). Dans cette étude, les auteurs démontrent chez le poisson zèbre que le système autophagique se met très tardivement en place au cours de l'embryogenèse par rapport aux mammifères. Ils relient ce retard à une expression tout aussi tardive de certains gènes autophagiques au cours du développement du poisson zèbre, abordant pour la première fois la question des mécanismes de régulation de ce système cellulaire chez les poissons. Un an après cet article, Dowling et al. utilisent l'avantage que confère le poisson zèbre pour inhiber ou sur-exprimer *in vivo* l'expression des gènes et démontrent le rôle suppresseur des myotubularines (phosphatases lipidiques) dans la formation de l'autophagosome (Dowling et al., 2010). Suivant une approche similaire, d'autres études caractériseront par la suite le rôle de certains gènes (*Atg5*, *ambra1a*, *ambra1b*, *Spns1*, *CALM*) dans la régulation de l'autophagie chez le poisson zèbre (Benato et al., 2013; Hu et al., 2011; Moreau et al., 2014; Sasaki et al., 2014). En outre, toute une série d'études se focalisera sur les mécanismes d'induction de l'autophagie au cours d'infections virales, bactériennes ou mycobactériennes chez cette même espèce (Garcia-Valtanen et al., 2014; Hosseini et al., 2014; Mostowy et al., 2013; Van der Vaart et al., 2014). Par contre, très peu d'études ont été consacrées aux mécanismes de contrôle nutritionnel de l'autophagie chez les poissons. Une série d'études effectuée chez la truite arc-en-ciel a toutefois démontrée que l'expression de gènes de l'autophagie est induite en situation catabolique (poisson soumis à

un jeune prolongé ou cellules cultivées sans sérum) et réprimée par la réalimentation, de façon comparable à ce qui est décrit chez les mammifères (Seiliez et al., 2010; Seiliez et al., 2011). Cependant, contrairement aux mammifères, la voie insuline/IGF1-Akt-FoxO semble n'exercer qu'un rôle modéré dans la régulation de l'expression des gènes étudiés (Seiliez et al., 2010). Plus récemment, une étude effectuée sur des myocytes de truite démontre que les gènes de l'autophagie sont sous le contrôle étroit de la disponibilité en acides aminés (Seiliez et al., 2012). Les mécanismes sous-jacents mettraient en jeu, au moins en partie, la voie de signalisation TORC1.

Dans l'ensemble, bien que le système autophagie-lysosomal ait été identifié chez les poissons il y a plus de 40 ans et que son importance physiologique ait été suggérée assez tôt après sa caractérisation, ces données montrent que les études sur la compréhension des mécanismes sous-jacents n'ont été initiées que très récemment et restent encore très fragmentaires.

OBJECTIFS

La recherche sur l'autophagie connaît depuis une dizaine d'années un regain d'intérêt et on assiste à une explosion du nombre d'études portant aussi bien sur les mécanismes fins de son activation que sur son rôle métabolique, physiologique et/ou physiopathologique (Feng et al., 2014; Klionsky and Codogno, 2013; Parzych and Klionsky, 2014). Cette fonction cellulaire est ainsi décrite comme une voie majeure du catabolisme lysosomal conservée au cours de l'évolution qui, en réponse à des stress environnementaux (carence nutritionnelle, stress énergétique...), assure l'approvisionnement en nutriments et énergie et garantit ainsi l'homéostasie cellulaire. De nombreuses études *in vitro* ont ainsi décrit les mécanismes impliqués dans l'activation de l'autophagie en situation de carence totale en acides aminés ou en glucose (Mizushima and Klionsky, 2007; Mortimore and Poso, 1987; Ravikumar et al., 2003). Paradoxalement, très peu de données sont aujourd'hui disponibles sur le rôle des nutriments et de leurs interactions *in vivo* en situation physiologique. L'objectif principal de cette thèse était donc d'étudier l'effet de la qualité nutritionnelle de l'aliment (ratio protéines/glucides ou niveaux de méthionine dans l'aliment) sur le contrôle de l'autophagie *in vivo*. En d'autres termes, il s'agissait de **vérifier si la composition d'un aliment peut affecter la réponse de l'autophagie à l'alimentation et de déterminer les mécanismes impliqués**. Comme cela a été décrit dans la revue bibliographique (partie 5.1), un certain nombre d'études ont démontré le rôle important de l'autophagie dans le contrôle de la masse musculaire (Grumati et al., 2010; Masiero et al., 2009; Raben et al., 2008; Sandri, 2010). Le travail effectué dans la présente thèse porte donc principalement sur ce tissu qui représente la cible principale en production animale.

Afin de répondre à l'objectif principal présenté ci-dessus, trois études ont été réalisées au cours de cette thèse. Elles ont été effectuées en utilisant la truite arc-en-ciel comme modèle d'étude et avaient pour but :

1. D'étudier l'effet du rapport protéines/glucides dans l'aliment sur les déterminants majeurs de l'autophagie dans le muscle.
2. D'étudier l'effet d'une carence ou d'un excès en méthionine dans l'aliment sur les déterminants majeurs de l'autophagie et du renouvellement des protéines musculaires dans le muscle.
3. De caractériser les limites de la mesure du "flux autophagique" *in vivo*.

RESULTATS

Les résultats issus des travaux réalisés au cours de cette thèse ont donné lieu à deux publications acceptées et un troisième article en cours de préparation. Ils seront donc présentés sous formes de trois parties, chacune correspondant à l'objet de ces trois publications.

PUBLICATION 1

Macronutrient composition of the diet affects the feeding-mediated down regulation of autophagy in muscle of rainbow trout (*O. mykiss*).

PLOS ONE

Ikram Belghit, Stéphane Panserat, Bastien Sadoul, Karine Dias, Sandrine Skiba-Cassy, Iban Seiliez.

PUBLICATION 2

Dietary methionine availability affects the main factors involved in muscle protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

British Journal of Nutrition

Ikram Belghit, Sandrine Skiba-Cassy, Inge Geurden, Karine Dias, Anne Surget, Sadasivam Kaushik, Stéphane Panserat, Iban Seiliez.

PUBLICATION 3

Looking at the limits of *in vivo* autophagic flux assays

Ikram Belghit, Sandrine Skiba-Cassy, Karine Dias, Stéphane Panserat, Iban Seiliez.

PUBLICATION 1

1-Effet du rapport protéines/glucides dans l'aliment sur les déterminants majeurs de l'autophagie dans le muscle de truite arc-en-ciel

Objectifs

L'effet d'une carence totale en nutriments (acides aminés ou glucose) sur l'induction de l'autophagie a fait l'objet de nombreuses études *in vitro* ces dernières années (Mizushima and Klionsky, 2007; Ravikumar et al., 2003). Par contre, très peu de données étaient disponibles sur le rôle des nutriments et de leurs interactions *in vivo* en situation physiologique. **L'objectif principal de cette première étude était donc d'étudier l'effet de la qualité nutritionnelle de l'aliment sur le contrôle de l'autophagie dans le muscle de truite arc-en-ciel.** Plus précisément, il s'agissait d'étudier l'effet d'une augmentation des glucides alimentaires au détriment des protéines sur les principales voies de contrôle de l'autophagie (Akt-FoxO, mTORC1 et AMPK) ainsi que sur le marqueur principal de la formation des autophagosomes, LC3-II. Afin de préciser les résultats obtenus *in vivo*, une étude sur culture primaire de cellules musculaires de truite a été effectuée. Les cellules ont été stimulées avec des acides aminés, du glucose ou une combinaison des deux et les mêmes facteurs que ceux décrits précédemment ont été analysés. Enfin, la rapamycine, inhibiteur du complexe mTORC1, a été utilisée dans le but de déterminer si les effets observés lors d'une stimulation par les acides aminés et/ou le glucose étaient dépendants de la voie de signalisation mTORC1.

Principaux résultats et conclusions

Ce travail a permis de démontrer que la prise alimentaire s'accompagne d'une activation rapide (4h après le repas) des voies de signalisation Akt-FoxO et mTORC1 et d'une diminution concomitante de la formation des autophagosomes (révélée par la baisse du rapport LC3-II/ β -tubuline). Les résultats montrent également que cet effet de la prise alimentaire ne se produit plus lorsque la proportion de glucides alimentaires augmente au détriment des protéines (Figure. 13). Ces résultats sont en accord avec de récentes données montrant une activation de l'autophagie chez des souris alimentées pendant plusieurs mois avec un aliment déficient en protéines (De Palma et al., 2012; Grumati et al., 2010; Grumati et al., 2011). Cependant, dans la présente étude nous démontrons, tout du moins chez la truite arc-en-ciel, que cet effet se produit dès le premier jour d'alimentation.

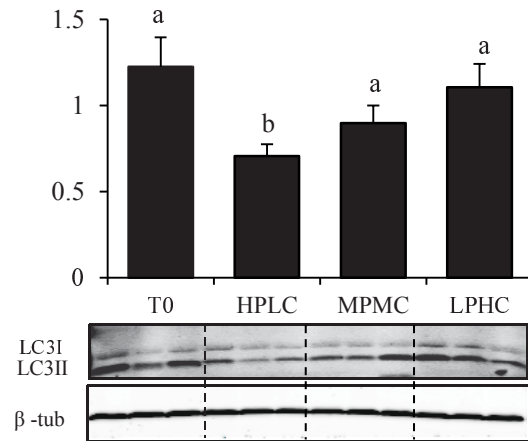


Figure 13: Effet de la composition en macronutriments de l'aliment (différentes proportions en protéines et en glucose) sur la formation de l'autophagosome (ratio LC3-II/β-tubuline) dans le muscle de la truite.

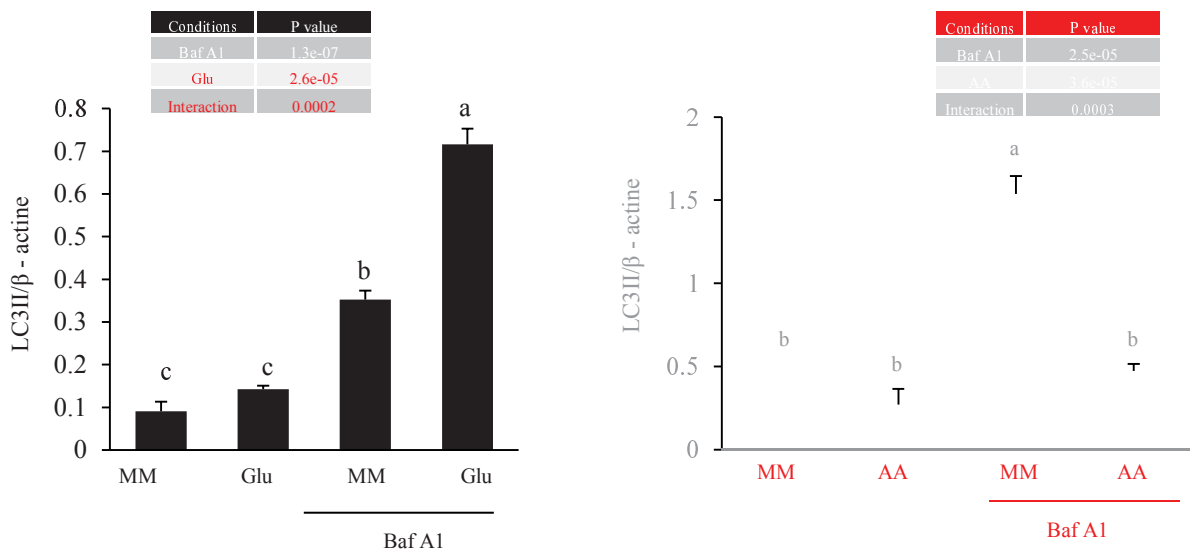


Figure 14 : Effet des acides aminés et/ou du glucose sur le rapport LC3-II/β-actine dans les myoblastes de truites. Les cellules musculaires ont été incubées pendant 4 h dans un milieu minimal (MM), supplémentées avec, 25mM de glucose et/ou un pool d'acides aminés, en présence ou en absence de Bafilomycine A1 (Baf A1).

Parallèlement, notre étude *in vitro* sur culture primaire de cellules musculaires de truite démontre un effet inverse des acides aminés et du glucose sur le niveau de LC3-II (Figure. 14). Plus précisément, l'addition d'acides aminés dans le milieu de culture abaisse le taux de LC3-II, tandis que l'addition de glucose a un effet opposé. Les résultats obtenus avec les acides aminés sont en accord avec des études antérieures montrant que la formation des autophagosomes est sous le contrôle étroit de la disponibilité en acides aminés (Ghislat et al., 2012; Martinet et al., 2005; Mordier et al., 2000; Munafó and Colombo, 2001; Tassa et al., 2003; Yabu et al., 2012), et suggèrent que la réduction de la proportion de protéines dans les régimes MPMC et LPHC contribue à atténuer l'inhibition par la réalimentation du niveau de LC3-II. En outre, et conformément à ce qui est décrit chez les mammifères, nos données *in vitro* obtenues avec la rapamycine indiquent que l'effet des acides aminés sur la formation des autophagosomes est médié par le complexe mTORC1, suggérant une bonne conservation des mécanismes de régulation par les acides aminés de ce système catabolique au cours de l'évolution.

L'induction du niveau de LC3-II par l'ajout de glucose dans le milieu de culture était plus inattendue. En effet, plusieurs études ont démontré que la privation de glucose, et non l'ajout, induit la formation d'autophagosomes (Duan et al., 2011; Kobayashi et al., 2012). Les seules études associant des niveaux élevés de glucose à l'induction de l'autophagie concernent des souris diabétiques (Lee et al., 2012; Yan et al., 2012). En ce sens, il est important de rappeler que la truite arc-en-ciel est considérée comme "intolérante" au glucose alimentaire et se caractérise par une hyperglycémie prolongée après un repas riche en glucides (Moon, 2001). L'induction du taux de LC3-II observée après l'addition de glucose dans le milieu de culture pourrait par conséquent être une conséquence de la spécificité du métabolisme de l'espèce étudiée. En outre, cet effet pourrait également contribuer à l'absence d'inhibition par la réalimentation du rapport LC3-II/ β -tubuline avec les régimes MPMC et LPHC. De nombreuses questions restent donc en suspens et notamment les mécanismes impliqués dans l'effet du glucose, qui semblent indépendants des voies de signalisation étudiées (Akt-FoxO, mTORC1, AMPK).

En conclusion, cette étude démontre que la composition du régime alimentaire (ratio protéines/glucides) influence significativement les mécanismes de contrôle de l'autophagie dans le muscle de truite arc-en-ciel et mettent en évidence l'intérêt de considérer la composition en macronutriments des régimes dans le contrôle de cette voie de dégradation.

Macronutrient Composition of the Diet Affects the Feeding-Mediated Down Regulation of Autophagy in Muscle of Rainbow Trout (*O. mykiss*)

Ikram Belghit, Stéphane Panserat, Bastien Sadoul, Karine Dias, Sandrine Skiba-Cassy, Iban Seiliez*

INRA, UR1067 Nutrition Métabolisme Aquaculture, St-Pée-sur-Nivelle, France

Abstract

Autophagy functions as an important catabolic mechanism by mediating the turnover of intracellular organelles and protein complexes through a lysosome dependent degradative pathway. Although the induction of autophagy by starvation has been extensively studied, we still know very little about how autophagy is regulated under normal nutritional conditions. The purpose of the present study was to characterize both in vivo and in vitro the response of the autophagy-lysosomal degradative pathway to nutrient (amino acids and carbohydrates) availability in the muscle of the carnivorous rainbow trout. We report that meal feeding is accompanied by a rapid activation of Akt, FoxO1 and the Target of Rapamycin (TOR) signaling pathways and a concomitant decrease of autophagosome formation. We also show that this effect occurs only when the proportion of dietary proteins increases at the expense of carbohydrates. Concurrently, our in vitro study on primary culture of trout muscle cells demonstrates an opposite effect of amino acids and glucose on the regulation of autophagy-lysosomal pathways. More specifically, the addition of amino acids in cell culture medium inhibited the formation of autophagosomes, whereas the addition of glucose had an opposite effect. The effect of amino acids was accompanied by an activation of TOR, considered as an important regulator of autophagosome formation. However, the mechanisms involved in the effect of glucose were independent of Akt, TOR and AMPK and remain to be determined. Together, these results demonstrated the specific role of macronutrients as well as that of their interactions in the regulation of autophagy and highlight the interest to consider the macronutrient composition of the diets in the control of this degradative pathway.

Citation: Belghit I, Panserat S, Sadoul B, Dias K, Skiba-Cassy S, et al. (2013) Macronutrient Composition of the Diet Affects the Feeding-Mediated Down Regulation of Autophagy in Muscle of Rainbow Trout (*O. mykiss*). PLoS ONE 8(9): e74308. doi:10.1371/journal.pone.0074308

Editor: Bart O. Williams, Van Andel Institute, United States of America

Received: February 22, 2013; **Accepted:** July 31, 2013; **Published:** September 12, 2013

Copyright: © 2013 Belghit et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by the European Union 7th Framework project (Project Call Identifier: FP7-KBBE-2011-5, Project Number: 288925, Advanced Research Initiatives for Nutrition & Aquaculture (ARRAINA)). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: seiliez@st-pee.inra.fr

Introduction

Protein degradation is a highly regulated and selective process that depends on the activation of conserved proteolytic pathways [1]. Two major proteolytic systems are thought to (co-) operate in the skeletal muscle of vertebrates, the ubiquitin/proteasomal pathway and the autophagic/lysosomal pathway [2]. The ubiquitin/proteasomal pathway has been well documented and has long been considered to be the primary system involved in muscle atrophy [3–7]. In contrast, until recently, the role of autophagy in skeletal muscle protein degradation has been largely ignored. Recent work by Masiero *et al.*, however, has demonstrated that basal autophagy is critical to muscle homeostasis, since it is responsible for the removal of protein aggregates and damaged mitochondria [8]. Accordingly, mice with muscle-specific suppression of autophagy exhibited severe muscle weakness, atrophy and decreased muscle contractility [8].

The autophagic/lysosomal pathway is a highly conserved homeostatic process that is responsible for the degradation of cytoplasmic components and recycling of long-lived proteins. During autophagy, a part of the cytoplasm is sequestered by a double membrane, called autophagosome. After its formation, the

autophagosome undergoes fusion events with the lysosome and acquires hydrolytic enzymes favoring the rapid degradation of the sequestered material [9,10]. One of the most widely monitored autophagy-related proteins is LC3 (Atg8 in yeast). In mammalian cells, cytosolic LC3 is synthesized as a precursor (Pro-LC3-I). Immediately after its synthesis, a C-terminal fragment is cleaved by Atg4 to produce LC3-I with an exposed glycine residue that binds covalently to phosphatidylethanolamine (PE) on the autophagosomal membrane to form LC3-II. Once the autophagosome is formed, LC3-II localizes both at the cytosolic and luminal faces of its double membrane. After fusion of the autophagosome with lysosome (autolysosome), the luminal LC3-II is degraded by lysosomal cathepsins, while Atg4 recycles LC3-I and PE from LC3-II on the cytosolic side of the autolysosome membrane. As such, LC3-II is the only protein marker that is reliably associated with the different steps of the autophagic process [11].

Regulation of autophagy has been extensively studied, but there are still many unknowns [10]. Under basal conditions, autophagy occurs at low levels in almost all cells, but it is strongly induced under stress conditions such as starvation, oxidative stress or infectious diseases [12–14]. Much attention has been paid to the mechanisms involved in the induction of autophagy during

nutrient starvation [13,15,16]. In this regard, depletion of total amino acids has been shown to strongly induce autophagosome formation via the inactivation of the major nutrient sensing mammalian target of rapamycin (mTOR) protein [17]. However, in skeletal muscle, the importance of mTOR in autophagy regulation has been questioned [2] and several evidences identified the Akt-FoxO signaling axis as a more critical factor for autophagy control in this tissue [2,18,19]. Similarly, an important role has been reported for the energy sensing AMP activated protein kinase (AMPK) in autophagy induction in response to various cellular stresses, including glucose starvation [17,20–23].

Less is known about how basal autophagy is regulated under normal nutritional conditions when nutrients are not limiting. However, this question is of particular importance given the role of basal autophagy as an important intracellular quality-control system [13]. To address this question and to gain insight into the role of nutrients and their interactions in the regulation of the basal autophagy, we analyzed the post-prandial response of the autophagosomal marker LC3-II as well as that of the upstream factors Akt, FoxO, TOR and AMPK following a single meal of different ratio of dietary carbohydrates/proteins in the muscle of the carnivorous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Furthermore, in order to analyze more specifically the effects of amino acids and/or carbohydrates on the regulation of autophagy, in vitro studies were performed using primary cultures of trout muscle cells. Rainbow trout emerged as a relevant model organism in the investigation of the nutritional regulation of autophagy [11,24,25]. The unusual features of its nutritional metabolism compared to mammals (i.e., a high dietary protein requirement combined with an apparent inability to metabolize dietary carbohydrates), make this species also particularly pertinent in comparative physiology.

Materials and Methods

Ethics Statement

The experiments were carried out in accordance with the clear boundaries of EU legal frameworks, specifically those relating to the protection of animals used for scientific purposes (i.e. Directive 2010/63/EU), and under the French legislation governing the ethical treatment of animals (Decret no. 2001-464, May 29th, 2001). The investigators carrying out the experiment had “level 1” or “level 2” certification, bestowed by the Direction Départementale des Services Vétérinaires (French veterinary services) to carry out animal experiments (INRA 2002–36, April 14th, 2002). The experiment was conducted at INRA St Pée-sur-Nivelle, certified for animal services under the permit number A64.495.1 by the French veterinary services, which is the competent authority.

Fish and Experimental Procedures

Prior to the experiments, fish (juvenile immature rainbow trout) were maintained in our own experimental facilities (INRA, Donzacq, France) in tanks kept in open circuits at 18°C with well-aerated water under natural photoperiod conditions and fed to visual satiety with a commercial diet (Skretting, France; crude protein: 49.8% dry matter, crude fat: 13.8% dry matter; gross energy: 22 kJ/g dry matter). Immediately prior to the experiments, fish were fasted for 48 h, in order to obtain the basal levels of plasma metabolites that are reached later in fish than in mammals due to slower intestinal transit and longer gastric emptying time at low temperatures compared with endothermic animals. Following the fast, fish were fed once *ad libitum* with the commercial diet or one of the three semi-purified diets of high (H), medium (M) or low (L) levels of protein (P) or carbohydrates (C) (HPLC, MPMC and LPHC, respectively) (Table 1). The amount

of feed distributed per tank was measured to ensure that feed intake was similar between diets (around 2% of their body weight). The diets were marginal, adequate and in excess of rainbow trout protein requirements (18, 37 and 65%, respectively) (NRC, 2011). Six trout were sampled for each time point, starting with unfed fish at 0 h, and following feeding at 2 h, 4 h, 12 h and 24 h. Immediately following complete anesthesia, which was confirmed by a complete absence of breathing or swimming response, trout were killed by a sharp blow to the head and decapitated to ensure fish were dead. Gut content of the sampled animals was checked to verify that fish had effectively consumed the diet. Dorsoventral white muscle from each fish were dissected, weighed, and immediately frozen in liquid nitrogen and kept at –80°C.

Plasma Metabolites

Plasma triglyceride levels were determined using a commercial kit (Biomérieux, France) adapted to a 96-microplate reader. Total plasma free amino acid (FAA) levels were determined by the

Table 1. Composition of the experimental diets.

Ingredients (%)	HPLC	MPMC	LPHC
Casein ¹	0.572	0.310	0.154
Casein hydrolysate ²	0.100	0.055	0.021
L-arginine ³	0.013	0.007	0.004
Dextrine ⁴	0.050	0.350	0.537
Soy Lecithine ⁵	0.020	0.020	0.020
Fish Oil ⁶	0.130	0.130	0.130
CaHPO ₄ .2H ₂ O (18%P) ⁷	0.000	0.013	0.019
Attractant mix ⁸	0.015	0.015	0.015
Min. premix ⁹	0.050	0.050	0.050
Vit. Premix ¹⁰	0.0500	0.050	0.050
Analytical composition (%)			
Dry Matter (DM) (%)	90.96	92.61	93.09
Proteins (%DM)	65.15	36.69	17.62
Lipids (%DM)	17.05	15.72	15.59
Energy (kJ/g DM)	24.16	21.75	20.58
NFE (Cbh) ¹¹	6.38	32.52	48.84

¹Casein (Sigma-Aldrich, USA).

²Casein hydrolysate (Sigma-Aldrich, USA).

³L-arginine (Sigma-Aldrich, USA).

⁴Dextrine (Sigma-Aldrich, USA).

⁵Soy Lecithine (Louis François, St Maur des Fossés, France).

⁶Feedoil (North sea fish oil, Sopropêche, Boulogne-sur-Mer, France).

⁷CaHPO₄.2H₂O (18%P) (Sigma-Aldrich, USA).

⁸Glucosamine 0,5 g; Taurine 0,3 g; Betaine 0,3 g; Glycine 0,2 g; Alanine 0,2 g/100 g feed.

⁹Mineral mixture (g or mg/kg diet) : calcium carbonate (40%Ca), 2.15 g; magnesium oxide (60% Mg), 1.24 g; ferric citrate, 0.2 g; potassium iodide (75% I), 0.4 mg; zinc sulphate (36% Zn), 0.4 g; copper sulphate (25% Cu), 0.3 g; manganese sulphate (33% Mn), 0.3 g; dibasic calcium phosphate (20%Ca, 18%P), 5 g; cobalt sulphate, 2 mg; sodium selenite (30% Se), 3 mg; KCl, 0.9 g; NaCl, 0.4 g (UPAE (unité de préparation des aliments expérimentaux, Jouy, Inra, France)).

¹⁰Vitamin mixture (IU or mg/kg diet) : DL- α tocopherol acetate, 60 IU; sodium menadiolone bisulphate, 5 mg; retinyl acetate, 15 000 IU; DL-cholecalciferol, 3000 IU; thiamin, 15 mg; riboflavin, 30 mg; pyridoxine, 15 mg; B12, 0.05 mg; nicotinic acid, 175 mg; folic acid, 500 mg; inositol, 1000 mg; biotin, 2.5 mg; calcium pantothenate, 50 mg; choline chloride, 2000 mg (UPAE (unité de préparation des aliments expérimentaux, Jouy, Inra, France)).

¹¹Nitrogen-free extract (Carbohydrate) : 100- (crude protein+crude fat+crude fiber+moisture+ash).

doi:10.1371/journal.pone.0074308.t001

ninhydrin reaction according to Moore [26] with glycine as standard.

Cell Cultures

Primary culture of muscle cells were prepared from rainbow trout maintained in our experimental farm (Donzacq, France). Myoblasts were carried out using, for each culture, 30 to 60 animals, each weighing approximately 5 g. Cells were isolated from the latero dorsal muscle, pooled, and cultured following a previously described protocol [27]. Briefly, after removal of the skin, dorsal white muscle was isolated under sterile conditions and collected in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 9 mM NaHCO₃, 20 mM HEPES, 15% horse serum, and antibiotic-antimycotic cocktail (100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 0.25 g/ml fungizone) at pH 7.4. After mechanical dissociation of the muscle in small pieces, the tissue was enzymatically digested with a 0.2% collagenase (Sigma, C-9891) solution in DMEM for 1 h at 18°C and gentle shaking. The suspension was centrifuged (300 g for 5 min at 15°C), and the resulting pellet was subjected to two rounds of enzymatic digestion with a 0.1% trypsin solution in DMEM for 20 min at 18°C with gentle agitation. After each round of trypsinization, the suspension was centrifuged, and the supernatant was diluted in two volumes of cold DMEM supplemented with 15% horse serum (Sigma, H1270) and the same antibiotic-antimycotic cocktail mentioned above. After two washes with DMEM, the cellular suspension was filtered through 100- and 40-µm nylon filters. All experiments were conducted with cells seeded at a density of (160.000/cm²), in 12-well plastic plates (Nunc, 140675), and left for 30 min before medium change. Plates and coverslips were previously treated with poly-L-lysine (Sigma, P6282) and laminin (Sigma, L2020) to facilitate satellite cell adhesion. Cells were incubated at 18°C, the optimal temperature for culture of trout origin, with a complete medium containing Earle's Balanced Salt (EBSS) culture medium (Sigma, E7510) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma, F7524), MEM vitamins solution (Invitrogen, 11120-037), MEM essential amino acid mixture (Invitrogen, 11130-036) and MEM non-essential amino acid mixture (Invitrogen, 11140-035) and antibiotic-antimycotic cocktail under an air atmosphere. The medium was renewed every 2 days, and observations of morphology were regularly made to control the state of the cells.

Treatment Conditions

After 4 days of culture, the cells were incubated in a minimal medium (MM) (Earle's balanced salt solution with MEM vitamins and 5 mM glucose) supplemented or not with two fold concentrated amino acids (MEM as reference) and/or 25 mM Glucose in presence or absence of 100 nM of Bafilomycin A1 (Sigma, B1793). In experiments involving rapamycin (a specific TOR-inhibitor), the inhibitor (Cell Signaling Technologies, 9904) was added 30 min prior stimulation with AA. After 30 min or 4 h of incubation, the medium was removed, the wells were washed with ice-cold PBS and the cells were used for western blot analysis. Each experiment was performed at least two times.

Protein Extraction and Western Blotting

Protein homogenates from muscles and cells were prepared as previously described [27]. Protein concentrations were determined with the Bradford reagent method [28]. Muscle or cell lysates (40 µg and 10 µg of protein, respectively) were subjected to SDS-PAGE and western blotting using the appropriate antibody: Anti-phospho Akt (Ser473) (Cell Signaling Technologies, 9271), anti-Akt (Cell Signaling Technologies, 9272), anti-phospho-p70-S6 kinase (Thr 389) (Cell Signaling Technologies 9205), anti p70-S6

kinase (Cell Signaling technologies 9202), anti-phospho AMPK (Thr172) (Cell Signaling Technologies, 2531), anti-AMPK (Cell Signaling Technologies, 2532), anti-LC3B (cell signaling Technologies, 2775), Anti-β-actin (Santa-Cruz Biotechnology, sc-47778), anti-phospho FoxO1 (Thr24)/FoxO3 (Thr32) (Cell Signaling 9464), anti FoxO1 (Epitomics, 1874-1), anti-β-tubulin (cell Signaling Technologies, 2146). All primary antibodies used have been shown to cross-react successfully with rainbow trout proteins of interest [25,27,29–31]. After washing, membranes were incubated with an IRDye infrared secondary antibody (LI-COR Inc. Biotechnology, Lincoln, NE, USA). Bands were visualized by Infrared Fluorescence using the Odyssey® Imaging System (LI-COR Inc.) and quantified by Odyssey infrared imaging system software (Application software, version 1.2).

Statistical Analysis

All data were tested for homogeneity of variances by Bartlett tests, and then submitted to a one-way ANOVA (or two way-ANOVA for the combined effect of Bafilomycin A1 with amino acid or/and glucose in trout muscle cell), using R version 2.14.0. When data did not meet the assumptions of ANOVA, the non-parametric ANOVA equivalent (Kruskal-Wallis test) was performed. When these tests showed significance, individual means were compared using Tukey multiple-range tests. Significant differences were considered when P<0.05.

Results

Refeeding Induces Akt, FoxO and TOR Signaling Proteins and Inhibits Autophagy in Muscle of Trout

Although the induction of autophagy by starvation has been extensively studied both in vivo and in vitro [15,32], we still know very little about how basal autophagy is regulated under normal nutritional conditions. Here, we analyzed the postprandial response of the autophagosomal marker LC3-II as well as that of its upstream factors Akt, FoxO1, TOR and AMPK to a single meal in the muscle of rainbow trout. Validation of the “fasting-refeeding” experimental design was first performed by assessing the postprandial plasma triglyceride (TG) and free amino acids (AA) levels. As expected, refeeding induced a significant rise in plasma TG and AA levels 12 h after refeeding (Figs. 1A and B). Accordingly, the ratio LC3-II/β-tubulin fall by half as early as 4 h after the meal and remained significantly lower than that of unfed trout until 12 h after refeeding (Fig. 2A). Concomitantly, the phosphorylation of Akt, FoxO1 as well as that of the TOR effector S6K1 was significantly induced 4 h after the meal before returning to basal levels (Figs. 2B, C and D). In contrast, we did not find any effect of the nutritional status on the phosphorylation of AMPK (Fig. 2E). Together, these results show for the first time the postprandial response of autophagy to feeding in the muscle of rainbow trout.

Macronutrient Composition of the Diet Affects the Feeding-mediated down Regulation of Autophagy in Muscle of Trout

We next addressed the question of the consequences of manipulating macronutrient composition of the diet in the regulation of muscle autophagy. More specifically, we investigated the effect of feeding three experimental diets of high (H), medium (M) or low (L) levels of protein (P) or carbohydrates (C) (HPLC, MPMC and LPHC, respectively) on the autophagosomal marker LC3-II as well as that of its upstream factors Akt, FoxO1, TOR and AMPK by comparing fasted and 2 h refeed fish. As shown in

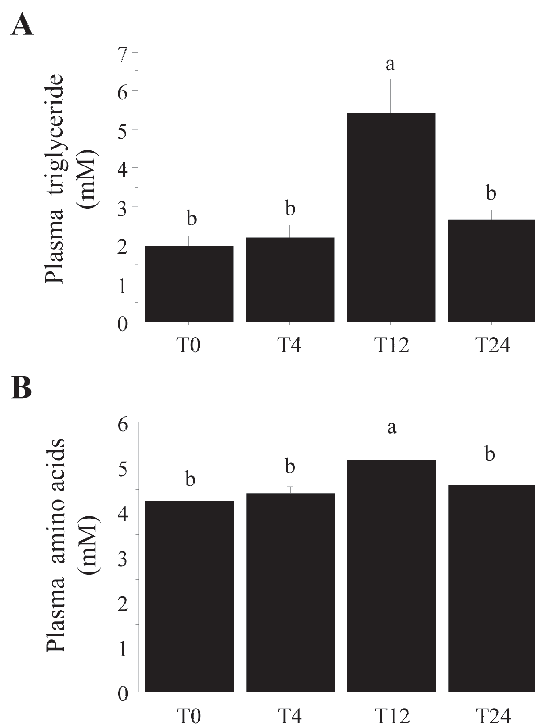


Figure 1. Plasma triglyceride (A) and amino acids (B) levels in rainbow trout fasted for 48 h (T0) and refed ad libitum with a commercial diet and sampled 4, 12 and 24 h after the meal. Results are means \pm SE (n=6). Different letters represent significantly different values ($p < 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0074308.g001

Fig. 3A, the ratio LC3-II/ β -tubulin reached significantly lower level in fish fed the HPLC diet compared with fasted trout. In contrast, no significant decrease was observed in fish fed the MPMC and LPHC diets. Likewise, the analysis of the phosphorylation of Akt, FoxO1 and S6K1 showed that HPLC was the only diet significantly affecting each protein (Figs. 3B, C and D). The phosphorylation of AMPK showed no significant differences among dietary groups (Fig. 3E). Overall, these data demonstrated for the first time that the macronutrient composition of the diet may affect the autophagic response to feeding and suggest an involvement of TOR and/or Akt-FoxO1 signaling axis in this effect.

Antagonistic Role of Amino Acids and Glucose in the Regulation of Autophagy in Trout Muscle Cell Culture

In order to clarify the specific and combined role of amino acids and glucose in the above presented feeding-induced repression of muscle autophagy, primary cultures of trout muscle cells were used. More specifically, we monitored by western blotting the LC3 lipidation in 4-day old cells stimulated or not with amino acids (AA) and/or glucose (Glu) in presence or absence of Bafilomycin A1 (Baf A1), a vacuolar ATPase inhibitor that inhibits autophagosome-lysosome fusion and prevents the degradation of LC3-II [11]. As expected, addition of Baf A1 increased the ratio LC3-II/ β -actin (Figs. 4A, B and C), validating its use in our cell culture model. Addition of AA and Glu had no effect on the ratio LC3-II/ β -actin, whatever the presence or the absence of BafA1 (Fig. 4A). When considering the effect of nutrients separately, we found a stimulatory effect of Glu on the ratio LC3-II/ β -actin in presence

of Baf A1 (Fig. 4B). In contrast, addition of AA in cells with Baf A1 decreased the ratio LC3-II/ β -actin (Fig. 4C).

Mechanisms Involved in AA- and Glu-mediated Regulation of Autophagy in Trout Muscle Cell Culture

In order to gain insight in the mechanisms involved in the above demonstrated effects of nutrients in LC3 lipidation, we monitored the phosphorylation of Akt, FoxO1, AMPK and the TOR effector S6K1 in cells stimulated or not with AA and/or Glu. The phosphorylation of S6K1 significantly increased in AA and AA+Glu treated cells but not in Glu treated cells (Fig. 5A). In contrast, no variation of Akt, FoxO1 and AMPK phosphorylation was monitored whatever the treatment (Figs. 5B, C and D). Altogether, these results suggest that, in our cell culture model, AA inhibit autophagy by activating TOR. However, the mechanisms involved in the effect of glucose seem to be independent of TOR, Akt-FoxO1 and AMPK and remain to be determined.

In order to investigate if TOR mediates the above presented effect of AA addition on autophagy, cells were then stimulated with AA in the presence or absence of the TOR inhibitor rapamycin for 30 min or 4 h. We first checked the specificity of rapamycin in our cell culture model by monitoring by western blot the phosphorylation of S6K1. As shown in Fig. 6A, the AA-mediated induction of phosphorylation of S6K1 was strongly abolished in the presence of rapamycin, demonstrating that rapamycin treatment specifically inhibits the activity of TOR in our cell culture model. We then analyzed the effect of AA with or without rapamycin on LC3 lipidation in presence of Baf A1 for 4 h. Our results showed that the inhibitory effect of AA on the ratio of LC3-II/ β -tubulin was impaired in the presence of rapamycin to reach a non-significant value (Fig. 6B, compare lane Rap and AA+Rap). This indicated an involvement of the TOR protein in the effect of AA on autophagy. However, the surprising inhibitory effect of rapamycin alone on LC3-II (compare MM and Rap), although not significant, could weaken the observed effect of AA, making possible the involvement of other mechanisms in the observed effect of AA on autophagy.

Discussion

Under physiological conditions, a basal autophagy is operating constantly for controlling the quality of proteins and organelles inside the cells [8,33,34]. This catabolic pathway can also be strongly induced under stress conditions, particularly in response to nutrient starvation [13,35]. Most studies focused on the mechanisms involved in nutrient starvation induced autophagy, but less attention has been paid on autophagy regulation under normal nutritional conditions when nutrients are not limiting. Therefore, the aim of the present work was to characterize both in vivo and in vitro, the response of the autophagy/lysosomal pathway to the availability of dietary amino acids and carbohydrates in the muscle of the carnivorous rainbow trout.

We first analyzed the postprandial response of the autophagosomal marker LC3-II as well as that of its upstream factors Akt-FoxO, TOR and AMPK to a single meal in the muscle of rainbow trout. The obtained results show a decrease of the ratio LC3-II/ β -tubulin as early as 4 h after the meal. To our knowledge, this is the first study showing the postprandial evolution of LC3B lipidation. The obtained results are somewhat surprising in comparison to the late (10–12 h) response of the Ubiquitin-Proteasome-dependent proteolytic system to refeeding as reported in trout [36] and in rats [37]. However, the activity of this last degradative system has been shown to be closely related to the “long term” transcription dependent control of the expression of several E3-Ubiquitin ligase

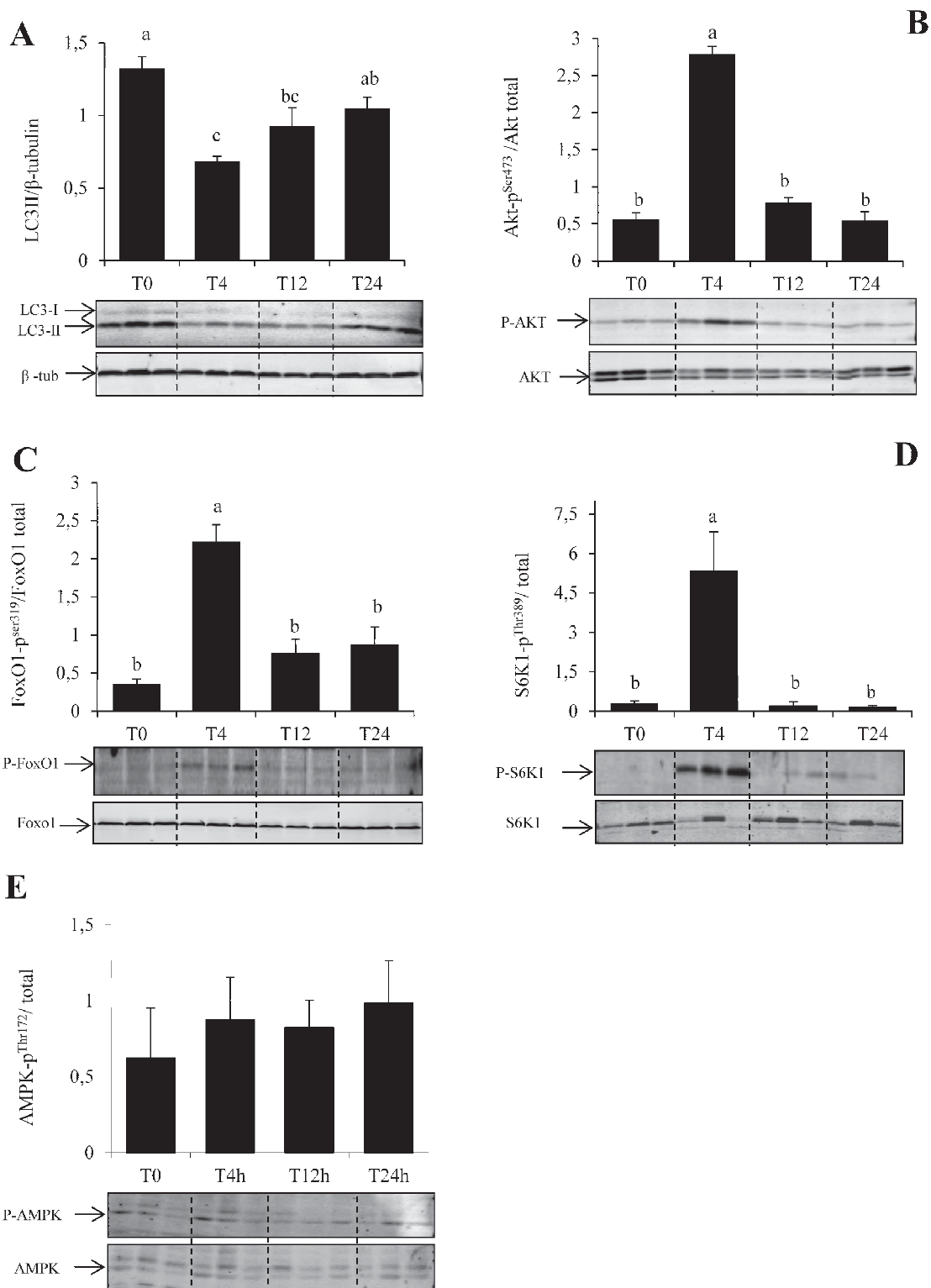


Figure 2. Postprandial response of the autophagosomal marker LC3-II and Akt, FoxO1, S6K1 and AMPK signaling proteins in trout muscle. Six trout were sampled for each time point, starting with unfed fish (T0) and following feeding at 4, 12 and 24 h. Muscle lysates (40 μ g) were analysed by Western blot with the indicated antibodies. Representative blots are shown. For LC3b, the graph represents the ratio between LC3-II (lipidated form of LC3b) and β -tubulin used as loading control. For other proteins, graphs represent the ratio between the phosphorylated protein and the total amount of the targeted protein. Results are means \pm SE ($n=6$). Different letters represent significantly different values ($p<0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0074308.g002

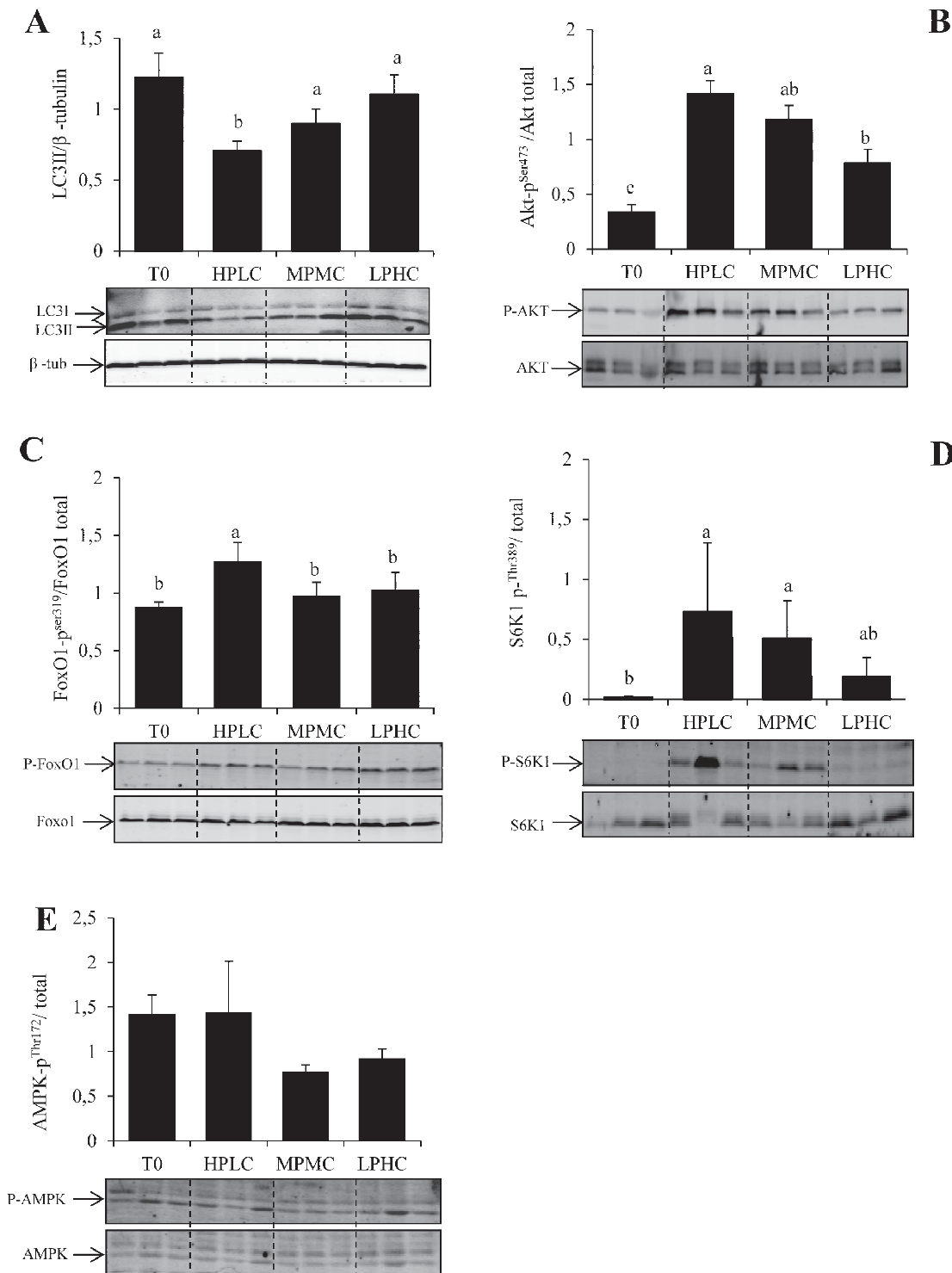


Figure 3. Western blot analysis of LC3-II processing and Akt, FoxO1, S6K1 and AMPK phosphorylation in fasted (T0) and HPLC, MPMC and LPHC diets 2h-refed rainbow trout. Muscle lysates (40 μg) were analysed by Western blot with the indicated antibodies. Representative blots are shown. For LC3b, the graph represents the ratio between LC3-II (lipidated form of LC3b) and β-tubulin used as loading control. For other proteins, graphs represent the ratio between the phosphorylated protein and the total amount of the targeted protein. Results are means ± SE (n=6). Different letters represent significantly different values (p<0.05). doi:10.1371/journal.pone.0074308.g003

coding genes [7], whereas that of autophagy has been reported to be also under a “short term” transcription independent control of

signaling proteins, including TOR, AMPK [38]. In this regard, the results presented here show a concomitant increase of the

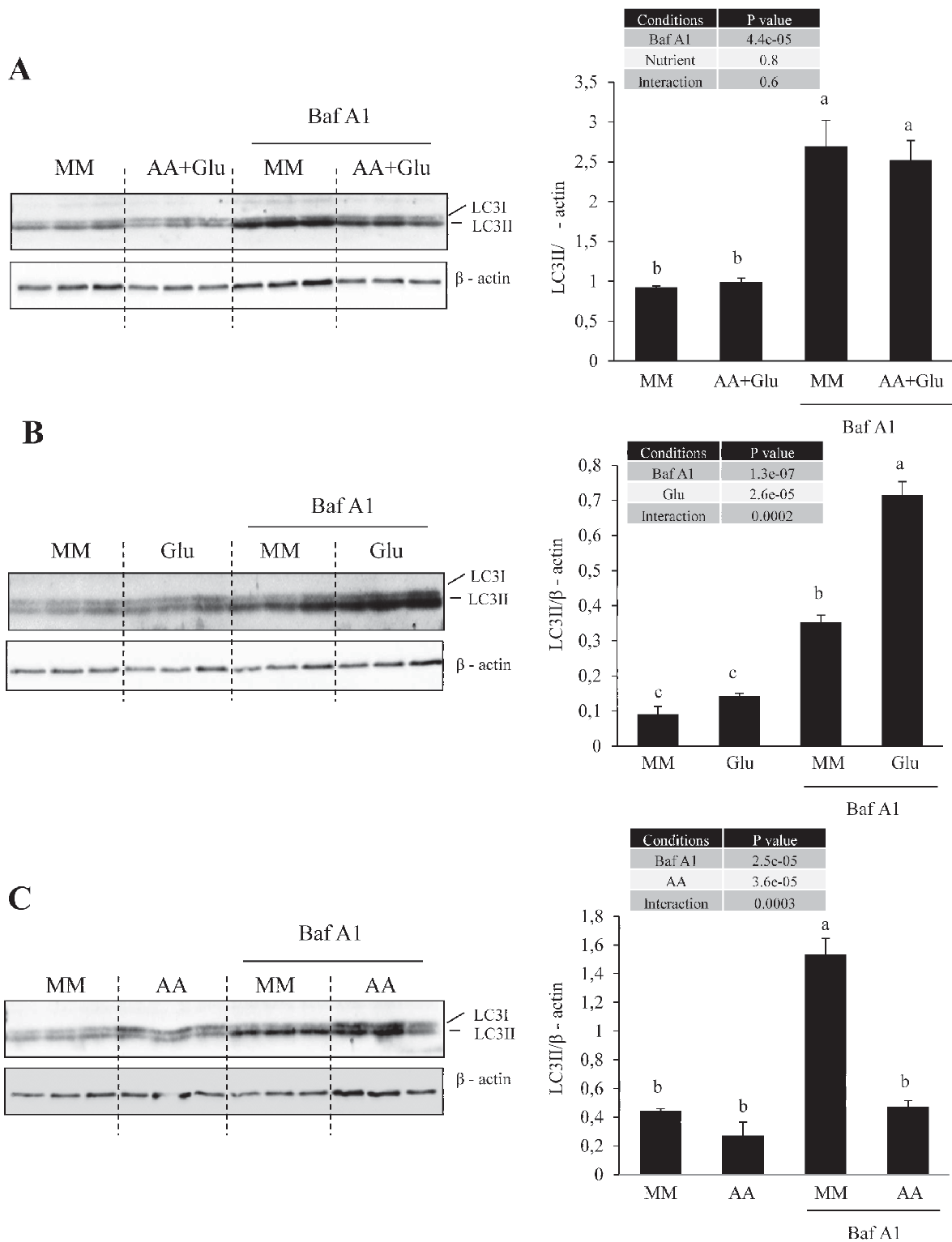


Figure 4. Antagonistic role of amino acids and glucose in the regulation of autophagy in trout muscle cell culture. Four-day-old cells were incubated in minimal medium (MM) supplemented or not with amino acids (AA) and/or 25 mM Glucose (Glu) in presence or absence of Bafilomycin A1 (Baf A1). After 4 h of incubation, cell lysates (10 μg) were analyzed by western blot with the indicate antibodies. The representative blot is shown. Graphs represent the ratio between LC3-II and β-actin. Results are means ± SE, n = 3 (mean of 2 replications). Different letters represent significantly different values (p < 0.05).
doi:10.1371/journal.pone.0074308.g004

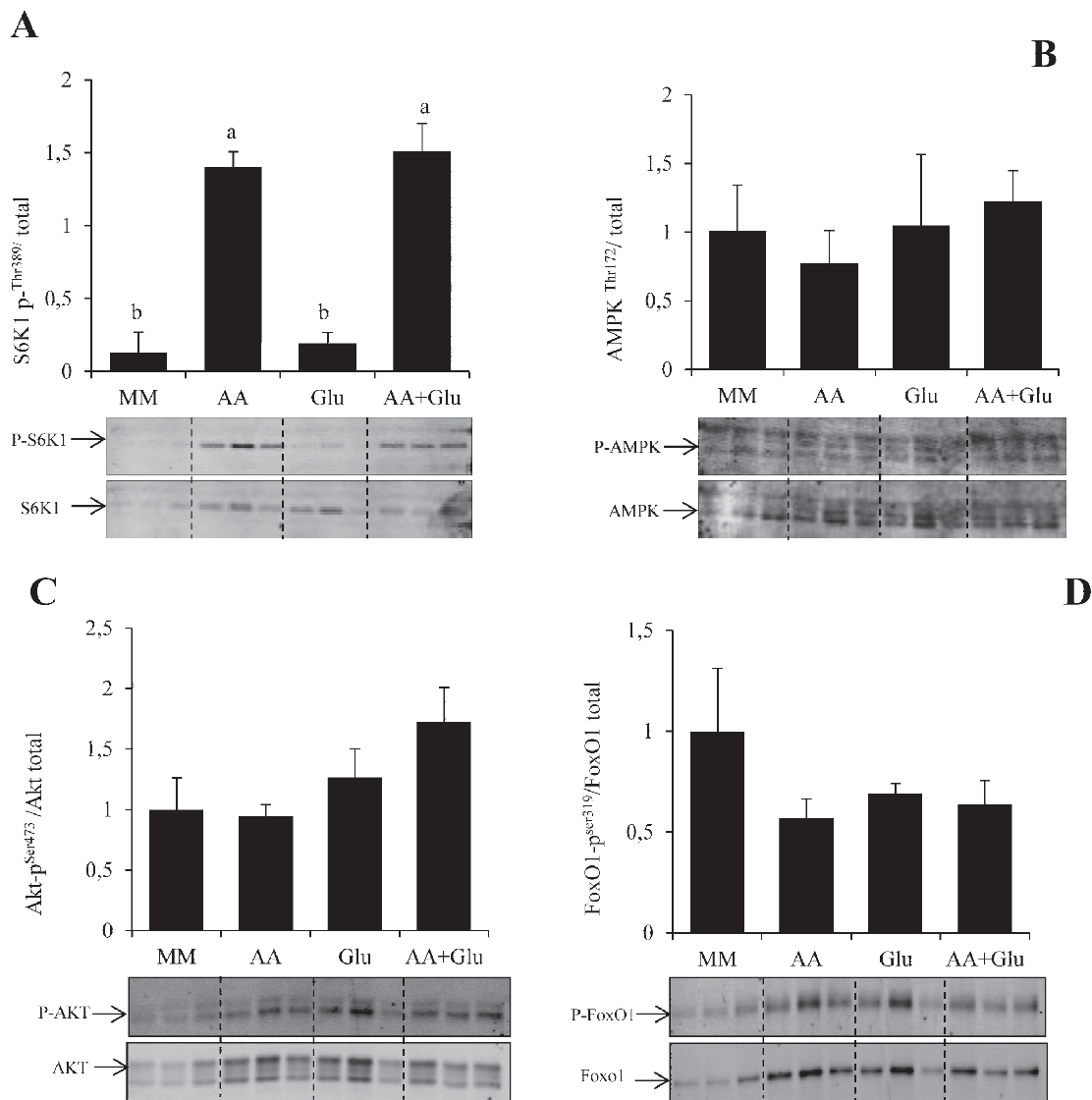


Figure 5. Mechanisms involved in AA- and Glu-mediated regulation of autophagy in trout muscle cell culture. Four-day-old cells were incubated in minimal medium (MM) supplemented or not with amino acids (AA) and/or 25 mM Glucose (Glu). After 30 min incubation, cell lysates (10 μ g) were analyzed by western blot with the indicated antibodies. A representative blot is shown. Graphs represent the ratio between the phosphorylated protein and the total amount of the targeted protein. Results are means \pm SE, n=3 (mean of 2 replications). Different letters represent significantly different values ($p < 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0074308.g005

phosphorylation of the TOR effector S6K1 4 h after meal feeding, suggesting that the TOR protein is activated at 4 h and making possible its involvement in the observed “short term” decrease of LC3-II levels. In contrast, we did not observe any effect of meal feeding on the phosphorylation of AMPK, excluding a possible involvement of this protein in LC3-lipidation.

We next addressed the question of the consequences of manipulating macronutrient composition of the diet in the regulation of muscle autophagy. More specifically, we investigated the effect of feeding three experimental diets of high, medium or low levels of protein or carbohydrates (HPLC, MPMC and LPHC, respectively) on LC3-II and its upstream factors Akt, FoxO1, TOR and AMPK. The obtained results demonstrated that macronutrient composition of the diet may affect the autophagosomal response to feeding. More specifically, we observed that

LC3-II levels in the muscle of rainbow trout were not inhibited by refeeding when the proteins/carbohydrates ratio was severely decreased. These results are in close agreement with previous data in mice showing that feeding a protein deficient diet for several months activates autophagy [39–41]. However, here we demonstrate that, at least in rainbow trout, this effect occurs as early as the first day of feeding.

In order to clarify the specific and combined role of amino acids and glucose in the observed effect of macronutrient composition of the diet on LC3-II processing, primary cultures of trout muscle cells were incubated with or without amino acids and glucose. The obtained results showed that addition of amino acids in cell culture medium inhibited the formation of autophagosome. These results are in good agreement with previous evidences demonstrating that autophagosome formation is under the control of amino acid

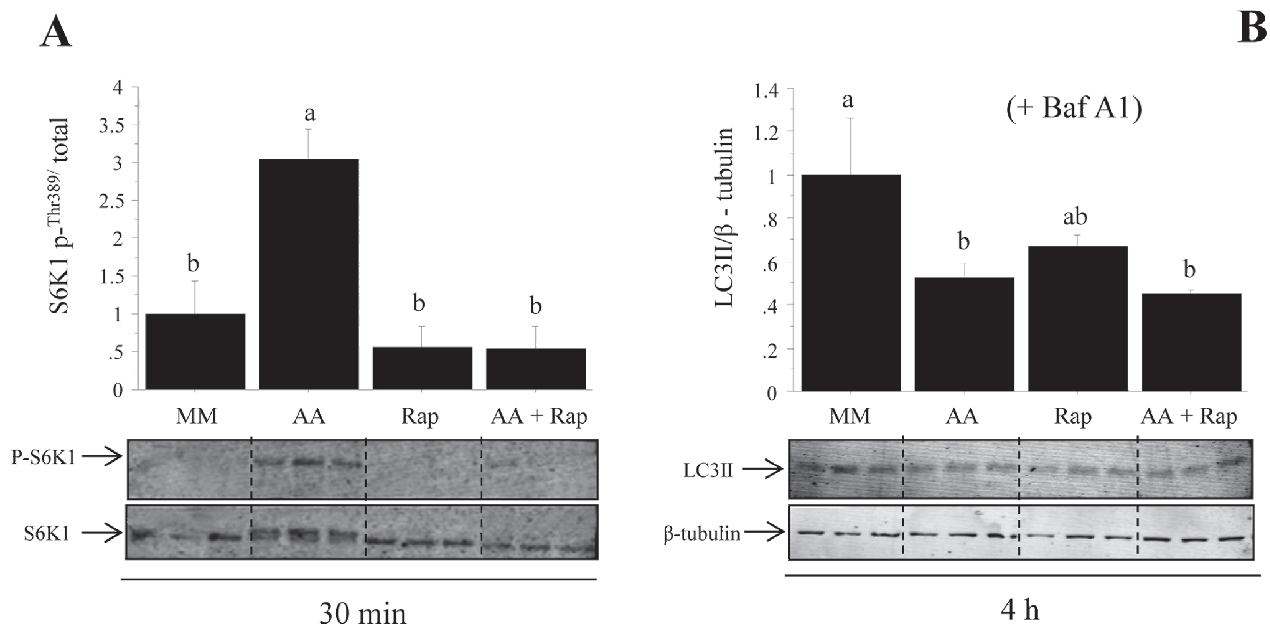


Figure 6. Effect of AA with or without rapamycin on S6K1 phosphorylation and LC3 lipidation in trout muscle cell culture. Four-day-old cells were preincubated for 30 min with or without 100 nM rapamycin. The culture mediums were then replaced for 30 min or 4 h with the amino acid free medium (minimal medium group, MM and rapamycin group Rap) or a medium containing amino acids (amino acids group AA and amino acids plus rapamycin group AA-Rap) with or without Bafilomycine A1 (Baf A1). Cell lysates (10 μ g) were analyzed by western blot with the indicated antibodies. Graphs represent the ratio between the phosphorylated protein and the total amount of S6K1 (A) and the ratio between LC3-II and β -tubulin (B). Results are means \pm SE, n=6 (mean of 2 replications). Different letters represent significantly different values ($p < 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0074308.g006

availability [35,42–47], and suggest that the reduction of protein proportion in MPMC and LPHC diets likely contribute to attenuate the refeeding inhibition of LC3-II lipidation. The unexpected stimulatory effect of glucose on LC3-II processing in our *in vitro* trial is another point worthy of attention. Indeed, most studies demonstrated that glucose deprivation (and not addition) induces the autophagic/lysosomal pathway in mammalian cells [48,49]. The only findings associating elevated glucose levels with induction of autophagy concerned the hyperglycemia-associated induction of autophagy in diabetic models [50,51]. Interestingly, rainbow trout is considered to be glucose intolerant, and is characterized by a prolonged hyperglycemia following a glucose load or carbohydrate-rich meal [52]. The induction of LC3-II levels observed after glucose addition in cell culture media could therefore be a consequence of the specificity of the metabolism of the studied species. Furthermore, this effect could also contribute to the lack of MPMC- and LPHC-induced autophagosome formation arrest.

It has been proposed that the control of autophagy might involve TOR and AMPK signaling proteins [16,17,53]. In our experiment, we observed that the phosphorylation of the TOR effector S6K1 was increased when the levels of dietary proteins were augmented, a nutritional condition leading to a decrease of autophagy. In line with these results, our *in vitro* study demonstrated that treatment of trout myoblasts with the TOR inhibitor rapamycin impairs the AA mediated inhibition of autophagy. The inhibitory function of TOR in autophagy is well established for several tissues and cell culture systems [16,54]. Genetic and pharmacological studies have shown that inhibition of TOR triggers activation of autophagy [55]. However, Sandri and co-workers demonstrated that the translation of these findings to skeletal muscle did not result in similar conclusion at least in mammals [2]. They demonstrated that TOR signaling is not the

major regulator of autophagic flux in muscle and identified the Akt-FoxO pathway as a more critical signaling axis for autophagy control in this tissue [18,19,56]. In contrast, very recently Castets et al showed that sustained activation of TOR activity led to the development of a late-onset myopathy related to impaired autophagy, despite increased FoxO3 activity [57]. They concluded that TOR is the dominant regulator of autophagy in skeletal muscle. Our results show that rapamycin treatment of trout myoblasts prevents the AA mediated inhibition of autophagy, tipping the scales in favour of an important role of TOR in the regulation of autophagy in trout muscle.

Less is known about the mechanisms involved in the glucose-induced autophagy. In mammals, AMPK has been reported to play an important role in the regulation by glucose availability of autophagosome formation [17]. In the present study, we did not observe any significant change of the phosphorylation of AMPK in the tested conditions, excluding a possible involvement of this protein in the observed regulation of autophagy. However, the experimental conditions tested in the present study (5 mM glucose *vs* 25 mM glucose) are different to those showing the involvement of AMPK in the autophagic process that proceeded to a complete starvation of glucose [17]. Another hypothesis of the observed effect could be related to the oxidative stress generated by high glucose concentration [58]. Under these oxidative stress conditions, autophagy could constitute an adaptive pathway that promotes cell survival through the elimination of damaged proteins and organelles. In this regard, it has been shown in diabetic mammalian models that hyperglycemia-associated oxidative stress induces autophagy in several cell types [50,59]. However, the mechanism involved in these effects remains largely unknown.

Conclusion and Physiological Significances

In conclusion, the present results demonstrated that proteins/carbohydrates ratio of the diet affects the feeding-mediated down regulation of autophagy in muscle of rainbow trout. More specifically, we show that autophagosomal formation in the muscle of this species was not inhibited by refeeding when the proteins/carbohydrates ratio was severely decreased. One of the consequences of these results could be the observed prolonged hyperglycemia in trout fed high carbohydrates diets. Indeed, recent findings demonstrated that autophagy makes a significant contribution to the maintenance of blood glucose by converting amino acids to glucose via gluconeogenesis [60]. A lack of autophagy inhibition in trout fed high carbohydrates diet could therefore result in a prolonged release of gluconeogenic amino acids leading to the observed hyperglycemia. However, further studies are warranted to verify this hypothesis.

Overall, these results highlight the interest of the carnivorous rainbow trout as a model to gain better understanding of nutritional regulation of autophagy and the related consequences at physiological levels, especially in regard to its unusual metabolic

features (i.e., a high dietary protein requirement, an important use of amino acids as energy sources, an apparent inability to metabolise dietary carbohydrates). From a practical aquaculture point of view, this study has additional importance as it will undoubtedly contribute to a better understanding of the nutritional regulation of a main degradative system in muscle and will provide a framework for future investigations in farmed fish species.

Acknowledgments

We acknowledge A. Herman for technical assistance as well as technical staff at the fish farm (F. Vallée, F. Terrier, Y. Hontang, F. Sandres, P. Maunas, N. Turonnet and Y. Mercier).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: IB SP SSC IS. Performed the experiments: IB BS KD. Analyzed the data: IB SP IS. Wrote the paper: IB SP IS. Primary responsibility for final content: IS. Read and approved the final manuscript: IS IB SP BS KD SSC.

References

- Hershko A, Ciechanover A, Varshavsky A (2000) Basic Medical Research Award. The ubiquitin system. *Nat Med* 6: 1073–1081.
- Sandri M (2010) Autophagy in skeletal muscle. *FEBS Lett* 584: 1411–1416.
- Attaix D, Taillandier D (1998) The critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in muscle wasting in comparison to lysosomal and Ca²⁺-dependent systems. In: Bittar EE RA, editors, editor. *Advances in molecular and cell biology*. Stamford (CT): Jai Press. 235–266.
- Jagoe RT, Goldberg AL (2001) What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? *Curr Opin Clin Nutr* 4: 183–190.
- Kumamoto T, Fujimoto S, Ito T, Horinouchi H, Ueyama H, et al. (2000) Proteasome expression in the skeletal muscles of patients with muscular dystrophy. *Acta Neuropathol (Berl)* 100: 595–602.
- Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, Goldberg AL (1999) Muscle Protein Breakdown and the Critical Role of the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Normal and Disease States. *J Nutr* 129: 227S–237S.
- Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, et al. (2004) Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J* 18: 39–51.
- Masiero E, Agatea L, Mammucari C, Blaauw B, Loro E, et al. (2009) Autophagy Is Required to Maintain Muscle Mass. *Cell Metab* 10: 507–515.
- Cuervo AM, Maccian F (2012) Autophagy, nutrition and immunology. *Mol Aspects Med* 33: 2–13.
- Chen Y, Klionsky DJ (2011) The regulation of autophagy – unanswered questions. *J Cell Sci* 124: 161–170.
- Klionsky DJ, Abdalla F, Abeliovich H, Abraham R, Acevedo-Arozena A, et al. (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8: 445–554.
- Codogno P, Meijer AJ (2005) Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* 12: 1509–1518.
- Mizushima N, Klionsky DJ (2007) Protein Turnover Via Autophagy: Implications for Metabolism. *Annu Rev Nutr* 27: 19–40.
- Ravikumar B, Futter M, Jahreis L, Korolchuk VI, Lichtenberg M, et al. (2009) Mammalian macroautophagy at a glance. *J Cell Sci* 122: 1707–1711.
- Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y (2004) In Vivo Analysis of Autophagy in Response to Nutrient Starvation Using Transgenic Mice Expressing a Fluorescent Autophagosomal Marker. *Mol Biol Cell* 15: 1101–1111.
- Jung CH, Ro S-H, Cao J, Otto NM, Kim D-H (2010) mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* 584: 1287–1295.
- Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 13: 132–141.
- Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, et al. (2007) FoxO3 Coordinately Activates Protein Degradation by the Autophagic/Lysosomal and Proteasomal Pathways in Atrophying Muscle Cells. *Cell Metab* 6: 472–483.
- Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, et al. (2007) FoxO3 Controls Autophagy in Skeletal Muscle In Vivo. *Cell Metab* 6: 458–471.
- Vingtreux V, Chandakkar P, Zhao H, d'Abramo C, Davies P, et al. (2011) Novel synthetic small-molecule activators of AMPK as enhancers of autophagy and amyloid- β peptide degradation. *The FASEB Journal* 25: 219–231.
- Herrero-Martin G, Hoyer-Hansen M, Garcia-Garcia C, Fumarola C, Farkas T, et al. (2009) TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells. *EMBO J* 28: 677–685.
- Meley D, Bauvy C, Houben-Weerts JHPM, Dubbelhuis PF, Helmond MTJ, et al. (2006) AMP-activated Protein Kinase and the Regulation of Autophagic Proteolysis. *J Biol Chem* 281: 34870–34879.
- Liang J, Shao SH, Xu Z-X, Hennessy B, Ding Z, et al. (2007) The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27kip1 phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol* 9: 218–224.
- Seiliez I, Gutierrez J, Salmerón C, Skiba-Cassy S, Chauvin C, et al. (2010) 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.
- Seiliez I, Gabillard J-C, Riñlade M, Sadoul B, Dias K, et al. (2012) Amino acids downregulate the expression of several autophagy-related genes in rainbow trout myoblasts. *Autophagy* 8: 364–375.
- Moore S (1968) Amino Acid Analysis: Aqueous Dimethyl Sulfoxide As Solvent for the Ninhydrin Reaction. *J Biol Chem* 243: 6281–6283.
- Seiliez I, Gabillard J-C, Skiba-Cassy S, Garcia-Serrana D, Gutiérrez J, et al. (2008) An in vivo and in vitro assessment of TOR signaling cascade in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R329–R335.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
- Seiliez I, Panserat S, Skiba-Cassy S, Polakof S (2011) Effect of acute and chronic insulin administrations on major factors involved in the control of muscle protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol* 172: 363–370.
- Polakof S, Panserat S, Craig PM, Martyres DJ, Plagnes-Juan E, et al. (2011) The Metabolic Consequences of Hepatic AMP-Kinase Phosphorylation in Rainbow Trout. *PLoS ONE* 6: e20228.
- Kamalam BS, Medale F, Kaushik S, Polakof S, Skiba-Cassy S, et al. (2012) Regulation of metabolism by dietary carbohydrates in two lines of rainbow trout divergently selected for muscle fat content. *J Exp Biol* 215: 2567–2578.
- Moruno-Manchón JF, Pérez-Jiménez E, Knecht E (2013) Glucose induces autophagy under starvation conditions by a p38 MAPK-dependent pathway. *Biochem J* 449: 497–506.
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, et al. (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441: 885–889.
- Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikosoto S, et al. (2007) The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med* 13: 619–624.
- Mortimore GE, Poso AR (1987) Intracellular Protein Catabolism and its Control During Nutrient Deprivation and Supply. *Annu Rev Nutr* 7: 539–568.
- Seiliez I, Panserat S, Skiba-Cassy S, Fricot A, Vachot C, et al. (2008) Feeding Status Regulates the Polyubiquitination Step of the Ubiquitin-Proteasome-Dependent Proteolysis in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Muscle. *J Nutr* 138: 487–491.
- Kee AJ, Combaret L, Tilgnaç T, Souweine B, Aouroussau E, et al. (2003) Ubiquitin-proteasome-dependent muscle proteolysis responds slowly to insulin release and refeeding in starved rats. *J Physiol (Lond)* 546: 765–776.
- Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, et al. (2005) Growth Factor Regulation of Autophagy and Cell Survival in the Absence of Apoptosis. *Cell* 120: 237–248.

39. Grumati P, Coletto L, Sabatelli P, Cescon M, Angelin A, et al. (2010) Autophagy is defective in collagen VI muscular dystrophies, and its reactivation rescues myofiber degeneration. *Nat Med* 16: 1313–1320.
40. De Palma C, Morisi F, Cheli S, Pambianco S, Cappello V, et al. (2012) Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Death Dis* 3: e418.
41. Grumati P, Coletto L, Sandri M, Bonaldo P (2011) Autophagy induction rescues muscular dystrophy. *Autophagy* 7: 426–428.
42. Mordier S, Deval C, Béchet D, Tassa A, Ferrara M (2000) Leucine Limitation Induces Autophagy and Activation of Lysosome-dependent Proteolysis in C2C12 Myotubes through a Mammalian Target of Rapamycin-independent Signaling Pathway. *J Biol Chem* 275: 29900–29906.
43. Tassa A, Roux MP, Attaix D, Bechet DM (2003) Class III phosphoinositide 3-kinase–Beclin1 complex mediates the amino acid-dependent regulation of autophagy in C2C12 myotubes. *Biochem J* 376: 577–586.
44. Yabu T, Imamura S, Mizusawa N, Touhata K, Yamashita M (2012) Induction of Autophagy by Amino Acid Starvation in Fish Cells. *Mar Biotechnol* 14: 491–501.
45. Martinet W, Meyer GY, Herman A, Kockx M (2005) Amino Acid Deprivation Induces Both Apoptosis and Autophagy in Murine C2C12 Muscle Cells. *Biotechnology Letters* 27: 1157–1163.
46. Ghislat G, Patron M, Rizzuto R, Knecht E (2012) Withdrawal of Essential Amino Acids Increases Autophagy by a Pathway Involving Ca²⁺/Calmodulin-dependent Kinase Kinase- β (CaMKK- β). *J Biol Chem* 287: 38625–38636.
47. Munafó DB, Colombo MI (2001) A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *J Cell Sci* 114: 3619–3629.
48. Duan X, Ponomareva L, Veeranki S, Choubey D (2011) IFI16 Induction by Glucose Restriction in Human Fibroblasts Contributes to Autophagy through Activation of the ATM/AMPK/p53 Pathway. *PLoS ONE* 6: e19532.
49. Kobayashi S, Xu X, Chen K, Liang Q (2012) Suppression of autophagy is protective in high glucose-induced cardiomyocyte injury. *Autophagy* 8: 577–592.
50. Yan J, Feng Z, Liu J, Shen W, Wang Y, et al. (2012) Enhanced autophagy plays a cardinal role in mitochondrial dysfunction in type 2 diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats: ameliorating effects of (–)-epigallocatechin-3-gallate. *J Nutr Biochem* 23: 716–724.
51. Lee Y, Kim J-H, Hong Y, Lee S-R, Chang K-T, et al. (2012) Prophylactic effects of swimming exercise on autophagy-induced muscle atrophy in diabetic rats. *Lab Anim Res* 28: 171–179.
52. Moon TW (2001) Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 129: 243–249.
53. Rabinowitz JD, White E (2010) Autophagy and Metabolism. *Science* 330: 1344–1348.
54. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, et al. (2009) Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1–Atg13–FIP200 Complex Required for Autophagy. *Mol Biol Cell* 20: 1981–1991.
55. Meléndez A, Neufeld TP (2008) The cell biology of autophagy in metazoans: a developing story. *Development* 135: 2347–2360.
56. Mammucari C, Schiaffino S, Sandri M (2008) Downstream of Akt: FoxO3 and mTOR in the regulation of autophagy in skeletal muscle. *Autophagy* 4: 524–526.
57. Castets P, Lin S, Rion N, Di Fulvio S, Romanino K, et al. (2013) Sustained Activation of mTORC1 in Skeletal Muscle Inhibits Constitutive and Starvation-Induced Autophagy and Causes a Severe, Late-Onset Myopathy. *Cell Metab* 17: 731–744.
58. Kawahito S, Kitahata H, Oshita S (2009) Problems associated with glucose toxicity: Role of hyperglycemia-induced oxidative stress. *World J Gastroenterol* 15: 4137–4142.
59. Kaniuk NA, Kiraly M, Bates H, Vranic M, Volchuk A, et al. (2007) Ubiquitinated-Protein Aggregates Form in Pancreatic β -Cells During Diabetes-Induced Oxidative Stress and Are Regulated by Autophagy. *Diabetes* 56: 930–939.
60. Ezaki J, Matsumoto N, Takeda-Ezaki M, Komatsu M, Takahashi K, et al. (2011) Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels. *Autophagy* 7: 727–736.

PUBLICATION 2

2-Effet d'une carence ou d'un excès en méthionine dans l'aliment sur les déterminants majeurs de l'autophagie et du renouvellement des protéines musculaires dans le muscle de truite arc-en-ciel

Objectifs

Après avoir démontré l'implication des acides aminés dans la régulation de l'autophagie musculaire chez la truite arc-en-ciel, nous nous sommes intéressés à **l'effet d'un déséquilibre alimentaire en un seul acide aminé (la méthionine) sur, non seulement, l'autophagie mais également les principaux facteurs du renouvellement des protéines musculaires**. Le choix de la méthionine dans cette étude s'inscrit dans le contexte de la durabilité de l'aquaculture. En effet, l'impératif d'une aquaculture durable conduit à orienter l'alimentation des poissons vers la substitution de la farine de poisson par des produits végétaux renouvelables (Naylor et al., 2009). Or, ce remplacement est souvent limité par des niveaux trop faibles en méthionine dans les matières premières végétales utilisées (comme par exemple les légumineuses). Ainsi la supplémentation en méthionine de ces nouveaux régimes à base végétale améliore la croissance de différentes espèces de poissons, mais l'excès peut inversement affecter négativement la croissance (Jackson and Capper, 1982; Mambrini et al., 1999; Rumsey et al., 1983). L'acquisition d'une meilleure connaissance du rôle de cet acide aminé ainsi que des mécanismes de son utilisation par les poissons permettrait ainsi de mieux concevoir les changements induits par ces nouveaux profils alimentaires sur le développement et la croissance des poissons d'intérêt aquacole. Afin de répondre à cet objectif, des truites arc-en-ciel ont été élevées pendant six semaines avec des régimes carencés (déficient, DEF), équilibrés (Adéquat, ADQ) ou présentant un excès (EXC) en méthionine (Tableau 1 de l'article n°2), puis l'état d'activation des déterminants majeurs de l'autophagie et du renouvellement des protéines musculaires a été analysé chez les différents groupes de poissons.

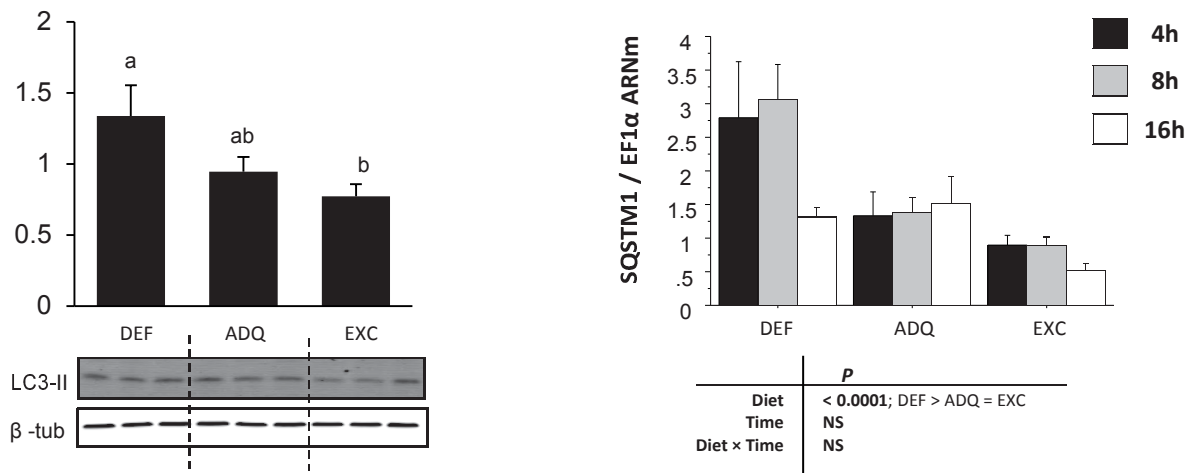


Figure 15: Effet d'un déséquilibre en méthionine alimentaire sur le taux de LC3-II et l'expression de SQSTM1 dans le muscle de truite.

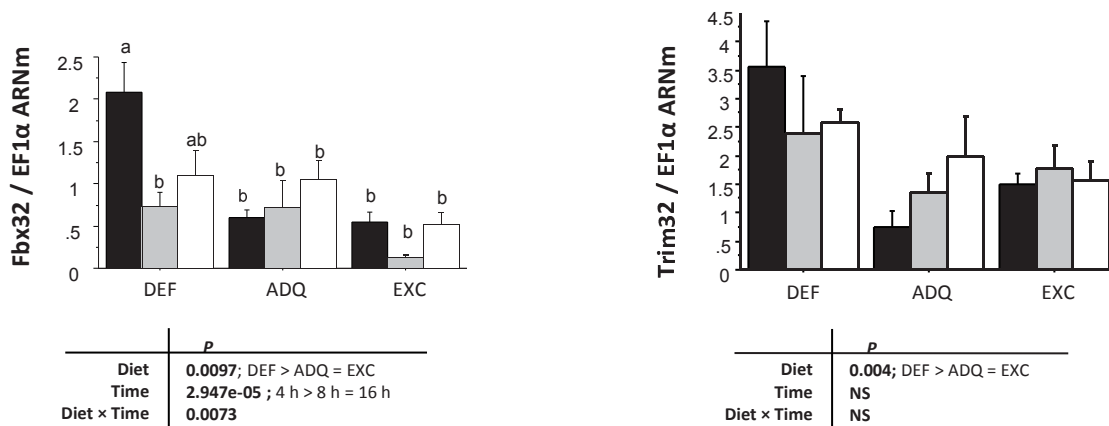


Figure 16: Effet d'un déséquilibre en méthionine alimentaire sur l'expression des gènes du système ubiquitine protéasome (*Fbx32* et *Trim32*) dans le muscle de truite.

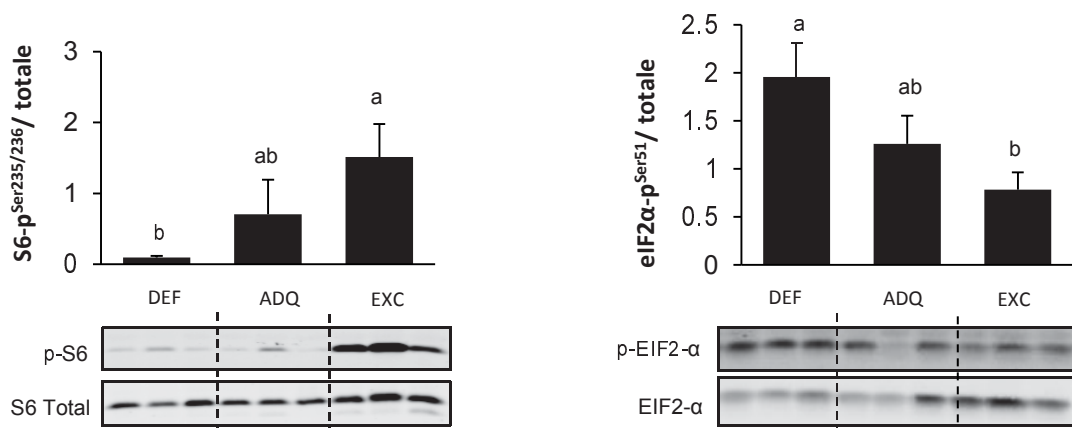


Figure 17: Effet d'un déséquilibre en méthionine alimentaire sur le niveau de phosphorylation de S6 et eIF2α dans le muscle de truite.

Principaux résultats et conclusions

Les résultats obtenus indiquent qu'une carence en méthionine alimentaire induit un retard de croissance lié principalement à une moins bonne efficacité alimentaire, confirmant des études antérieures chez la truite arc-en-ciel (Cowey et al., 1992; Kim et al., 1992; Mambrini et al., 1999; Rumsey et al., 1983).

Ce retard de croissance chez les poissons carencés en méthionine s'accompagne d'une induction du niveau des protéines LC3-II et Becline1 ainsi que de l'expression de gènes codant pour des protéines de l'autophagie (*Atg4b*, *SQSTM1* et *Mull*) (Figure 15). Ces derniers résultats semblent étroitement liés à l'induction de la phosphorylation de la protéine eIF2 α , reconnue comme un acteur important dans la régulation de l'expression des gènes étudiés (B'chir et al., 2014; B'chir et al., 2013). Bien que le rôle des acides aminés (en particulier de la leucine) dans le processus autophagique a largement ait démontré *in vitro* (Mordier et al., 2000; Sheen et al., 2011), à notre connaissance, aucun résultat n'avait encore été publié sur l'effet d'une carence alimentaire en un acide aminé dans l'activation de cette voie catabolique.

Outre le système autophagie-lysosomal, la voie ubiquitine-protéasomale joue également un rôle déterminant dans la dégradation des protéines musculaires (Lecker et al., 2004; Lecker et al., 1999). C'est un processus ATP-dépendant, qui implique une cascade de réactions enzymatiques responsables de la liaison d'un substrat à des chaînes d'ubiquitines nécessaire à son acheminement vers le protéasome 26S. Ce dernier est responsable de la dégradation intracellulaire des protéines. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'expression de certains gènes dont la régulation est décrite comme une étape critique de contrôle de ce système protéolytique (Bodine et al., 2001; Glass, 2010). Nous nous sommes particulièrement intéressés aux gènes *fbx32*, *murf1*, *murf2*, *murf3* et *trim32* codant pour des ubiquitine E3 ligases et au gène *znf216* codant pour une protéine impliquée dans la reconnaissance des protéines ubiquitinées destinées à la dégradation protéasomale. Les résultats obtenus montrent une induction significative du niveau des ARNm de *fbx32*, *murf2* et *trim32* chez les poissons carencés en méthionine (DEF) par rapport aux poissons ADQ (Figure 16). En outre, mis à part *murf1*, l'ensemble des gènes étudiés présentait une expression significativement plus élevée chez les poissons DEF par rapport aux poissons EXC. Ces données sont en accord avec des résultats antérieurs obtenus *in vitro* sur des cellules aviaires QT6 montrant que la disponibilité en méthionine contrôle le taux d'ARNm

de *fbx32* (Tesseraud et al., 2007). Par contre, à notre connaissance, aucun résultat n'avait encore été publié quant à l'effet des acides aminés sur l'expression de *trim32* et *znf216*.

Enfin, la masse musculaire étant déterminée par l'équilibre entre la protéolyse et la protéosynthèse, nous avons également porté une attention particulière à l'activation de déterminants majeurs de l'initiation de la traduction des ARNm en protéines, considérés comme l'étape limitante de la synthèse protéique. Les résultats obtenus montrent une inhibition de l'activation des protéines S6 et eIF2 α (Figure 17) chez les poissons carencés en méthionine, contribuant probablement à la baisse de croissance observée chez ces animaux.

En conclusion, l'ensemble de ces données indiquent que la machinerie autophagosomale mais également les principaux facteurs du renouvellement des protéines musculaires sont sensibles aux variations de teneur en méthionine de l'aliment. Elles démontrent que l'équilibre entre la protéolyse (et en particulier l'autophagie) et la protéosynthèse est sensible à de fines variations de la qualité nutritionnelle et que la réponse qui en résulte peut fortement affecter la croissance.



Dietary methionine availability affects the main factors involved in muscle protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Ikram Belghit, Sandrine Skiba-Cassy, Inge Geurden, Karine Dias, Anne Surget, Sadasivam Kaushik, Stéphane Panserat and Iban Seiliez*

INRA, UR1067 Nutrition Métabolisme Aquaculture, F-64310 St-Pée-sur-Nivelle, France

(Submitted 15 January 2014 – Final revision received 23 April 2014 – Accepted 30 April 2014 – First published online 30 May 2014)

Abstract

Methionine is a limiting essential amino acid in most plant-based ingredients of fish feed. In the present study, we aimed to determine the effect of dietary methionine concentrations on several main factors involved in the regulation of mRNA translation and the two major proteolytic pathways (ubiquitin–proteasome and autophagy–lysosomal) in the white muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The fish were fed for 6 weeks one of the three isonitrogenous diets providing three different methionine concentrations (deficient (DEF), adequate (ADQ) and excess (EXC)). At the end of the experiment, the fish fed the DEF diet had a significantly lower body weight and feed efficiency compared with those fed the EXC and ADQ diets. This reduction in the growth of fish fed the DEF diet was accompanied by a decrease in the activation of the translation initiation factors ribosomal protein S6 and eIF2 α . The levels of the main autophagy-related markers (LC3-II and beclin 1) as well as the expression of several autophagy genes (*atg4b*, *atg12l*, *Uvrag*, *SQSTM1*, *Mul1* and *Bnip3*) were higher in the white muscle of fish fed the DEF diet. Similarly, the mRNA levels of several proteasome-related genes (*Fbx32*, *MuRF2*, *MuRF3*, *ZNF216* and *Trim32*) were significantly up-regulated by methionine limitation. Together, these results extend our understanding of mechanisms regulating the reduction of muscle growth induced by dietary methionine deficiency, providing valuable information on the biomarkers of the effects of low-fishmeal diets.

Key words: Fish: Dietary methionine: Muscle growth: Proteolysis: Protein synthesis

Global seafood consumption, currently estimated to be 100 million tonnes, is expected to increase by another 65 million tonnes by the year 2030. Aquaculture already makes a significant contribution to this seafood supply, and this is growing at an annual rate close to 6%⁽¹⁾. Most farmed teleost fish are adapted to use amino acids as the preferred energy source over carbohydrates and thus require high levels of dietary proteins (300–600 g/kg)⁽²⁾, with fishmeal being the major protein source in aquaculture. The sustainability of this practice, which requires large inputs of wild fish for feed preparation, has been questioned⁽³⁾. Thus, the replacement of fishmeal as the major protein source with proteins of plant origin is a major objective for sustainable aquaculture in the future. Progress has been made on the replacement of fishmeal with a number of alternative protein sources of plant origin (oil seeds, cereal proteins and pulses)^(4–7). However, the replacement of fishmeal with plant proteins is often limited by methionine concentrations. In this context, supplementation of plant-based diets with

synthetic methionine has been shown to optimise the nutritional value of these diets containing alternative proteins, with dietary methionine having a significant effect on growth performance and protein deposition in different fish species^(8–11). Given that muscle protein accretion is the major aim of aquaculture, the optimisation of dietary methionine supply requires precise knowledge of the role of this sulphur amino acid, especially in the muscle.

For optimising methionine nutrition, the different roles of this amino acid need to be considered. Methionine is an indispensable amino acid for the normal growth of most animals. This sulphur amino acid is a component of tissue proteins and therefore serves as a building block for protein synthesis. Decreased growth in chicks or mammals fed methionine-free diets has thus been reported to be primarily caused by lower rates of whole-body protein synthesis associated with lower mRNA translational efficiency⁽¹²⁾. These findings are in agreement with the specific and well-known role of

Abbreviations: 4E-BP1, 4E binding protein 1; ADQ, methionine adequate; cDNA, complementary DNA; DEF, methionine deficient; eIF2 α , eukaryotic translation initiation factor 2 α ; EXC, methionine excess; *Fbx32*, F-box protein 32; INRA, Institut National de la Recherche Agronomique; LC3, microtubule-associated protein light chain 3; *MuRF1*, -2, -3, muscle RING finger 1, -2, -3; *SQSTM1*, sequestosome 1; TORC1, target of rapamycin complex 1.

* **Corresponding author:** I. Seiliez, fax +33 5 59 54 51 52, email seiliez@st-pee.inra.fr

methionine in mRNA translation as the primary amino acid needed to initiate protein synthesis⁽¹³⁾. However, there is evidence that this amino acid not only affects muscle growth as a substrate for protein synthesis but may also modulate several intracellular signalling pathways involved in the regulation of mRNA translation and the two major proteolytic pathways (ubiquitin–proteasome and autophagy-lysosomal). More precisely, methionine availability has been reported to regulate the target of rapamycin complex 1 (TORC1) signalling pathway and protein synthesis in avian QM7 myoblasts⁽¹⁴⁾ and the expression of the proteasomal gene F-box protein 32 (*Fbx32*, also known as atrogen-1 or *MAFbx*) in quail QT6 cells⁽¹⁵⁾. Similarly, the eukaryotic translation initiation factor 2 α /activating transcription factor 4 (eIF2 α /ATF4) pathway has recently been shown to direct an autophagy gene transcriptional programme in response to methionine starvation in mouse embryonic fibroblast cells⁽¹⁶⁾. This amino acid could thus act as a regulator of muscle growth in the same manner as certain hormones (e.g. insulin and insulin-like growth factor 1) in accordance with the concept of ‘nutrient signal’ developed over the last 10 years for amino acids such as leucine^(17–21).

Several studies have demonstrated that supplementation of methionine in diets rich in plant proteins can improve the growth response of many fish species^(8,22,23). To gain more knowledge on the influence of methionine intake on growth and nutrient accretion, several groups have investigated the effect of graded concentrations of methionine in the diet on the hepatic metabolism of fish^(24–29). The results of our previous study on rainbow trout hepatocytes have revealed that methionine availability controls the activation of the TORC1 intracellular signalling pathway as well as the expression of several metabolism-related genes in this species⁽²⁷⁾. These data suggest that the signalling role of methionine is well conserved between lower and higher vertebrates. However, until now, no data are available on the specific role of this amino acid in the molecular control of muscle growth in any fish species. As muscle protein synthesis rates are low in fish despite the high efficiency of protein deposition, it is considered essential to gain full insight into the protein degradation pathways⁽³⁰⁾. The aim of the present study was to determine the effect of diets that differ in methionine concentrations on the mechanisms involved in muscle protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). More specifically, we investigated the effect of dietary methionine deficiency or excess on several main factors involved in the regulation of mRNA translation and the two major muscle proteolytic pathways (ubiquitin–proteasome and autophagy-lysosomal).

Materials and methods

The present experiment was carried out in accordance with the EU legal frameworks, specifically those related to the protection of animals used for scientific purposes (i.e. Directive 2010/63/EU), and under the French legislation governing the ethical treatment of animals (Decret no. 2001-464, 29 May 2001). The investigators carrying out the experiment had ‘level 1’ or ‘level 2’ certification, bestowed by the Direction Départementale des Services Vétérinaires (French veterinary

services) to carry out animal experiments (Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) 2002-36, 14 April 2002).

Feeding trial and experimental procedures

Sexually immature rainbow trout (*O. mykiss*) having a mean initial weight of 40 g were reared in our experimental fish farm facilities (INRA, Donzacq, France) in a flow-through rearing system supplied with natural spring water (17°C) under natural photoperiod during the months of December–January. The fish were distributed into nine circular tanks (300 litres; three tanks per diet; thirty eight fish/tank). Triplicate groups of trout were fed for 6 weeks with one of the three isonitrogenous extruded diets manufactured in our experimental facilities of Donzacq, France (Table 1). The diets differed only in dietary methionine concentrations: deficient (DEF); adequate (ADQ); excess (EXC). The adequate concentration (0.82 g methionine or 1.25 g total sulphur amino acids methionine+cysteine per 100 g diet) corresponds to the requirement value for rainbow trout (NRC, 2011).

Table 1. Ingredients and analytical composition of the diets

	DEF	ADQ	EXC
Ingredients (%)			
Fish protein concentrate*	6.0	6.0	6.0
Soyabean protein concentrate†	30	30	30
Whole wheat‡	8.5	8.5	8.5
Met-devoid free amino acid blend	10.0	9.7	9.3
D-L-Met§	0.0	0.3	0.7
Gelatinised starch	13.5	13.5	13.5
Fish oil¶	15	15	15
Cellulose**	7.9	7.9	7.9
Deoiled soya lecithin††	2.0	2.0	2.0
CaHPO ₄ ·2H ₂ O	3.0	3.0	3.0
Mineral premix‡‡	2.0	2.0	2.0
Vitamin premix§§	2.0	2.0	2.0
Analytical composition (%)			
DM	94.7	94.1	94.8
Crude protein (% DM)	39.5	39.7	39.7
Met (% DM)	0.56	0.82	1.25
Cys (% DM)	0.47	0.43	0.47
Lipids (% DM)	20.3	20.8	20.3
Energy (kJ/g DM)	22.7	22.9	22.8
NFE (% DM)	17.4	17.7	18.1

DEF, methionine deficient; ADQ, methionine adequate; EXC, methionine excess; NFE, N-free extract.

* CPSP-90 (Sopropeche).

† Estril 75 (Sopropeche).

‡ Sudouest aliment (Pomarez).

§ Evonik.

|| Roquette.

¶ Sopropeche.

** Rettenmaier & Sohne.

†† Louis François.

‡‡ Mineral premix (g or mg/kg diet): calcium carbonate (40% Ca), 2.15 g; magnesium oxide (60% Mg), 1.24 g; ferric citrate, 0.2 g; potassium iodide (75% I), 0.4 mg; zinc sulphate (36% Zn), 0.4 g; copper sulphate (25% Cu), 0.3 g; manganese sulphate (33% Mn), 0.3 g; dibasic calcium phosphate (20% Ca, 18% P), 5 g; cobalt sulphate, 2 mg; sodium selenite (30% Se), 3 mg; KCl, 0.9 g; NaCl, 0.4 g (UPAE, INRA).

§§ Vitamin premix (μ g or mg/kg diet): D-L- α -tocopherol acetate, 60 mg; sodium menadione bisulphate, 5 mg; retinyl acetate, 4.5 mg; D-L-cholecalciferol, 375 μ g; thiamin, 15 mg; riboflavin, 30 mg; pyridoxine, 15 mg; B₁₂, 0.05 mg; nicotinic acid, 175 mg; folic acid, 500 mg; inositol, 1000 mg; biotin, 2.5 mg; calcium pantothenate, 50 mg; choline chloride, 2000 mg (UPAE, INRA).

||| NFE (carbohydrate): 100% (crude protein% + crude fat% + crude fibre% + moisture% + ash%).

The concentration of cysteine was maintained constant at 0.45 g cysteine per 100 g of diet. Each diet was distributed by hand to visual satiation (two meals/d, at 08.00–09.00 and 16.00–17.00 hours), and feed consumption was recorded per tank. To follow growth and feed utilisation, the fish were counted and group-weighted at the start and end of the experiment.

Individual body mass was calculated as the final biomass divided by the number of fish in each tank. Daily growth coefficient was calculated as $100 \times (\text{mean final body mass}^{1/3} - \text{mean initial body mass}^{1/3})/\text{d}$. Daily feed intake was calculated as $100 \times$ the total amount of ingested food (kg) divided by the mean biomass over the experimental period ((initial biomass + final biomass)/2, expressed as kg wet mass) and the number of days. Feed efficiency was estimated as the gain in total biomass ((final biomass – initial biomass) (kg wet mass)) divided by the amount of ingested DM (kg DM) (Table 2).

At the end of the feeding trial, three fish were anaesthetised with benzocaine solution (30 mg/l water) and sampled from each tank at 4, 8 and 16 h after feeding the last meal. The fish were killed by a sharp blow to the head. The gut content of the sampled fish was systematically checked to ensure that the fish sampled had effectively consumed the diet. A sample of laterodorsal white muscle collected from each fish was dissected, snap-frozen in liquid N₂ and then stored at –80°C before further mRNA and protein analyses.

Chemical composition of the diets

The chemical composition of the diets was determined as follows: (1) DM was determined after drying at 105°C for 24 h; (2) protein content (N content \times 6.25) was determined using the Kjeldahl method after acid digestion; (3) fat content was determined by petroleum diethyl ether extraction (Soxtherm); (4) gross energy content was determined in an adiabatic bomb calorimeter (IKA). Dietary amino acid concentrations were determined after hydrolysis with 6 M-HCl for 24 h at 110°C and quantified by ion exchange chromatography with post-column derivatisation with ninhydrin⁽³¹⁾.

Protein extraction and Western blot analyses

The muscle samples of fish sampled at 4 h after feeding the last meal (300 mg) were homogenised on ice using an

ULTRA-TURRAX homogeniser (IMLAB Sarl). During homogenisation, the samples were kept in 2 ml of buffer containing 150 mM-NaCl, 10 mM-Tris, 1 mM-ethylene glycol tetraacetic acid, 1 mM-EDTA, 100 mM-sodium fluoride, 4 mM-sodium pyrophosphate, 2 mM-sodium orthovanadate, 1% Triton X-100, 0.5% Nonidet P-40/IGEPAL and a protease inhibitor cocktail (Roche). The homogenates were centrifuged at 1000 g for 15 min at 4°C, and the supernatants were then centrifuged for 30 min at 20 000 g. The resulting supernatants (*n* 6 per time point) were stored at –80°C. Protein concentrations were determined using the Bradford reagent method⁽³²⁾. The muscle samples (20 µg) were subjected to SDS-PAGE and Western blot analyses using the appropriate antibodies: anti-phospho S6 (Ser235/Ser236, #4856; Cell Signaling Technologies); anti-carboxyl terminal S6 (#2217; Cell Signaling Technologies); eIF4E (4E)-binding protein 1 (4E-BP1, Thr37/Thr46, #9459; Cell Signaling Technologies); anti-4E-BP1 (#9452; Cell Signaling Technologies); anti-phospho eIF2α (Ser51, #9721; Cell Signaling Technologies); anti-carboxyl terminal eIF2α (#9722; Cell Signaling Technologies); anti-microtubule-associated protein light chain 3B (LC3B, #2775; Cell Signaling Technologies); anti-sequestosome 1 (SQSTM1, #10 117; Santa Cruz); anti-beclin 1 (#3738; Cell Signaling Technologies); anti-β-tubulin (#2146; Cell Signaling Technologies). All primary antibodies used have been shown to cross-react successfully with rainbow trout proteins of interest^(33–37). For beclin 1, the amino acid sequence of the corresponding protein was monitored in the SIGENAE database (<http://www.sigenae.org>) to check for the conservation of the antigen sequence with the corresponding sequence from mammals, ensuring a good specificity (79%) of the mammalian antibody used in the analysis of the samples. After washing, the membranes were incubated with an IRDye IR secondary antibody (LI-COR, Inc., Biotechnology). The bands were visualised by IR fluorescence using the Odyssey® Imaging System (LI-COR, Inc.) and quantified using the Odyssey Infrared Imaging System software (version 1.2; Application Software).

Analysis of mRNA levels: quantitative RT-PCR

The analysis of mRNA levels was carried out using the white muscle samples of fish sampled at 4, 8 and 16 h after feeding

Table 2. Growth performance of trout fed the experimental diets for 6 weeks (Mean values with their standard errors; *n* 3 tanks per diet)

	DEF		ADQ		EXC	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
Initial body weight (g)	41.1	0.6	41.1	0.6	41.1	0.6
Final body weight (g)	57.6 ^b	0.8	73.9 ^a	3.2	78.5 ^a	2.7
Daily growth index (%/d)	0.99 ^c	0.09	1.77 ^b	0.11	1.98 ^a	0.08
Feed intake (% body weight/d)	1.51 ^b	0.13	1.65 ^{a,b}	0.04	1.77 ^a	0.10
Feed efficiency	0.52 ^b	0.06	0.82 ^a	0.03	0.84 ^a	0.07

DEF, methionine deficient; ADQ, methionine adequate; EXC, methionine excess.

^{a,b,c} Mean values with unlike superscript letters were significantly different among the three dietary groups ($P < 0.05$; one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls multiple-comparison test).

Table 3. Sequences of the primer pairs used in the quantitative real-time RT-PCR assays

Genes	Forward primer	Reverse primer
Autophagy-related genes		
<i>atg12l</i>	5'-GATGGAGGCCAATGAACAGC-3'	5'-GCGTTTGAAGTAAAAGGGCTAA-3'
<i>atg4b</i>	5'-TATGCGCTTCCGAAAGTTGTC-3'	5'-CAGGATCGTTGGGGTTCTGC-3'
<i>Uvrug</i>	5'-AGGATTTCCAAGCGAAGGAT-3'	5'-GTTCTCCTCGAGGGTACAGG-3'
<i>SQSTM1</i>	5'-AGCCCACTGGGTATCGATGT-3'	5'-GGTCACGTGAGTCCATTCT-3'
<i>Mul1</i>	5'-CCACGAGATGGAGGAGATGT-3'	5'-AGAGCGTTGTGGAAGCAACT-3'
<i>Bnip3</i>	5'-CCTGTGACAGTCTCCGAGA-3'	5'-CCACTTCACGTCTCCGTTCT-3'
Proteasome-related genes		
<i>Fbx32</i>	5'-TGCGATCAAATGGATTCAAA-3'	5'-GATTGCATCATTCCCCACT-3'
<i>MuRF1</i>	5'-CTGATTAGTGGCAAGGAGCTG-3'	5'-GTAAGGTGCTCCATGTTCTCG-3'
<i>MuRF2</i>	5'-TGGAGGAGTCAGAGATGGCTA-3'	5'-TCCAGGTGGGAGATGTTAGTG-3'
<i>MuRF3</i>	5'-ATGTCCATTGCAGGGACTCTA-3'	5'-AACTGGGGTAAGCCATTGTGT-3'
<i>ZNF216</i>	5'-AAGAGGGTGGCCTCACAG-3'	5'-GACATCCTTTTGCCACTCGT-3'
<i>Trim32</i>	5'-AAAGGACAGCTGATGGTGCT-3'	5'-GAAATCGGATCATGGAGGAA-3'
Reference gene		
<i>EF1α</i>	5'-TCCTCTTGGTCTTTTCGCTG-3'	5'-ACCCGAGGGACATCCTGTG-3'

atg12l, Autophagy-related 12-like; *atg4b*, autophagy-related 4b; *Uvrug*, UV radiation resistance-associated gene; *SQSTM1*, sequestosome 1; *Mul1*, mitochondrial ubiquitin ligase activator of NF- κ B 1; *Bnip3*, Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3; *Fbx32*, F-box protein 32; *MuRF1*, -2, -3, muscle RING finger 1, -2, -3; *ZNF216*, zinc finger protein 216; *Trim32*, tripartite motif-containing 32; *EF1 α* , elongation factor 1 α .

the last meal. Total RNA was extracted using TRIzol Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. Using the SuperScript III RNaseH-RT kit (Invitrogen) with random primers (Promega), 1 μ g of the resulting total RNA (n 6 per time point) was reverse-transcribed into complementary DNA (cDNA) according to the manufacturer's instructions. Details regarding the primer sequences used in the quantitative real-time RT-PCR assays, as well as the protocol conditions of the assays, have been published previously^(35,36,38). Primers of the *SQSTM1*, UV radiation resistance-associated gene protein (*Uvrug*), Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3 (*Bnip3*), mitochondrial ubiquitin ligase activator of NF- κ B 1 (*Mul1*), zinc finger protein 216 (*ZNF216*) and tripartite motif-containing 32 (*Trim32*) genes were newly designed using Primer3 software, as described previously⁽³⁸⁾. To confirm the specificity of the newly developed RT-PCR assay, the amplicon was purified and sequenced (Beckman-Coulter Genomics). The primers used in the real-time RT-PCR assays are listed in Table 3. Quantitative RT-PCR assays were carried out on the Roche LightCycler 480 System (Roche Diagnostics). The assays were carried out using a reaction mix of 6 μ l per sample, each of which contained 2 μ l of diluted cDNA template, 0.24 μ l of each primer (10 μ M), 3 μ l of LightCycler 480 SYBRH Green I Master Mix and 0.52 μ l of DNase/RNase-free water (5 PRIME GmbH). The PCR protocol was initiated at 95°C for 10 min for the initial denaturation of the cDNA and the activation of the hot-start Taq-polymerase, followed by forty-five cycles of a three-step amplification programme (15 s at 95°C, 10 s at 60–64°C and 15 s at 72°C), according to the primer set used (Table 3). Melting curves were systematically monitored (temperature gradient at 1.1°C/10 s from 65 to 94°C) at the end of the last amplification cycle to confirm the specificity of the amplification reaction. Each PCR assay included replicate samples (duplicate of reverse transcription and PCR amplification, respectively) and negative controls (RT- and cDNA template-free samples, respectively). For the expression analysis of mRNA, relative quantification of target

gene expression was done using the ΔC_T method described by Pfaffl *et al.*⁽³⁹⁾. The relative gene expression value of elongation factor 1 α (*EF1 α*) was used for the normalisation of the measured expression values of the target mRNA, and it was found to not change significantly over time (data not shown). In all cases, PCR efficiency was measured by the slope of a standard curve using serial dilutions of cDNA. In all cases, PCR efficiency values ranged between 1.8 and 2.2.

Statistical analyses

Results are expressed as means with their standard errors (n 6). Statistical analyses of growth performance and protein phosphorylation were carried out using one-way ANOVA to detect significant differences. Gene expression data were analysed using two-way ANOVA. The Newman-Keuls multiple-range test was used to compare means in case of a significant effect ($P < 0.05$).

Results

Growth performance, feed intake and feed efficiency

The feed intake of fish fed the ADQ diet was similar to that of fish fed the DEF and EXC diets, but it differed slightly between the latter two groups (Table 2). As expected, at the end of the 6-week feeding trial, the final body weight as well as the daily growth index was lower in fish fed the DEF diet than in those fed the ADQ and EXC diets (Table 2). Also, feed efficiency was higher in fish fed the ADQ and EXC diets than in those fed the DEF diet (Table 2).

Muscle S6, 4E binding protein 1 and eukaryotic translation initiation factor 2 α phosphorylation status

We investigated the effect of feeding the three experimental diets with graded concentrations of dietary methionine on

the phosphorylation of three translation initiation factors (S6, 4E-BP1 and eIF2 α) in the muscle of trout sampled 4 h after feeding the last meal. As shown in Fig. 1(A), the phosphorylation of S6 in fish fed the DEF diet was significantly reduced compared with that in fish fed the EXC diet, whereas intermediate results were obtained for fish fed the ADQ diet. In contrast, the phosphorylation of 4E-BP1 was not different among the three dietary groups (Fig. 1(B)). Finally, the phosphorylation of eIF2 α was significantly lower in fish fed the EXC diet than in those fed the DEF diet, but it did not differ between the fish fed the ADQ diet and those fed the EXC and DEF diets (Fig. 1(C)).

Levels of the muscle autophagy-related markers microtubule-associated protein light chain 3-II, sequestosome 1 and beclin 1

We monitored the levels of LC3-II as well as those of SQSTM1 and beclin 1 in the skeletal muscle of trout fed the three experimental diets and sampled 4 h after feeding the last meal. To date, the detection of processed LC3-II by Western blot analysis has been the most reliable method for autophagy detection. As shown in Fig. 2(A), the ratio of LC3-II: β -tubulin reached significantly lower levels in fish fed the EXC diet compared with that in fish fed the DEF diet. In addition to LC3-II, SQSTM1 and beclin 1 can also be used as autophagy markers. There was no significant difference in the ratio of SQSTM1: β -tubulin among the dietary groups (Fig. 2(B)). Similar to the results obtained for LC3-II, the ratio of beclin 1: β -tubulin reached significantly lower levels in fish fed the EXC diet compared with that in fish fed the DEF diet (Fig. 2(C)).

mRNA levels of autophagy-related genes in the skeletal muscle of trout fed diets differing in methionine concentrations and sampled 4, 8 and 16 h after feeding the last meal

We monitored the expression levels of several autophagy-related genes (autophagy-related 4b (*atg4b*), autophagy-related

12-like (*atg12l*), *Uvr*, *SQSTM1*, *Mul1* and *Bnip3*) in the muscle of fish fed the three experimental diets. As shown in Fig. 3, the mRNA levels of all the monitored autophagy-related genes were significantly higher in fish fed the DEF diet than in those fed the EXC diet. Intermediate results were obtained for fish fed the ADQ diet, with their mRNA levels being similar to those of fish fed the DEF and/or EXC diets according to the monitored gene. With the exception of *Uvr* mRNA, exhibiting a significant increase in its levels between 8 and 16 h after feeding (Fig. 3(C)), no significant differences were observed among the sampling times for any of the genes studied (Fig. 3(A), (B), (D), (E) and (F)).

mRNA levels of proteasomal genes in the skeletal muscle of trout fed diets differing in methionine concentration and sampled at 4, 8 and 16 h after feeding the last meal

We monitored the mRNA levels of several proteasome-related genes (*Fbx32*, muscle RING finger 1 (*MuRF1*), *MuRF2* and *MuRF3*, *ZNF216* and *Trim32*) in the muscle of trout fed the three experimental diets. With the exception of *MuRF1*, the expression of which remained the same among the three dietary groups (Fig. 4(B)), the mRNA levels of all the other monitored proteasome-related genes exhibited a significant reduction in the muscle of fish fed the EXC diet compared with those of fish fed the DEF diet (Fig. 4(A) and (C)–(F)). However, the 'diet' effect on *Fbx32* mRNA levels was evident only at 4 h after feeding, as revealed by the significant 'diet \times time' interaction and *post hoc* Newman–Keuls test (Fig. 4(A)). Similar to the results obtained for the autophagy-related genes, intermediate results were obtained for fish fed the ADQ diet, with their mRNA levels being similar to those of fish fed the DEF and/or EXC diets according to the monitored gene.

Discussion

The replacement of fishmeal with alternative protein sources remains a major thrust area of research for sustainable aquaculture and much has been accomplished in reducing

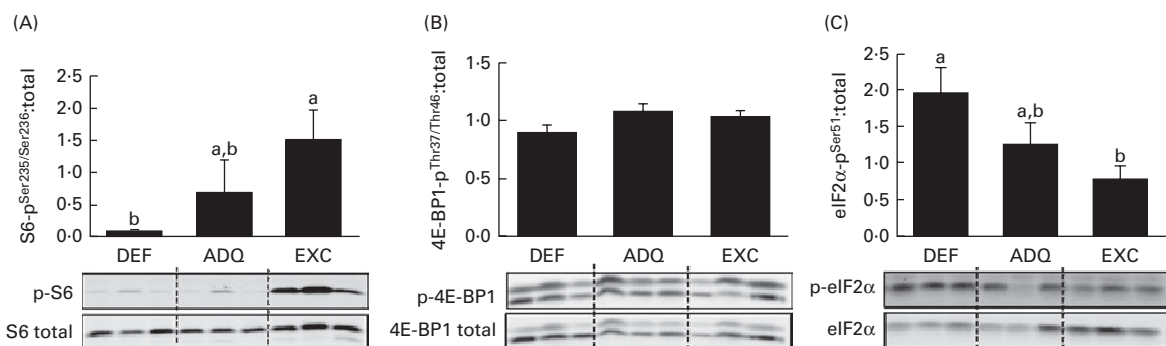


Fig. 1. Results of the Western blot analysis of (A) S6, (B) 4E binding protein 1 (4E-BP1) and (C) eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α) protein phosphorylation (p) in the muscle of trout fed the methionine-deficient (DEF), -adequate (ADQ) and -excess (EXC) diets and sampled 4 h after feeding the last meal. Total protein (20 μ g per lane) was loaded on the gel. Western blot analysis was carried out on six individual samples per treatment, and a representative blot is shown. Graphs show the ratio of the amount of the phosphorylated protein:the total amount of the targeted protein. Values are means (n 6), with their standard errors represented by vertical bars. ^{a,b} Mean values with unlike letters were significantly different among the three dietary groups ($P < 0.05$; one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls multiple-comparison test).

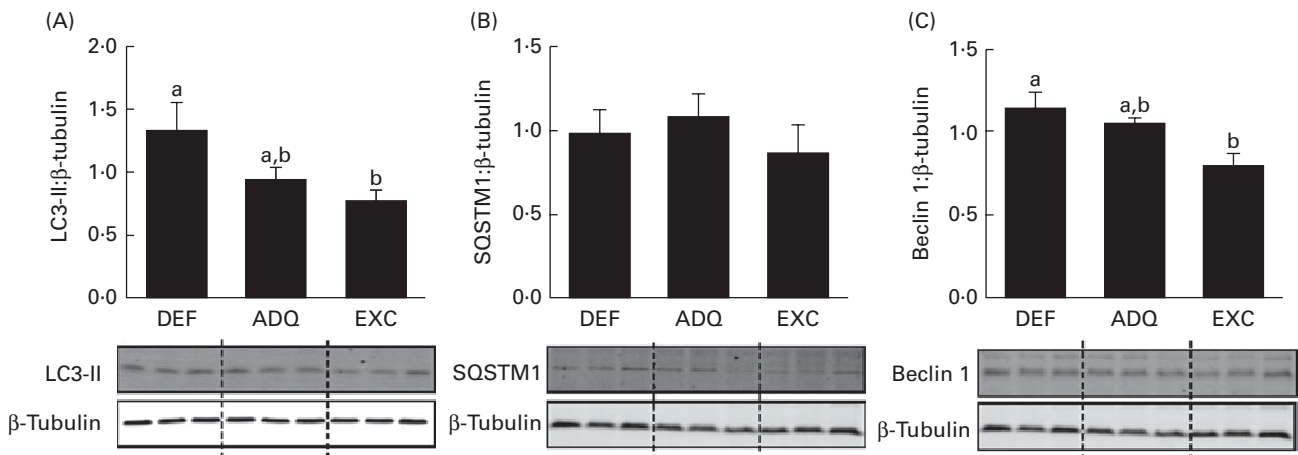


Fig. 2. Results of the Western blot analysis of (A) microtubule-associated protein light chain 3-II (LC3-II), (B) sequestosome 1 (SQSTM1) and (C) beclin 1 proteins in the muscle of trout fed the methionine-deficient (DEF), -adequate (ADQ) and -excess (EXC) diets and sampled 4 h after feeding the last meal. Total protein (20 µg per lane) was loaded on the gel. Western blot analysis was carried out on six individual samples per treatment, and a representative blot is shown. Graphs show the ratio of the targeted protein:β-tubulin used as a loading control. Values are means (n 6), with their standard errors represented by vertical bars. ^{a,b} Mean values with unlike letters were significantly different among the three dietary groups ($P < 0.05$; one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls multiple-comparison test).

the utilisations levels of fishmeal in most species⁽⁴⁰⁾. However, the use of plant protein ingredients often necessitates the addition of one or several crystalline amino acids to meet the essential amino acid requirements. Methionine is the most limiting essential amino acid in oil-seed-derived feedstuffs, such as soya-derived protein sources. Supplementation of diets containing these protein sources with synthetic methionine has been shown to optimise the nutritional value of these diets^(8–11,41), but excess dietary methionine has also been reported to affect growth performance and composition⁽⁴²⁾. In this context, the precise determination of the molecular basis of the growth reduction induced by methionine-imbalanced diets represents an essential objective for aquaculture. In the present study, we investigated the effect of feeding diets containing different concentrations of methionine on several main factors involved in the regulation of muscle protein turnover in rainbow trout.

We found that rainbow trout fed the amino acid-imbalanced diets (DEF and EXC) did not increase their feed intake (compared with those fed the ADQ diet) to compensate for the inadequate amount of methionine supplied by this diet. At the end of the 6-week feeding trial, the final body weight as well as the feed efficiency was lower in fish fed the DEF diet than in those fed the ADQ and EXC diets. These results confirm the previously described effects of methionine availability on growth and feed utilisation in fish^(10,24,41,43) and provide a relevant design for studying the role of methionine in muscle growth-related functions in rainbow trout.

We first investigated the phosphorylation of three translation initiation factors known to play a prominent role in muscle protein synthesis, namely S6, 4E-BP1 and eIF2α^(44,45). The results of this analysis revealed that dietary methionine concentrations could modify the phosphorylation of S6. These results are consistent with those of a previous study on avian QM7 myoblasts showing that the phosphorylation of this protein is closely related to the concentration of methionine in the culture medium⁽¹⁴⁾. According to these

authors, this effect of methionine on the phosphorylation of S6 is mediated by the TORC1 signalling pathway, in agreement with the concept of ‘nutrient signal’ developed for amino acids such as leucine^(17–21). However, we failed to detect any significant change in the phosphorylation status of the TORC1 downstream effector, the 4E-BP1, between the dietary groups. Such a discrepancy between the phosphorylation levels of these two proteins (S6 and 4E-BP1) has already been observed in the liver of rats in response to low dietary methionine intake⁽⁴⁶⁾ and highlights the complexity of the signalling network involved in the regulation of the activation of these translation initiation factors. In addition, we found that the phosphorylation of eIF2α was significantly induced in the muscle of trout fed the DEF diet than in the muscle of trout fed the EXC diet. This result is in line with previous findings demonstrating that growing rats fed a sulphur amino acid-deficient diet exhibit increased phosphorylation of eIF2α in the liver⁽⁴⁷⁾. This effect is consistent with the activation of a stress-induced eIF2α kinase, presumably GCN2 (general control non-derepressible 2), in response to sulphur amino acid deprivation. However, in contrast to previous studies on the role of GCN2 and/or eIF2α phosphorylation in response to amino acid deprivation⁽⁴⁸⁾, the present study used diets that were limiting in, but not deficient in, methionine, an essential amino acid. Thus, the present results extend the observations to the situation in which the diet is only deficient in one essential amino acid (i.e. methionine), to an amino acid pattern that is more representative of that in diets consumed by humans and animals, and to a diet that supports growth. Overall, our results showed that rainbow trout respond to a methionine-deficient diet by affecting the phosphorylation of two main translation initiation factors (S6 and eIF2α) in the skeletal white muscle, probably leading to reduced growth and feed utilisation.

As muscle growth is determined by the balance between the rate of protein synthesis and that of protein degradation,

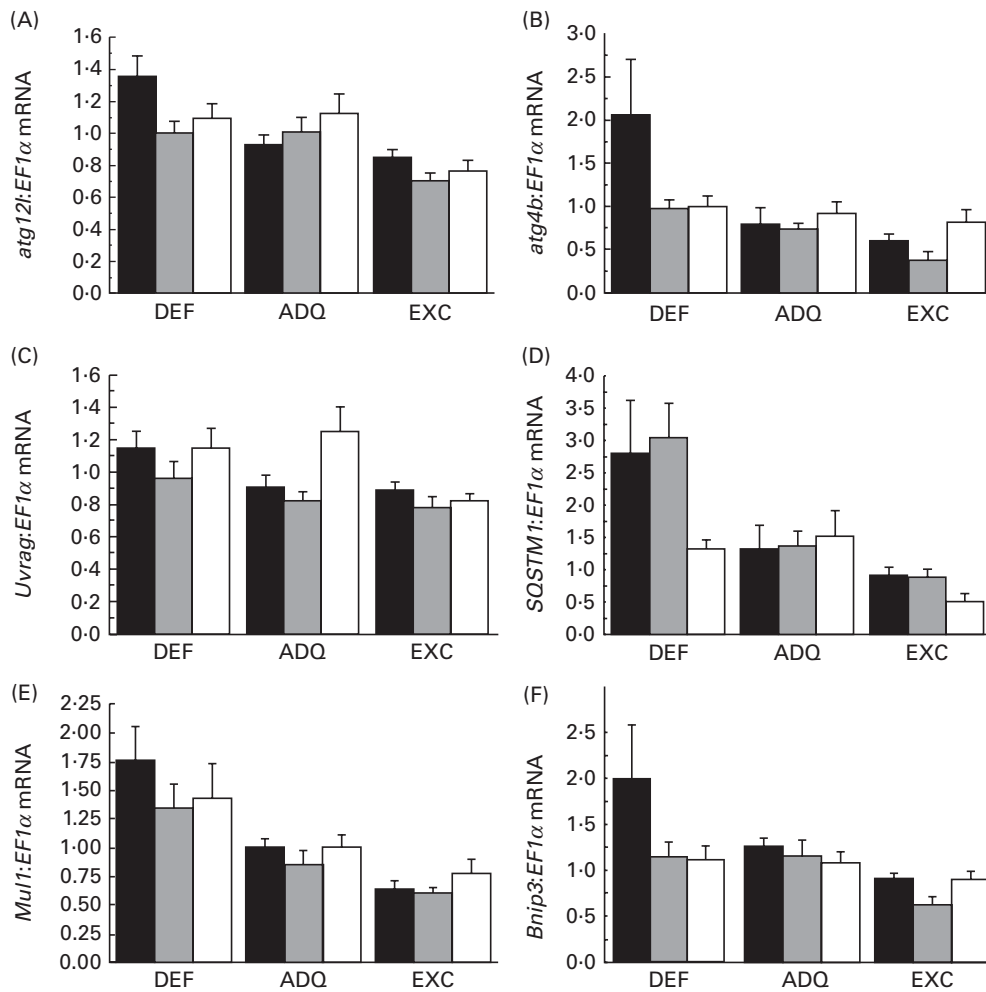


Fig. 3. Autophagy-related gene expression in the muscle of trout fed the methionine-deficient (DEF), -adequate (ADQ) and -excess (EXC) diets and sampled 4 h (■), 8 h (▣) and 16 h (□) after feeding the last meal. The mRNA levels of (A) autophagy-related 12-like (*atg12l*), (B) autophagy-related 4b (*atg4b*), (C) UV radiation resistance-associated gene protein (*Uvrag*), (D) sequestosome 1 (*SQSTM1*), (E) mitochondrial E3 ubiquitin protein ligase 1 (*Mul1*) and (F) Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3 (*Bnip3*) were measured using quantitative real-time RT-PCR assays. Expression values were normalised to those of the elongation factor 1 α (*EF1 α*) transcripts. Values are means (n 6), with their standard errors represented by vertical bars. A significant diet effect was observed for *atg12l* mRNA ($P < 0.001$; DEF = ADQ > EXC), *atg4b* mRNA ($P = 0.003$; DEF > ADQ = EXC), *SQSTM1* mRNA ($P < 0.0001$; DEF > ADQ = EXC), *Mul1* mRNA ($P < 0.0001$; DEF > ADQ = EXC) and *Bnip3* mRNA ($P = 0.0039$; DEF = ADQ; ADQ = EXC; DEF > EXC) (two-way ANOVA). Significant effects of diet ($P = 0.005$; DEF = ADQ; ADQ = EXC; DEF > EXC) and time ($P = 0.018$; 4 h = 8 h; 4 h = 16 h; 16 h > 18 h) were observed for *Uvrag* mRNA (two-way ANOVA).

we also attempted to address the question whether dietary methionine concentrations affect the key components of proteolysis in the muscle of trout. The ubiquitin–proteasome and autophagy-lysosomal pathways are the two major intracellular proteolytic pathways in the skeletal muscle of vertebrates⁽⁴⁹⁾. Macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) functions as an important catabolic mechanism by mediating the turnover of intracellular organelles and protein complexes through a lysosome-dependent degradative pathway^(50,51). In mammals, two main mechanisms have been identified for the induction of autophagy under stress conditions. The first is a rapid and transient transcription-independent induction mediated by TORC1 and AMP-activated protein kinase complexes⁽⁵²⁾. During this induction, LC3B is converted from a slower-migrating unconjugated form (LC3-I) to a faster-migrating lipid-conjugated form (LC3-II)^(53,54). Our previous findings have revealed that the composition of

macronutrients (protein:carbohydrate ratio) affects the feeding-mediated short-term inhibition of autophagy in the muscle of rainbow trout⁽³³⁾. More precisely, we demonstrated that LC3-II levels in the muscle of rainbow trout are inhibited by re-feeding only when the proportion of dietary proteins increased at the expense of carbohydrates. In the present study, the levels of LC3-II as well as those of beclin 1 (another essential factor in autophagy interactome) were significantly increased by methionine deficiency in the diet, indicating that the formation of autophagosomes is affected not only by the protein:carbohydrate ratio in the diet but also by the profile of amino acids in the protein fraction. The autophagy-inhibitory effect of amino acids (especially leucine) has been well established in cell-culture experiments^(16,55,56). However, to our knowledge, no findings have been published to date on the *in vivo* effects of dietary deficiency of an essential amino acid on this degradative system.

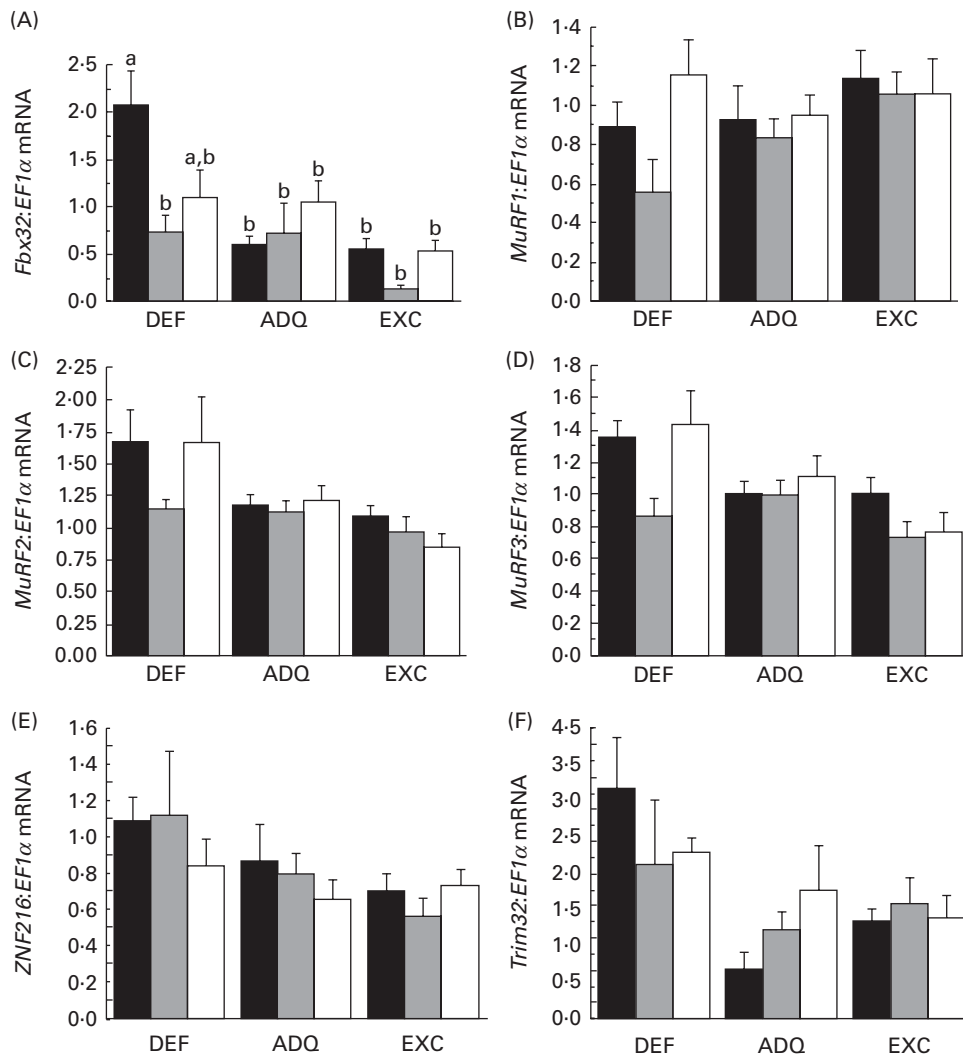


Fig. 4. Proteasomal gene expression in the muscle of rainbow trout fed the methionine-deficient (DEF), -adequate (ADQ) and -excess (EXC) diets and sampled 4 h (■), 8 h (▣) and 16 h (□) after feeding the last meal. The mRNA levels of (A) Fbx protein 32 (*Fbx32*), (B–D) the three muscle-specific RING finger 1 genes (*MuRF1*, *MuRF2* and *MuRF3*, respectively), (E) zinc finger protein 216 (*ZNF216*) and (F) tripartite motif-containing protein 32 (*Trim32*) were measured using quantitative real-time RT-PCR assays. Expression values were normalised to those of the elongation factor 1 α (*EF1 α*) transcripts. Values are means (n 6), with their standard errors represented by vertical bars. ^{a,b}Mean values with unlike letters were significantly different among the three dietary groups ($P < 0.05$; two-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls multiple-comparison test). For *Fbx32* mRNA, significant effects of diet ($P = 0.0097$; DEF > ADQ = EXC) and time ($P = 2.947 \times 10^{-5}$; 4 h > 8 h = 16 h) were observed and the diet \times time interaction was significant ($P = 0.0073$). A significant diet effect was observed for *MuRF2* mRNA ($P = 0.0019$; DEF > ADQ = EXC), *ZNF216* mRNA ($P = 0.0446$; DEF = ADQ; ADQ = EXC; DEF > EXC) and *Trim32* mRNA ($P = 0.004$; DEF > ADQ = EXC). Significant effects of diet ($P = 0.0013$; DEF = ADQ > EXC) and time ($P = 0.0216$; 4 h = 16 h > 8 h) were observed for *MuRF3* mRNA.

The second regulatory mechanism of autophagy induction is a slower one requiring gene expression^(57,58). In the present study, we found that the mRNA levels of all the monitored autophagy-related genes were significantly higher in fish fed the DEF diet than in those fed the EXC diet. This result is consistent with our previous findings showing that amino acid availability regulates the expression of several autophagy-related genes in trout myocytes⁽³⁶⁾. Similarly, a recent study on mouse embryonic fibroblast cells has reported the up-regulation of a large number of autophagy genes in response to leucine starvation and identified the GCN2/eIF2 α pathway as a central regulator of this effect⁽¹⁶⁾. Interestingly, the present results reveal that even *in vivo* the deficiency of methionine in the diet is also associated with an increase in eIF2 α

phosphorylation, making possible the involvement of this signalling pathway in the observed induction of autophagy-related genes in fish fed the DEF diet. Collectively, the present results reveal that the deficiency of methionine in the diet leads not only to the induction of the formation of autophagosomes in the muscle (revealed by LC3-II levels) but also to the increase of the mRNA levels of several autophagy genes. At physiological levels, such an induction of the expression of these genes in prolonged stress conditions has been reported to be critical to replenish key autophagy-related proteins that are destroyed during prolonged activation of autophagy⁽⁴⁹⁾.

The ubiquitin–proteasome pathway is another important proteolytic pathway that has long been considered to be the primary pathway involved in muscle atrophy^(59–62).

Protein degradation through this pathway relies on the selective attachment of ubiquitin molecules to the protein substrate by E3 ubiquitin protein ligases. Following polyubiquitination, the targeted proteins are recognised and degraded by the 26S proteasome. Among the genes encoding the E3 ubiquitin ligases, *Fbx32* and *MuRF1* have been studied in depth and shown to play a key role in the control of skeletal muscle mass⁽⁶³⁾. These genes are both muscle specific and up-regulated during muscle atrophy^(64,65). In the present study, the mRNA levels of *Fbx32* as well as those of two *MuRF* paralogues (*MuRF2* and *MuRF3*) were significantly higher in the muscle of trout fed the DEF diet than in that of fish fed the EXC diet. These findings are in agreement with the results of a previous study on avian QT6 cells, showing that methionine availability controls the levels of *Fbx32* mRNA through a TORC1-dependent mechanism⁽¹⁵⁾. In contrast, we failed to detect any difference in the mRNA levels of *MuRF1* between the dietary groups, in accordance with the results of previous studies indicating differences in the *in vivo* regulation of *Fbx32* and *MuRF1* expression^(66,67). Recently, additional proteins involved in muscle protein ubiquitination and proteasome-dependent breakdown have been identified⁽⁶⁸⁾. A recent paper has reported that Trim32 is a crucial E3 ligase for the degradation of thin filaments (actin, tropomyosin and troponins), α -actinin and desmin⁽⁶⁹⁾. ZNF216 has also been identified as an important player in the recognition and delivery of ubiquitinated proteins to the proteasome during muscle atrophy⁽⁷⁰⁾. In the present study, the expression of these two genes was significantly induced when fish were fed the DEF diet. To our knowledge, the present study is the first to provide evidence that the amino acid composition of the diet can modulate the expression of these two genes. Overall, the present results reveal that methionine deficiency induces the expression of major factors involved in the different steps of ubiquitin–proteasome degradation, from the attachment of ubiquitin molecules to the protein substrate to the recognition and delivery of the ubiquitinated proteins to the proteasome.

In conclusion, we demonstrated that feeding rainbow trout with a diet deficient in methionine for 6 weeks results in the suppression of growth performance and affects the activation and/or expression of several key factors involved in muscle growth. More precisely, methionine deficiency affects the phosphorylation of the two main translation initiation factors S6 and eIF2 α and induces the expression of several factors involved in the two major muscle proteolytic pathways (ubiquitin–proteasome and autophagy-lysosomal). Whether such changes in the expression and/or activation of these growth-related factors are induced by methionine limitation is unknown, as these changes may be a direct effect of a deficiency of an essential amino acid or an indirect effect of metabolic and/or hormonal changes induced by such a deficiency. Our findings provide the first-ever evidence of the involvement of dietary methionine in mechanisms regulating the muscle growth of fish under physiological conditions. From a practical aquaculture point of view, the present study provides valuable information on biomarkers associated with muscle growth and sulphur amino acid deficiency, a situation not uncommon in fish fed diets rich in plant-based ingredients.

Acknowledgements

The authors thank Evonik-Degussa Laboratory for the analysis of the amino acid composition of the diets. They also cordially thank C. Biran and C. Prochasson from the INRA for their technical assistance as well as the technical staff at the fish farm (F. Vallée, F. Terrier, A. Lanuque and F. Sandres).

The present study was supported by the European Union 7th Framework project (Project Call Identifier: FP7-KBBE-2011-5, Project no.: 288925, Advanced Research Initiatives for Nutrition & Aquaculture (ARRAINA)). The ARRAINA European project also provided a fellowship to I. B.

The authors' contributions are as follows: I. B., S. S.-C., I. G., S. K., S. P. and I. S. designed the study; I. B., K. D. and A. S. conducted the study; I. B., S. S.-C., I. G., S. P. and I. S. analysed the data; I. B. S. P. and I. S. wrote the article; I. S. had primary responsibility for the final content. All authors read and approved the final manuscript.

None of the authors has any conflicts of interest to declare.

References

1. FAO (2012) *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Rome: FAO.
2. Cowey CB (1995) Protein and amino acid requirements: a critique of methods. *J Appl Ichthyol* **11**, 199–204.
3. Naylor RL, Hardy RW, Bureau DP, *et al.* (2009) Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 15103–15110.
4. Carter CG & Hauler RC (2000) Fish meal replacement by plant meals in extruded feeds for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture* **185**, 299–311.
5. Kaushik SJ, Cravedi JP, Lalles JP, *et al.* (1995) 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.
6. Kaushik SJ (2008) Soybean products in salmonid diets. In *Alternative Protein Sources in Aquaculture Diets*, pp. 261–279 [C Lim, C Webster and C-S Lee, editors]. New York, NY: The Haworth Press.
7. Gatlin DM, Barrows FT, Brown P, *et al.* (2007) Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquac Res* **38**, 551–579.
8. Rodehutsord M, Jacobs S, Pack M, *et al.* (1995) Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growing from 50 to 150 g to supplements of DL-methionine in a semipurified diet containing low or high levels of cystine. *J Nutr* **125**, 964–969.
9. Pack M, Rodehutsord M, Jacobs S, *et al.* (1995) Amino acid requirements of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) II. Protein deposition as function of dietary methionine, threonine and arginine. *J Appl Ichthyol* **11**, 390–393.
10. Rumsey GL, Page JW & Scott ML (1983) Methionine and cystine requirements of rainbow trout. *Prog Fish Cult* **45**, 139–143.
11. Sveier H, Nordås H, Berge GE, *et al.* (2001) Dietary inclusion of crystalline D- and L-methionine: effects on growth, feed and protein utilization, and digestibility in small and large Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac Nutr* **7**, 169–181.
12. Kino K & Okumura J (1986) Improvement of body weight and nitrogen balance of chicks fed histidine-free or lysine-free diets with supplementation of graded levels of sulfur-containing amino acids. *Poult Sci* **65**, 1736–1740.
13. Bradshaw RA, Brickey WW & Walker KW (1998) N-Terminal processing: the methionine aminopeptidase and N α -acetyl transferase families. *Trends Biochem Sci* **23**, 263–267.

14. Métayer-Coustard S, Mameri H, Seiliez I, *et al.* (2010) Methionine deprivation regulates the S6K1 pathway and protein synthesis in avian QM7 myoblasts without activating the GCN2/eIF2 α cascade. *J Nutr* **140**, 1539–1545.
15. Tesseraud S, Métayer-Coustard S, Boussaid S, *et al.* (2007) Insulin and amino acid availability regulate atrogin-1 in avian QT6 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **357**, 181–186.
16. B'chir W, Maurin A-C, Carraro V, *et al.* (2013) The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res* **41**, 7683–7699.
17. Anthony JC, Yoshizawa F, Anthony TG, *et al.* (2000) Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of post-absorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J Nutr* **130**, 2413–2419.
18. Dardevet D, Rieu I, Fafournoux P, *et al.* (2003) Leucine: a key amino acid in ageing-associated sarcopenia? *Nutr Res Rev* **16**, 61–70.
19. Kimball SR & Jefferson LS (2004) Regulation of global and specific mRNA translation by oral administration of branched-chain amino acids. *Biochem Biophys Res Commun* **313**, 423–427.
20. Kimball SR & Jefferson LS (2006) Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *J Nutr* **136**, 227S–231S.
21. Yoshizawa F (2004) Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* **313**, 417–422.
22. Takagi S, Shimeno S, Hosokawa H, *et al.* (2001) Effect of lysine and methionine supplementation to a soy protein concentrate diet for red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Sci* **67**, 1088–1096.
23. Gaylord TG & Barrows FT (2009) Multiple amino acid supplementations to reduce dietary protein in plant-based rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, feeds. *Aquaculture* **287**, 180–184.
24. Cowey CB, Cho CY, Sivak JG, *et al.* (1992) Methionine intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), relationship to cataract formation and the metabolism of methionine. *J Nutr* **122**, 1154–1163.
25. Walton MJ, Cowey CB & Adron JW (1982) Methionine metabolism in rainbow trout fed diets of differing methionine and cystine content. *J Nutr* **112**, 1525–1535.
26. Espe M, Hevrøy EM, Liaset B, *et al.* (2008) Methionine intake affect hepatic sulphur metabolism in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* **274**, 132–141.
27. Lansard M, Panserat S, Plagnes-Juan E, *et al.* (2011) L-Leucine, L-methionine, and L-lysine are involved in the regulation of intermediary metabolism-related gene expression in rainbow trout hepatocytes. *J Nutr* **141**, 75–80.
28. Craig PM, Massarsky A & Moon TW (2013) Understanding glucose uptake during methionine deprivation in incubated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes using a non-radioactive method. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **166**, 23–29.
29. Craig PM & Moon TW (2013) Methionine restriction affects the phenotypic and transcriptional response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to carbohydrate-enriched diets. *Br J Nutr* **109**, 402–412.
30. Kaushik SJ & Seiliez I (2010) Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: current knowledge and future needs. *Aquac Res* **41**, 322–332.
31. Llames CR & Fontaine J (1994) Determination of amino acids in feeds: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem* **77**, 1362–1402.
32. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
33. Belghit I, Panserat S, Sadoul B, *et al.* (2013) Macronutrient composition of the diet affects the feeding-mediated down regulation of autophagy in muscle of rainbow trout (*O. mykiss*). *PLOS ONE* **8**, e74308.
34. Dai W, Panserat S, Mennigen JA, *et al.* (2013) 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.
35. Seiliez I, Panserat S, Lansard M, *et al.* (2011) Dietary carbohydrate-to-protein ratio affects TOR signaling and metabolism-related gene expression in the liver and muscle of rainbow trout after a single meal. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **300**, R733–R743.
36. Seiliez I, Gabillard J-C, Riflade M, *et al.* (2012) Amino acids downregulate the expression of several autophagy-related genes in rainbow trout myoblasts. *Autophagy* **8**, 364–375.
37. Seiliez I, Taty Taty GC, Bugeon J, *et al.* (2013) Myostatin induces atrophy of trout myotubes through inhibiting the TORC1 signaling and promoting ubiquitin–proteasome and autophagy–lysosome degradative pathways. *Gen Comp Endocrinol* **186**, 9–15.
38. Seiliez I, Gutierrez J, Salmerón C, *et al.* (2010) 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.
39. Pfaffl MW, Horgan GW & Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**, e36.
40. Lim C, Webster CD & Lee C-S (2008) *Alternative Protein Sources in Aquaculture Diets*, 571 pp. New York, NY: The Haworth Press.
41. Mambri M, Roem AJ, Carvèdi JP, *et al.* (1999) Effects of replacing fish meal with soy protein concentrate and of DL-methionine supplementation in high-energy, extruded diets on the growth and nutrient utilization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J Anim Sci* **77**, 2990–2999.
42. Jackson AJ & Capper BS (1982) Investigations into the requirements of the tilapia *Sarotherodon mossambicus* for dietary methionine, lysine and arginine in semi-synthetic diets. *Aquaculture* **29**, 289–297.
43. Kim K-I, Kayes TB & Amundson CH (1992) Requirements for sulfur amino acids and utilization of D-methionine by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **101**, 95–103.
44. Kimball SR, Shantz LM, Horetsky RL, *et al.* (1999) Leucine regulates translation of specific mRNAs in L6 myoblasts through mTOR-mediated changes in availability of eIF4E and phosphorylation of ribosomal protein S6. *J Biol Chem* **274**, 11647–11652.
45. Kimball SR & Jefferson LS (2002) Control of protein synthesis by amino acid availability. *Curr Opin Clin Nutr* **5**, 63–67.
46. Sikalidis AK, Mazor KM, Kang M, *et al.* (2013) Total 4EBP1 is elevated in liver of rats in response to low sulfur amino acid intake. *J Amino Acids* **2013**, 864757.
47. Sikalidis AK & Stipanuk MH (2010) Growing rats respond to a sulfur amino acid-deficient diet by phosphorylation of the α subunit of eukaryotic initiation factor 2 heterotrimeric complex and induction of adaptive components of the integrated stress response. *J Nutr* **140**, 1080–1085.
48. Anthony TG, McDaniel BJ, Byerley RL, *et al.* (2004) Preservation of liver protein synthesis during dietary leucine deprivation occurs at the expense of skeletal muscle mass in mice deleted for eIF2 kinase GCN2. *J Biol Chem* **279**, 36553–36561.
49. Sandri M (2010) Autophagy in skeletal muscle. *FEBS Lett* **584**, 1411–1416.



50. Chen Y & Klionsky DJ (2011) The regulation of autophagy – unanswered questions. *J Cell Sci* **124**, 161–170.
51. Cuervo A (2004) Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem* **263**, 55–72.
52. Kim J, Kundu M, Viollet B, *et al.* (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* **13**, 132–141.
53. Mizushima N & Yoshimori T (2007) How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* **3**, 542–545.
54. Klionsky DJ, Abdalla F, Abeliovich H, *et al.* (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **8**, 445–554.
55. Mordier S, Deval C, Béchet D, *et al.* (2000) Leucine limitation induces autophagy and activation of lysosome-dependent proteolysis in C2C12 myotubes through a mammalian target of rapamycin-independent signaling pathway. *J Biol Chem* **275**, 29900–29906.
56. Lorin S, Tol MJ, Bauvy C, *et al.* (2013) Glutamate dehydrogenase contributes to leucine sensing in the regulation of autophagy. *Autophagy* **9**, 850–860.
57. Mammucari C, Milan G, Romanello V, *et al.* (2007) FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle *in vivo*. *Cell Metab* **6**, 458–471.
58. Füllgrabe J, Klionsky DJ & Joseph B (2013) Histone post-translational modifications regulate autophagy flux and outcome. *Autophagy* **9**, 1621–1623.
59. Attaix D & Taillandier D (1998) The critical role of the ubiquitin–proteasome pathway in muscle wasting in comparison to lysosomal and Ca²⁺-dependent systems. In *Advances in Molecular and Cell Biology*, pp. 235–266 [EE Bittar and AJ Rivett, editors]. Stamford, CT: JAI Press.
60. Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, *et al.* (1999) Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin–proteasome pathway in normal and disease states. *J Nutr* **129**, 227S–237S.
61. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, *et al.* (2004) Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J* **18**, 39–51.
62. Kumamoto T, Fujimoto S, Ito T, *et al.* (2000) Proteasome expression in the skeletal muscles of patients with muscular dystrophy. *Acta Neuropathol (Berl)* **100**, 595–602.
63. Glass DJ (2010) Signaling pathways perturbing muscle mass. *Curr Opin Clin Nutr* **13**, 225–229.
64. Bonaldo P & Sandri M (2013) Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech* **6**, 25–39.
65. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, *et al.* (2013) Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J* **280**, 4294–4314.
66. Tesseraud S, Bouvarel I, Collin A, *et al.* (2009) Daily variations in dietary lysine content alter the expression of genes related to proteolysis in chicken pectoralis major muscle. *J Nutr* **139**, 38–43.
67. Frost RA, Nystrom GJ, Jefferson LS, *et al.* (2007) Hormone, cytokine, and nutritional regulation of sepsis-induced increases in atrogin-1 and MuRF1 in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**, E501–E512.
68. Sandri M (2013) Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy–lysosome and ubiquitin–proteasome. *Int J Biochem Cell Biol* **45**, 2121–2129.
69. Cohen S, Zhai B, Gygi SP, *et al.* (2012) Ubiquitylation by Trim32 causes coupled loss of desmin, Z-bands, and thin filaments in muscle atrophy. *J Cell Biol* **198**, 575–589.
70. Hishiya A, Iemura S, Natsume T, *et al.* (2006) A novel ubiquitin-binding protein ZNF216 functioning in muscle atrophy. *EMBO J* **25**, 554–564.

PUBLICATION 3

3-Caractérisation des limites de la mesure du "flux autophagique" *in vivo*

Objectifs

Comme déjà décrit dans la revue bibliographique (partie 3.2), une des principales limites à la mesure du taux de LC3-II comme marqueur de la formation des autophagosomes est que cette protéine est à la fois produite et dégradée au cours de l'autophagie ; on parle de "flux autophagique". Ainsi, l'augmentation du taux de LC3-II peut tout aussi bien représenter une induction de la formation des autophagosomes qu'une inhibition des étapes qui suivent leur formation (fusion avec le lysosome ou dégradation du contenu séquestré par les autophagosomes dont LC3-II). Une solution pour pallier ce problème est de bloquer le flux autophagique par l'emploi d'agents pharmacologiques capables d'inhiber l'une des étapes en aval de la formation des autophagosomes. Dans ces conditions, une variation du taux de LC3-II ne peut être attribuée qu'à une variation de la formation des autophagosomes. Cette démarche appelée "mesure du flux autophagique" est aujourd'hui très répandue dans les études *in vitro* mais reste encore peu développée *in vivo* (Klionsky et al., 2012). Toutefois, un certain nombre d'études ont récemment démontré la faisabilité de mesurer le flux autophagique *in vivo* en traitant des souris (par injection-intrapéritonéale) avec des inhibiteurs pharmacologiques comme la chloroquine (Grumati et al., 2010), la leupeptine (Haspel et al., 2011) ou la colchicine (Ju et al., 2010). Bien que ces essais semblent très prometteurs, une limite importante à leur utilisation est le temps de traitement relativement long (12 à 24h) nécessaire au blocage du flux autophagique (Klionsky et al., 2012). En effet, il est possible que l'utilisation prolongée de ces inhibiteurs puisse induire des effets collatéraux et affecter (directement ou indirectement) la mesure même du flux autophagique. Paradoxalement, les conséquences de ces traitements prolongés n'ont fait l'objet que de très peu d'attention. Dans ce contexte et afin de parfaire nos deux premières études dans lesquelles l'activité autophagique n'était appréciée que par la mesure du taux de LC3-II (sans aucun traitement pharmacologique), **les objectifs de cette étude étaient de déterminer (i) s'il est possible de mesurer le flux autophagique dans le muscle de truite arc-en-ciel et (ii) s'il y a des effets "secondaires" liés à l'utilisation prolongée des inhibiteurs de flux autophagique chez cette espèce.**

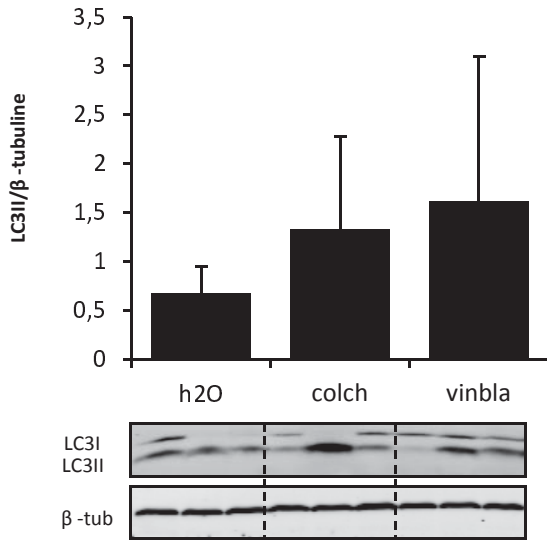


Figure 18 : Evolution de la quantité de LC3-II dans le muscle de truites traitées avec différents inhibiteurs du flux autophagique.

Injection intra-péritonéale de différentes drogues pendant 2 jours. La quantité de LC3-II/β-tubuline a été mesurée par western blot à partir d'extrait protéique de muscle.

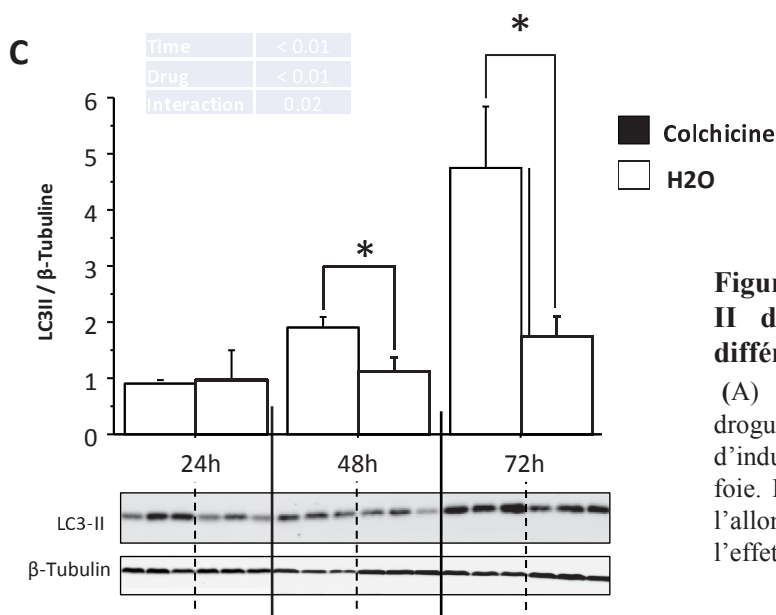
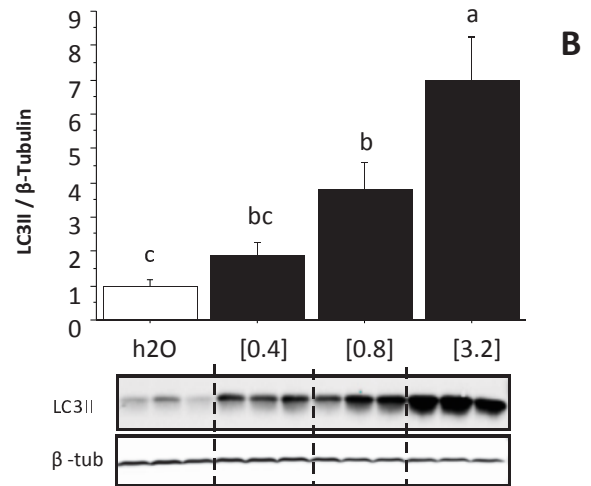
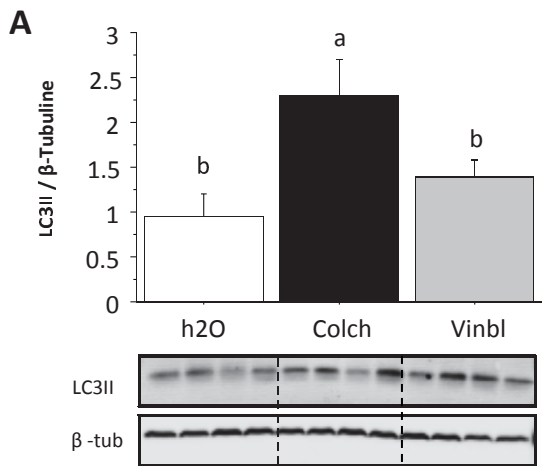


Figure 19 : Evolution de la quantité de LC3-II dans le foie de truites traitées avec différents inhibiteurs du flux autophagique

(A) Injection intra-péritonéale de différentes drogues pendant 2 jours. La colchicine permet d'induire significativement le taux de LC3-II dans le foie. En outre, l'augmentation de cette dose (B) ou l'allongement de la durée de traitement (C) accentue l'effet de la drogue dans ce tissu.

Principaux résultats et conclusions

Les différents essais effectués dans cette étude n'ont pas permis de mesurer le flux autophagique dans le muscle de truite arc-ciel. En effet, quels que soient la drogue injectée, la dose administrée ou le temps de traitement, le taux de LC3-II est resté inchangé dans le muscle (Figure 18 non incluse dans l'article). Par contre, les résultats obtenus montrent clairement qu'une injection intra-péritonéale de colchicine à une concentration de 0.4 mg/kg/jour pendant 2 jours permet d'induire significativement le taux de LC3-II dans le foie (Figure 19A). En outre, l'augmentation de cette dose ou l'allongement de la durée de traitement accentuent l'effet de la drogue dans ce tissu (Figures 19B et C). Les raisons de l'absence d'effet des drogues administrées dans le muscle restent non élucidées et seront largement discutées dans la discussion générale. Toutefois, la différence de résultats entre le foie et le muscle reflète probablement des différences de cinétique d'induction de l'autophagie ou des différences d'accessibilité des drogues entre les deux tissus. Elles soulignent ainsi la complexité des études *in vivo* et la nécessité d'adapter et d'optimiser les protocoles à chaque cas (tissus, âge des animaux, sexe, etc...).

Le second objectif de cette étude était de déterminer les potentiels effets "collatéraux" liés à l'utilisation prolongée des inhibiteurs de flux autophagique chez la truite arc-en-ciel. Les résultats obtenus montrent que l'injection intra-péritonéale de colchicine à une concentration de 0.8 mg/kg/jour inhibe significativement le taux de glucose plasmatique après deux jours de traitement. Ce résultat s'apparente à des données, récemment publiées à partir des souris *dont le gène Atg7 a été spécifiquement invalidé dans le foie*, montrant que durant le jeûne, l'autophagie hépatique joue un rôle important dans le maintien de la glycémie en permettant la libération d'acides aminés pour la production de glucose via la néoglucogenèse (Ezaki et al., 2011). En ce sens, nos résultats montrent une inhibition de l'expression des gènes de la néoglucogenèse chez les poissons traités à la colchicine.

Outre la baisse de la glycémie, les poissons traités à la colchicine présentaient une stéatose hépatique associée à une augmentation du niveau de triglycérides dans le foie ainsi qu'une induction de l'expression des gènes ADRP et TIP47 codant pour des protéines spécifiques des gouttelettes lipidiques. Ces résultats corroborent les données publiées par Singh et al. en 2009, montrant que des souris à jeun dont le gène *Atg7* a été spécifiquement invalidé dans le foie présentent une augmentation du nombre et de la taille des gouttelettes lipidiques, du niveau de triglycérides et des marqueurs ADRP et TIP47 dans cet organe. Les auteurs de

cette étude démontrent que ces effets sont dus à l'absence, chez les souris invalidées, de dégradation des gouttelettes lipidiques par l'autophagie, un processus appelé lipophagie (Singh et al., 2009a). En ce sens, nos résultats suggèrent que la stéatose hépatique observée chez les poissons traités à la colchicine soit liée à un défaut de lipophagie.

Enfin, nous montrons une induction significative du niveau des ARNm spécifique des gènes induits par le stress du réticulum endoplasmique (*CHOP* et *asparagine synthetase*) mais également des gènes de l'autophagie (*sqstm1* et *Atg4b*) et du lysosome (*ATPaseV1a* et *Cathepsin D*) chez les poissons traités à la colchicine par rapport aux poissons témoins. Ces résultats, qui pourraient être liés au stress du réticulum endoplasmique induit par la stéatose hépatique (Birkenfeld et al., 2011; Yang et al., 2010; Zhou and Liu, 2010), montrent clairement que l'utilisation prolongée de colchicine affecte (directement ou indirectement) le renouvellement de la machinerie du système autophagie-lysosomal. Ainsi, cet effet pourrait avoir un effet direct sur le flux autophagique et fausser l'estimation même de l'activité autophagique.

En conclusion, les résultats obtenus dans cette étude démontrent la faisabilité des mesures du flux autophagique *in vivo* dans le foie (et pas le muscle) de truite arc-en-ciel, en utilisant la colchicine comme inhibiteur de flux. Cependant, ils montrent également que la concentration et/ou la période de temps de traitement nécessaire pour bloquer le flux autophagique *in vivo* affectent profondément l'homéostasie métabolique et cellulaire. Bien que nous ne puissions pas exclure la possibilité que les effets observés soient indépendants à l'inhibition de l'autophagie, les résultats obtenus correspondent étroitement aux données publiées à partir de souris dont l'autophagie hépatique a été génétiquement invalidée. Ainsi, ils soulignent l'importance de tenir compte de ces effets lors de l'utilisation, non seulement de la colchicine, mais également des autres inhibiteurs de flux autophagique.

Looking at the limits of *in vivo* autophagic flux assays

Ikram Belghit, Sandrine Skiba-Cassy, Karine Dias, Stéphane Panserat, Iban Seiliez*

INRA, UR1067 Nutrition Métabolisme Aquaculture, F-64310 St-Pée-sur-Nivelle, France.

Short title: Colchicine affects hepatic metabolism in trout

Number of figures: 5

Number of tables: 1

Keywords: Autophagic flux, colchicine, LC3-II, hepatic metabolism, trout.

***Corresponding author:**

Iban Seiliez

INRA, UR1067 Nutrition Métabolisme Aquaculture

F-64310 Saint-Pée-sur-Nivelle, France

Tel: (33) 5 59 51 59 99; Fax (33) 5 59 54 51 52

[e-mail:seiliez@st-pee.inra.fr](mailto:seiliez@st-pee.inra.fr)

ABSTRACT

Monitoring autophagic flux *in vivo* or in organs remains limited and the ideal methods relative to the techniques possible with cell culture may not exist. Recently, few papers have demonstrated the feasibility of measuring autophagic flux *in vivo* by intraperitoneal (IP) injection of pharmacological agents (chloroquine, leupeptin, vinblastine, and colchicine). However, the metabolic consequences of the administration of these drugs remain largely unknown. Here, we report that 0.8 mg/kg/day IP colchicine increased LC3-II protein levels in the liver of fasted trout, supporting the usefulness of this drug for studying autophagic flux *in vivo* in our model organism. This effect was accompanied by a decrease of plasma glucose concentration associated to a fall in the mRNA levels of gluconeogenesis-related genes. Concurrently, triglycerides content in the liver as well as the hepatic mRNA expression of the two lipid droplets markers ADRP and TIP47 increased. In contrast, transcript levels of β -oxidation-related gene Cpt1a dropped significantly. Together, these results match with the reported role of autophagy in the regulation of glucose homeostasis and intracellular lipid stores and highlight the importance to consider these effects when using colchicine as an *in vivo* “autophagometer”.

INTRODUCTION

Autophagy functions as an important catabolic mechanism by mediating the turnover of intracellular organelles and protein complexes through a lysosome dependent degradative pathway. This system involves dynamic rearrangements of double-membrane organelles called autophagosome, which engulf a portion of cytoplasm for its degradation via the lysosome. One of the primary roles of autophagy is to allow cell survival under stress conditions, through the bulk degradation of intracellular organelles and protein complexes to produce amino acids, nucleotides, sugars and fatty acids that can be used for the metabolic compensation. However, basal autophagy makes also a substantial contribution to cellular quality control. Accordingly, liver-, brain-, and muscle-specific autophagy deficient mice exhibited cumulative effects of impaired basal autophagy, which is responsible for diverse pathological symptoms [1-4].

One of the most widely monitored autophagy-related proteins is LC3 (Atg8 in yeast). This ubiquitin-like molecule binds covalently to phosphatidylethanolamine (PE) on the autophagosomal membrane to form LC3-II, which is a good indicator of autophagosome formation [5, 6]. The non-lipitated form of LC3 (LC3-I) can be recruited for the autophagosome renewal. The measure of the conversion of LC3-I to LC3-II by immunoblot is a reliable indicator of autophagic activity. However, this method needs to be completed by assays to estimate overall autophagic flux or flow, since LC3-II is both induced and degraded during autophagy. Several studies have investigated in depth autophagy flux assay in mammalian cell culture models, and reported that the exposure of cells to lysosomal inhibitors, protease inhibitors or agent that block fusion of autophagosome with lysosomes consequently leads to LC3-II accumulation in autolysosomes, which can be quantitatively measured [6, 7].

Nevertheless, measuring autophagic flux *in vivo* is not as advanced as in cell culture [6]. The major hurdle with *in vivo* analyses is the ability to “block” autophagosome degradation by the administration of pharmacological agents. Several studies have successfully done this in select tissues *in vivo* by treating mice with, for example, chloroquine [8], leupeptin [9] or colchicine [10] and then monitoring the change in accumulation of LC3-II. However, a critical difference between an *in vitro* and *in vivo* autophagic flux assay is the time period of the treatment. Whereas in cultured cells one can treat with bafilomycinA1 for short period of time (e.g., 4 h) and achieve a block in autophagosome-lysosome fusion, this is

not feasible *in vivo* with any of the used drugs that need longer treatment (12-24 h) [6]. As a consequence, the prolonged use of these drugs could induce collateral effect that might directly or indirectly affect autophagy. For instance, Ju et al [10] reported that both LC3-I and LC3-II levels increased in skeletal muscle of mice treated with colchicine beyond five days, suggesting that the long period treatments induce autophagic flux blockage but also an enhancement of autophagy. This up-regulation in autophagy could be explained by the compensatory effects of blocking agents used for long period. In this regard, the consequence of these prolonged treatments has never been reported so far, thus the metabolic consequences of the drugs administration *in vivo* are not known.

To clarify this issue, we first tested three different pharmacological drugs for their ability to block LC3-II degradation. We reported that 0.8 mg/kg/day IP injection of colchicine increased LC3-II protein levels in the liver of fasted trout. We then analyzed the consequences of this drug on the liver metabolism, by assessing plasma and liver metabolites but also the genes expression of key metabolic pathways in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Particular attention was paid to characteristics of this carnivorous fish by the long period of fasting during their lifecycle but also the unusual features (i.e., a high dietary protein requirement combined with an apparent inability to metabolize dietary carbohydrates). As such, they emerged as a relevant model organism for studying the long-term induction of autophagy as well the nutritional regulation of this degradative pathway.

RESULTS

Colchicine promoted an increase of LC3II in the liver of trout

We first tested three different lysosomotropic agents (chloroquine, vinblastine and colchicine) for their ability to block autophagosome degradation *in vivo* [10]. We treated juvenile immature rainbow trout with intraperitoneal (IP) vehicle, 50 mg/kg/day chloroquine, 0.4 mg/kg/day colchicine or 2 mg/kg/day vinblastine for two days and then isolated the liver. Chloroquine treatment resulted in animal death on day 2, revealing high toxicity of this drug in this species. For the other two drugs, no weight loss or distress was seen after the two days of treatment (data not shown). The liver was homogenized and the resultant lysate was subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with an antibody to LC3. The ratio of LC3-II to β -tubulin was significantly elevated in the colchicine but no vinblastine treated trout in comparison to the vehicle treated fish (Fig.1A).

To define the best conditions for measuring autophagic flux in trout, we then tested different doses of colchicine treatment. Fish received IP-injection of three doses of colchicine (0.4, 0.8 and 3.2 mg/kg/day) that produced a strong, dose-dependent, increase in LC3-II to β -tubulin ratio in the liver (Fig 1B). Fish were then treated with vehicle or 0.8 mg/kg/day colchicine for 24, 48 and 72h in order to determine the rate of LC3-II accumulation after colchicine injection. As shown in Figure 1C, compared to vehicle treated trout, colchicine injection lead to a significant increase of LC3-II to β -tubulin ratio from the day 2 of treatment.

Overall, these results indicated that colchicine treatment is able to block autophagosome degradation in trout liver and validated the use of this drug for measuring autophagic flux in this species.

Colchicine treatment affects the carbohydrates metabolism

Having demonstrated that colchicine is able to block autophagic flux in the liver of rainbow trout, we addressed the question of colchicine treatment induced metabolic changes. As shown in Figure 2A, compared with control groups, plasma glucose concentration decreased significantly from the day 2 of colchicine treatment. This lower blood glucose levels in colchicine treated fish did not seem to result from decreased glycogenolysis or glycophagy, because the decrease in glycogen levels induced by starvation was comparable in both groups of animals (Fig. 2B). In contrast, we found that colchicine injected fish

displayed significant lower mRNA levels of gluconeogenesis-related genes G6Pase, FBPase and PEPCK from the day 2 of treatment (Fig 2C).

Overall, these results show that autophagy inhibition perturb glucose metabolism in trout liver.

Colchicine treatment leads to hepatosteatosis

Colchicine injected fish exhibited enlarged and discolored liver from the day 2 of treatment (data not shown). This was accompanied by a concomitant increase of hepatic triglycerides (TG) content as well as a significant rise of the mRNA levels of ADRP and TIP47, two critical regulators of hepatic neutral lipid storage (Fig. 3). Thus, these results suggest that inhibition of autophagy by colchicine treatment induces hepatic steatosis.

However, the observed accumulation of TG in colchicine treated fish could also originate from autophagy-independent side effects induced by the administrated drug. We therefore examined the expression of several genes involved in lipid metabolism. As shown in Figure 4A, the mRNA expression of all monitored lipogenic genes (G6PDH, FAS, ME and SREBP1) remained unchanged between control and colchicine injected fish throughout the starvation periods. In contrast, the mRNA levels of the lysosomal acid lipase A1 (LIPA1) and hormone-sensitive lipase 1 (HSL1) strongly increased in colchicine treated fish, consistent with reduced substrate delivery to lysosome rather than reduced lysosomal or cytosolic enzymatic machinery (Fig. 4B). Also, supporting a fall in the levels of free fatty acids generated by TG hydrolysis, the mRNA levels of two main β -oxidation-related genes (CPT1a and HOAD) significantly decreased in colchicine treated fish (Fig. 4C).

Overall, the obtained results show that colchicine treatment induces hepatic steatosis and link this effect to autophagy inhibition.

Colchicine treatment induces ER stress markers

Obesity and liver steatosis have been shown to induce ER stress [11-13]. We therefore monitored in colchicine treated and non-treated fish the expression of two ER stress-induced genes, CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) homology protein (CHOP) and Asparagine Synthetase (AS), as well as that of several autophagy- (SQSTM1, Atg4b) and lysosome- (ATPaseV1a and CathD) related genes. As shown in Figure 5, the mRNA levels of all monitored genes were significantly increased from the day 2 of colchicine treatment.

DISCUSSION

Reliable and quantitative assays to measure *in vivo* autophagy are essential. Currently, there are varied methods for monitoring autophagy; however, it remains a challenge to measure “autophagic flux” in an *in vivo* model system. In the present study, we first describe the feasibility of monitoring autophagic flux *in vivo* in rainbow trout by using colchicine. Although the principle of this colchicine-based assay have been described in mice [10], this report broadens its utility to another organism, the rainbow trout. Interestingly, the obtained results showed that two days of colchicine treatment are necessary to show a significant increase of LC3-II, in line with previous finding in mice. This represents a critical difference with the short period of time (2-4 h) necessary to block autophagosome-lysosome fusion with bafilomycin A1 in many cell culture systems including trout myoblasts [6, 14]. The reason for this difference is not known and could be related to the inhibitory capacity of the used drugs. However, the level of basal autophagy, the time course of autophagic induction and the bioavailability of autophagy-inhibiting drugs may also contribute to this difference. In this regard, basal autophagy or sensitivity to autophagic induction may also vary with tissue, animal age, sex, or strain background and the protocol (dose and time period of treatment) may need to be optimized in each case.

One major limitation of the *in vivo* autophagic flux assay is the “toxicity” of the blocking agent (at the concentration and the time period of treatment necessary to block autophagosome degradation) that may affect and invalidate the measurement of the autophagic flux *per se* [6]. It has thus been shown in mice that increasing doses of colchicine to achieve a complete block in LC3-II degradation had lethal consequences as did the addition of a second “blocking” agent [10]. Moreover, the authors of this study reported that both LC3-I and LC3-II levels are elevated when mice are treated with colchicine beyond five days, suggesting that both an enhancement and blockage of autophagy is occurring with prolonged treatment. In the present study, fish treated with colchicine did not exhibit weight loss or distress. However, they presented a significant decrease in plasma glucose levels associated to a fall in the mRNA levels of gluconeogenesis-related genes from the day 2 of treatment. Recently, Ezaki et al [15] demonstrated in mice that liver autophagic proteolysis makes a significant contribution to the maintenance of blood glucose during fasting by releasing amino acids for glucose production *via* gluconeogenesis. In liver-specific autophagy (*Atg7*)-deficient mice, no amino acid release occurred and blood glucose levels continued to

decrease in contrast to those of wild-type mice. Similarly, autophagy induction has been shown to be critical during the fasting period between birth and suckling for the production of amino acids used to sustain plasma glucose levels via gluconeogenesis [16]. In this study, fasted neonates mice expressing a constitutively active form of RagA (RagA^{GTP}) failed to induce autophagy and to produce amino acids for *de novo* glucose production. Consequently, the lower levels of gluconeogenic amino acids reduced hepatic generation of glucose, ultimately leading to hypoglycaemia, energetic exhaustion, and accelerated neonatal death. Collectively, these data highlight the importance of autophagy in the control of blood glucose levels and indicate that a prolonged inhibition of this system to measure autophagic flux could profoundly perturb glucose homeostasis.

In addition to a decrease in plasma glucose levels, colchicine treated trout exhibited a hepatosteatosis associated to a marked increase in the level of liver TG as well as a significant rise of the hepatic mRNA levels of two lipid droplets (LD) markers ADRP and TIP47. Recently, hepatic steatosis and liver injury were also shown to be exacerbated by chloroquine treatment in alcoholic and non-alcoholic fatty liver condition in mice [17], supporting a direct effect of autophagy inhibition in the observed phenotype. In this regard, liver-specific autophagy (*Atg7*)-deficient mice have been shown to display increased oil red O staining of liver sections, hepatic TG accumulation after starvation and LD-associated proteins ADRP and TIP47 compared to wild type mice [18]. Furthermore, to determine how autophagy regulates TG levels, the authors examined rates of TG synthesis and free fatty acid (FFA) β -oxidation in *Atg5*-knockdown hepatocytes (*siAtg5* cells). Equivalent rates of TG synthesis occurred in control and *siAtg5* cells. In contrast rates of β -oxidation, indicative of the levels of FFA generated by TG hydrolysis [19], were slower in cells with inhibited autophagy, consistent with reduced lipolysis. Overall, our results on the expression of lipid metabolism-related genes support these previous findings and suggest that the hepatosteatosis induced by colchicine treatment results to lipophagy impairment.

Obesity and liver steatosis have been shown to induce ER stress. For instance, mice with high fat feeding not only develop hepatic steatosis, insulin resistance, and type 2 diabetes, but also exhibit ER stress markers in liver and other tissues [11-13]. Thus, ER stress and hepatic steatosis can form a positive feedback loop to further amplify liver inflammation and injury. Here, we show that mRNA levels of two ER stress-induced genes, namely CHOP and Asparagine Synthetase, were significantly increased from the day 2 of colchicine treatment. Beyond a simple ER-stress marker, CHOP encodes a ubiquitous transcription

factor that is one of the most important components in the network of stress-inducible transcription [20-24]. In this regard, recent studies have identified CHOP as a direct regulator of numerous genes involved in the autophagic process [25-27]. Here, we show that the increase of transcripts levels of several autophagy- and lysosome-related genes in colchicine treated fish paralleled that of CHOP mRNA supporting these previous studies. Moreover, whether or not these results are linked to the hepatic steatosis-induced CHOP activation, they clearly indicate that prolonged colchicine treatment strongly induce the expression of autophagy- and lysosome-related genes, which may affect and invalidate the measurement of the autophagic flux *per se*.

Together, the results presented here demonstrated the feasibility of monitoring autophagic flux *in vivo* in rainbow trout by using colchicine. However, they also show that the concentration and/or the time period of treatment necessary to block autophagosome degradation *in vivo* profoundly affect metabolic and cellular homeostasis. While we cannot rule out the possibility that the observed effects are independent to autophagy inhibition, the obtained results match closely with the reported role of this degradative system, highlighting the importance to consider these effects when using not only colchicine but all autophagy blockers as *in vivo* “autophagometers”.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Chloroquine diphosphate salt (C6628), colchicine (C9754) and vinblastine sulfate salt (V1377) were purchased from Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com).

Experimental procedures

The experiments were carried out in accordance with the EU legal frameworks, specifically those relating to the protection of animals used for scientific purposes (i.e., Directive 2010/63/EU), and under the French legislation governing the ethical treatment of animals (Decret no. 2001-464, May 29th, 2001). The investigators carrying out the experiment had “level 1” or “level 2” certification, bestowed by the Direction Départementale des Services Vétérinaires (French veterinary services) to carry out animal experiments (INRA 2002-36, April 14th, 2002).

Juvenile immature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were reared in the INRA experimental facilities at Donzacq (Landes, France) at a constant water temperature of 17.5 ± 0.5 °C, under natural photoperiod. They were fed a standard trout commercial diet (T-3P classic, Skretting, Fontaine-les-Vervins, France) during the acclimatization period. Prior to the intraperitoneal (IP) administration, fish (mean body mass 130 g) were food deprived for 24 h (minimal time required to ensure the emptying of the digestive tract). After this period, trout were sedated with benzocaine (10 mg/L), and chloroquine (50 mg/kg/day), vinblastine (2 mg/kg/day), colchicine (0.4, 0.8 or 3.2 mg/kg/day) or vehicle (water) was IP injected at 100 μ L/100 g body mass for 1, 2 or 3 days (as specified in the figure legends) under nutrient-starvation conditions. Then, according to each experimental design, six fish per treatment were sampled at different times specified in figure legends. Trout were anaesthetized with benzocaine (30 mg/L) and killed by a sharp blow to the head. Blood was removed from the caudal vein into heparinized syringes and centrifuged (3000g, 5 min); the recovered plasma was immediately frozen and kept at -20°C . Livers were dissected and immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C .

Analytical methods

Plasma glucose and liver TG were undertaken with Glucose RTU (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) and TR GPO PAP (SOBIODA, Montbonnot, France) kits, respectively adapted to a microplate format, according to the recommendations of each manufacturer

Protein Extraction and Western Blotting

Protein homogenates from livers were prepared as previously described [28]. Protein concentrations were determined with the Bradford reagent method [29]. Lysates (10 µg of total protein) were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with an antibody to LC3B (Cell Signaling Technologies, 2775) and β-tubulin (Cell Signaling Technologies, 2146). These primary antibodies have been shown to cross-react successfully with rainbow trout proteins of interest [30-32]. After washing, membranes were incubated with an IRDye infrared secondary antibody (LI-COR Inc, 956-32221). Bands were visualized by Infrared Fluorescence using the Odyssey® Imaging System and quantified by Odyssey infrared imaging system software (Application software, version 1.2).

mRNA levels analysis: quantitative RT-PCR

The extraction of total RNA was performed using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. One microgram of the resulting total RNA was reverse transcribed into cDNA, using the SuperScript III RNaseH-reverse transcriptase kit (Invitrogen) with random primers (Promega, Charbonnières, France) according to the manufacturer's instructions. The primer sequences used in the quantitative real-time PCR, as well as the protocol conditions of the assays, have been previously published [31, 33]. Primers of the ADRP, TIP47, ATPaseV1a and CHOP genes were newly designed using Primer3 software, as previously described [34]. To confirm specificity of the newly developed RT-PCR assay, the amplicon was purified and sequenced (Beckman-Coulter Genomics, Takeley, UK). The primers used for real-time RT-PCR assays are listed in table 1. Quantitative RT-PCR was carried out on the Roche LightCycler 480 System (Roche Diagnostics, Neuilly sur Seine, France). The assays were performed using a reaction mix of 6 µl per sample, each of which contained 2 µl of diluted cDNA template, 0.24 µl of each primer (10 µM), 3 µl Light Cycler 480 SYBRH Green I Master mix and 0.52 µl DNase/RNase free water (5 Prime GmbH, Hamburg, Germany). The PCR protocol was

initiated at 95°C for 10 min for initial denaturation of the cDNA and hot-start Taq-polymerase activation, followed by 45 cycles of a three-step amplification programme (15 s at 95°C; 10 s at 60–64°C and 15 s at 72°C), according to the primer set used (Table 1). Melting curves were systematically monitored (temperature gradient at 1.1°C/10 s from 65–94°C) at the end of the last amplification cycle to confirm the specificity of the amplification reaction. Each PCR assay included replicate samples (duplicate of reverse transcription and PCR amplification, respectively) and negative controls (reverse transcriptase- and cDNA template-free samples, respectively). For the expression analysis of mRNA, relative quantification of target gene expression was performed using the delta CT method described by Pfaffl [35]. The relative gene expression of EF1 α was used for the normalization of measured mRNA and did not significantly change over time (data not shown). In all cases, PCR efficiency (E) was measured by the slope of a standard curve using serial dilutions of cDNA. In all cases, PCR efficiency values ranged between 1.8 and 2.2.

Statistical Analysis

The data were expressed as means \pm SEM (n=6). The effects of time, IP administration of vehicle or drug and their interaction were analyzed using two-way ANOVA, followed by a Student-Newman-Keuls test when the interaction was significant. For all statistical analyses, the level of significance was set at $P < 0.05$.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the INRA “Animal Physiology and Livestock Systems” Division. We acknowledge V Véron and A Hermann for the analysis of plasma glucose and liver TG composition of the fish. Special thanks are due to S Pennarun for technical assistance as well as to the technical staff at the fish farm (F. Vallée, F. Terrier, A. Lanuque, F. Sandres).

REFERENCES

1. Komatsu, M., et al., *Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice*. Nature, 2006. **441**(7095): p. 880-884.
2. Hara, T., et al., *Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice*. Nature, 2006. **441**(7095): p. 885-889.
3. Masiero, E., et al., *Autophagy Is Required to Maintain Muscle Mass*. Cell Metabolism, 2009. **10**(6): p. 507-515.
4. Takamura, A., et al., *Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors*. Genes Dev, 2011. **25**(8): p. 795-800.
5. Mizushima, N. and T. Yoshimori, *How to Interpret LC3 Immunoblotting*. Autophagy, 2007. **3**(6): p. 542-545.
6. Klionsky, D.J., et al., *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy*. Autophagy, 2012. **8**(4): p. 445-554.
7. Mizushima, N., T. Yoshimori, and B. Levine, *Methods in Mammalian Autophagy Research*. Cell, 2010. **140**(3): p. 313-326.
8. Grumati, P., et al., *Autophagy is defective in collagen VI muscular dystrophies, and its reactivation rescues myofiber degeneration*. Nat Med, 2010. **16**(11): p. 1313-1320.
9. Haspel, J., et al., *Characterization of macroautophagic flux in vivo using a leupeptin-based assay*. Autophagy, 2011. **7**(6): p. 629-42.
10. Ju, J.-S., et al., *Quantitation of "autophagic flux" in mature skeletal muscle*. Autophagy, 2010. **6**(7): p. 929-935.
11. Yang, L., et al., *Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance*. Cell Metab, 2010. **11**(6): p. 467-78.
12. Zhou, L. and F. Liu, *Autophagy: roles in obesity-induced ER stress and adiponectin downregulation in adipocytes*. Autophagy, 2010. **6**(8): p. 1196-7.
13. Birkenfeld, A.L., et al., *Influence of the hepatic eukaryotic initiation factor 2alpha (eIF2alpha) endoplasmic reticulum (ER) stress response pathway on insulin-mediated ER stress and hepatic and peripheral glucose metabolism*. J Biol Chem, 2011. **286**(42): p. 36163-70.
14. Seiliez, I., et al., *Amino acids downregulate the expression of several autophagy-related genes in rainbow trout myoblasts*. Autophagy, 2012. **8**(3): p. 364-375.
15. Ezaki, J., et al., *Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels*. Autophagy, 2011. **7**(7): p. 727-736.

16. Efeyan, A., et al., *Regulation of mTORC1 by the Rag GTPases is necessary for neonatal autophagy and survival*. Nature, 2013. **493**(7434): p. 679-83.
17. Lin, C.W., et al., *Pharmacological promotion of autophagy alleviates steatosis and injury in alcoholic and non-alcoholic fatty liver conditions in mice*. J Hepatol, 2013. **58**(5): p. 993-9.
18. Singh, R., et al., *Autophagy regulates lipid metabolism*. Nature, 2009. **458**(7242): p. 1131-1135.
19. Owen, O.E., et al., *Energy metabolism in feasting and fasting*. Adv Exp Med Biol, 1979. **111**: p. 169-88.
20. 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, 1997. **272**(28): p. 17588-93.
21. Ohoka, N., et al., *TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death*. EMBO J, 2005. **24**(6): p. 1243-55.
22. Su, N. and M.S. Kilberg, *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**(50): p. 35106-17.
23. Wang, X.Z., et al., *Identification of novel stress-induced genes downstream of chop*. EMBO J, 1998. **17**(13): p. 3619-30.
24. Sok, J., et al., *CHOP-Dependent stress-inducible expression of a novel form of carbonic anhydrase VI*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(1): p. 495-504.
25. Rouschop, K.M., et al., *The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5*. J Clin Invest, 2010. **120**(1): p. 127-41.
26. B'chir, W., et al., *The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression*. Nucleic Acids Research, 2013. **41**(16): p. 7683-7699.
27. 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, 2014. **26**(7): p. 1385-91.
28. Seiliez, I., et al., *An in vivo and in vitro assessment of TOR signaling cascade in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)*. American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2008. **295**(1): p. R329-R335.

29. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 1976. **72**(1–2): p. 248-254.
30. 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, 2013. **8**(9): p. e74308.
31. Belghit, I., et al., *Dietary methionine availability affects the main factors involved in muscle protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)*. Br J Nutr, 2014. **112**(4): p. 493-503.
32. Seiliez, I., K. Dias, and B.M. Cleveland, *The contribution of the autophagy-lysosomal and ubiquitin-proteasomal proteolytic systems to total proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) myotubes*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2014.
33. Seiliez, 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*. American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2011. **300**(3): p. R733-R743.
34. Seiliez, I., et al., *An in vivo and in vitro assessment of autophagy-related gene expression in muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)*. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology, 2010. **157**(3): p. 258-266.
35. Pfaffl, M (*REST*©) *for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*. Nucleic Acids Research, 2002. **30**(9): p. e36.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. (A), Representative LC3-II and β -tubulin immunoblots of liver homogenates from trout treated with water, 2 mg/kg/day vinblastine or 0.4, mg/kg/day colchicine for two days. Graph represents the ratio between LC3-II and β -tubulin used as loading control. Different letters represent significantly different values ($p < 0.05$, $n = 6$). (B), Representative LC3-II and β -tubulin immunoblots of liver homogenates from trout treated with water, 0.4, 0.8 or 3.2 mg/kg/day colchicine for one day. Graph represents the ratio between LC3-II and β -tubulin used as loading control. Different letters represent significantly different values ($p < 0.05$, $n = 6$). (C), Representative LC3-II and β -tubulin immunoblots of liver homogenates from trout treated with water or 0.8 mg/kg/day colchicine for one, two or three days. Graph represents the ratio between LC3-II and β -tubulin used as loading control. * was used to indicate significant difference between treatment ($P < 0.05$, $n = 6$).

Figure 2. Trout were treated with water or 0.8 mg/kg/day colchicine for one, two or three days. (A), Plasma glucose levels (* $P < 0.05$, $n = 6$). (B), Hepatic glycogen levels (* $P < 0.05$, $n = 6$). (C), Hepatic mRNA levels of the gluconeogenesis-related genes G6Pase1, G6Pase2, FBPase and PEPCK. Expression values are normalized with EF1-expressed transcripts (* $P < 0.05$, $n = 6$).

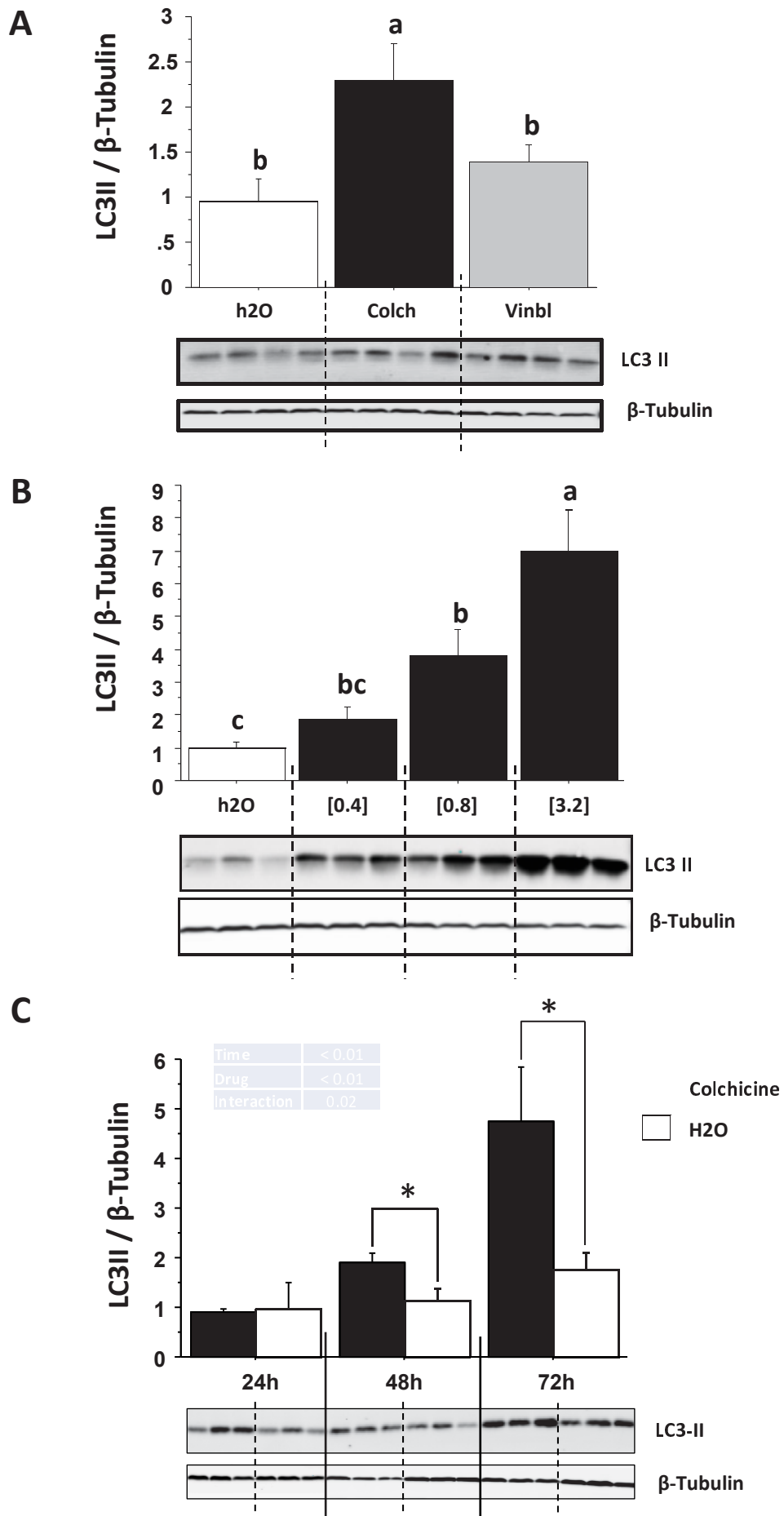
Figure 3. Trout were treated with water or 0.8 mg/kg/day colchicine for one, two or three days. (A), Hepatic TG levels (* $P < 0.05$, $n = 6$). (B), Hepatic mRNA levels of ADRP and TIP47. Expression values are normalized with EF1-expressed transcripts (* $P < 0.05$, $n = 6$).

Figure 4. Trout were treated with water or 0.8 mg/kg/day colchicine for one, two or three days. Hepatic mRNA levels of (A) lipogenic genes (G6PDH, FAS, ME and SREBP1), (B) Hormone-sensitive lipase 1 (HSL1), lysosomal acid lipase A1 (LIPA1) and (D) β -oxidation-related genes (CPT1a and HOAD). Expression values are normalized with EF1-expressed transcripts (* $P < 0.05$, $n = 6$).

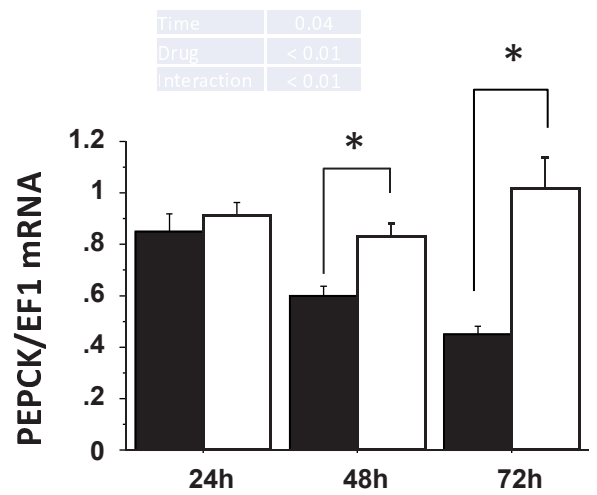
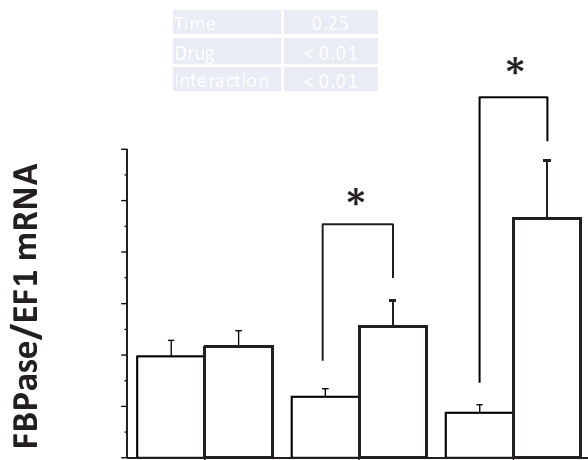
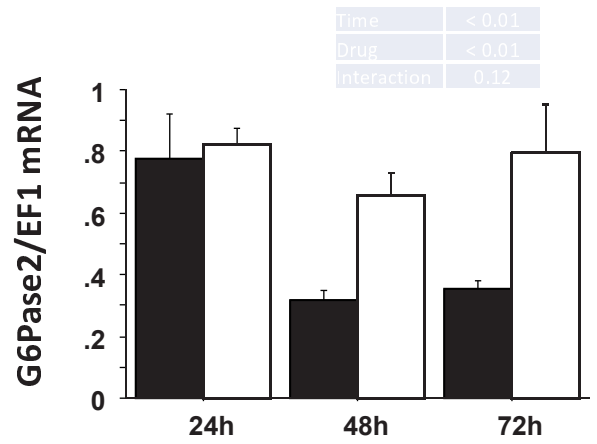
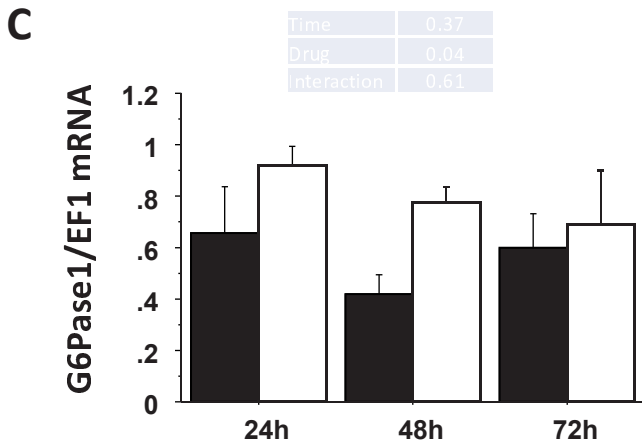
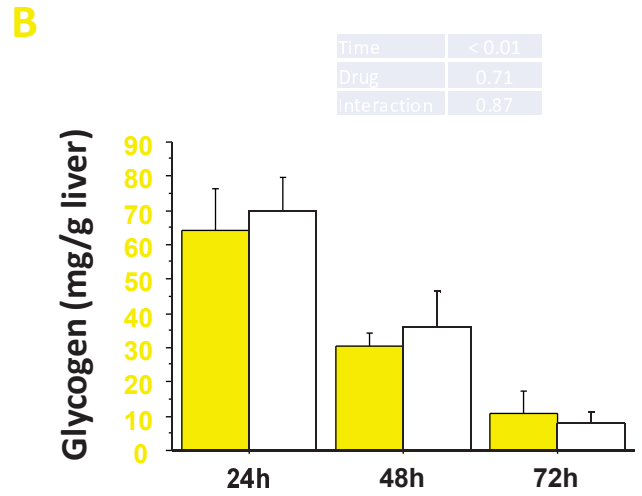
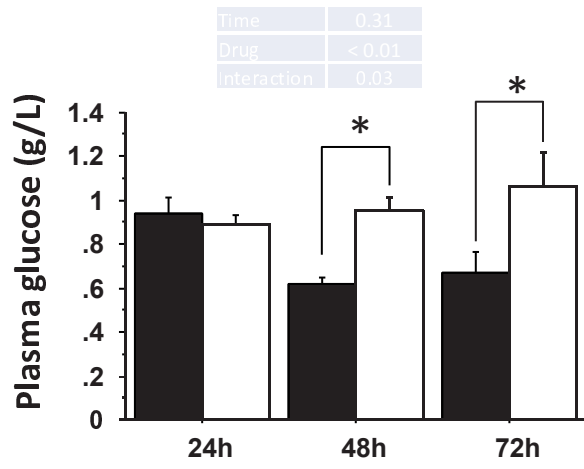
Figure 5. Trout were treated with water or 0.8 mg/kg/day colchicine for one, two or three days. Hepatic mRNA levels of (A) ER stress-induced genes CHOP and Asparagine Synthetase (AS), (B) autophagy-related genes SQSTM1, Atg4b, (C) lysosome-related genes ATPaseV1a and CathD. Expression values are normalized with EF1-expressed transcripts ($P < 0.05$, $n = 6$).

Table1. Sequences of the primer pairs used for real-time quantitative RT-PCR

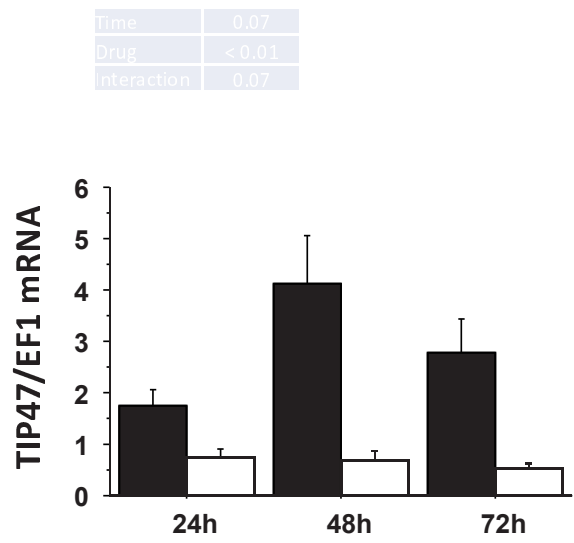
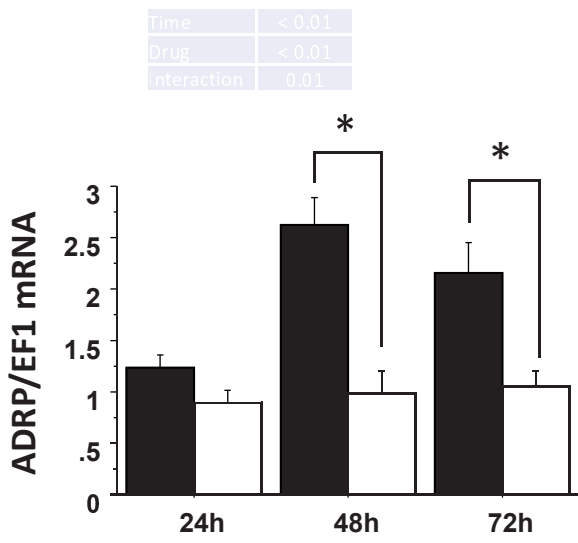
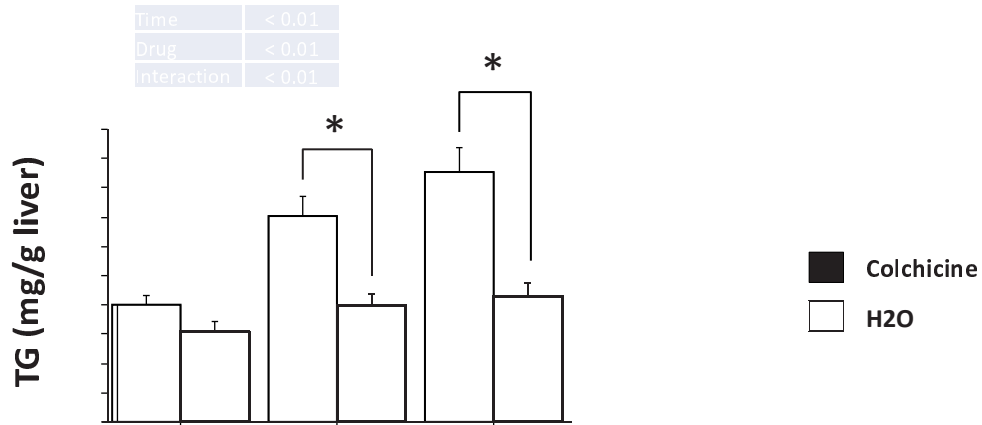
Gene	5'/3' Forward primer	5'/3' Reverse primer
<i>Gluconeogenesis-related genes</i>		
G6Pase 1	TAGCCATCATGCTGACCAAG	CAGAAGAACGCCACAGAGT
G6Pase 2	CTCAGTGGCGACAGAAAGG	TACACAGCAGCATCCAGAGC
PEPCK	GTTGGTGCTAAAGGGCACAC	CCCGTCTTCTGATAAGTCCAA
FBPase	GCTGGACCCTTCCATCGG	CGACATAACGCCACCATAGG
<i>Lipid droplet-related genes</i>		
ADRP	CATGGAGTCAGTTGAAGTCGTC	AATTTGTGGCTCCAGCTTGCC
TIP47	GATGTCCAACACCGTCACAG	TCGATTTCCAACCTCGTCCTC
<i>Lipid metabolism-related genes</i>		
FAS	TGATCTGAAGGCCCGTGTC	GGGTGACGTTGCCGTGGTAT
G6PDH	CTCATGGTCTCAGGTTTG	AGAGAGCATCTGGAGCAAGT
ME	TACGTGCGGTGTGTGTGACG	GTGCCACATCCAGCATGAC
SREBP1	CATGCGCAGGTTGTTTCTT	GATGTGTTTCGTGTGGGACTG
HSL1	GCCCTGGAGGAGTGCTTCTAC	TGGCGAACATCACAGAGTCATC
LIPA1	AGTGTCAACAGGATCCCACA	TTTGCCATCTCATCATAACTGAA
CPT1	TCGATTTTCAAGGGTCTTCG	CACAACGATCAGCAAAGTGG
HOAD	GGACAAAGTGGCACCAGCAC	GGGACGGGGTTGAAGAAGTG
<i>Autophagy lysosomal-related genes</i>		
Atg4b	TATGCGCTCCGAAAGTTGTC	CAGGATCGTTGGGGTTCTGC
SQSTM1	GCCCACTGGGTATCGATGT	GGTCACGTGAGTCCATTCTT
ATP6aseV1a	CTGTTTAATTTCTGAAGATCTA	GATCTCTCCACCAGCTCAC
Cath D	TGGGCCTGTAGAGGGTGCTT	CCACCATCTCCGACTCGATG
<i>References gene</i>		
EF1 α	TCCTCTGGTCGTTTCGCTG	ACCCGAGGGACATCCTGTG



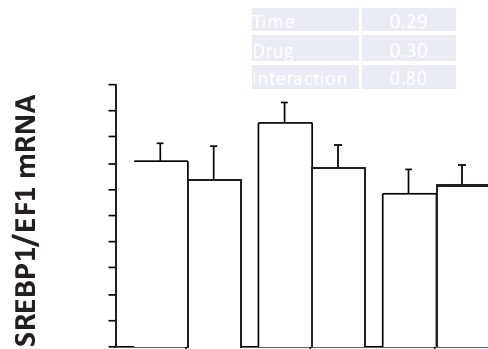
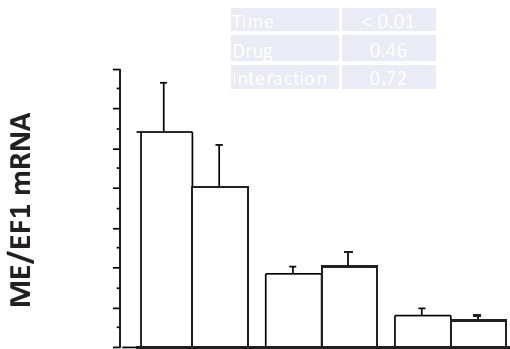
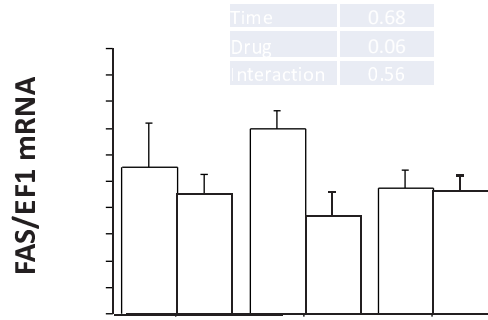
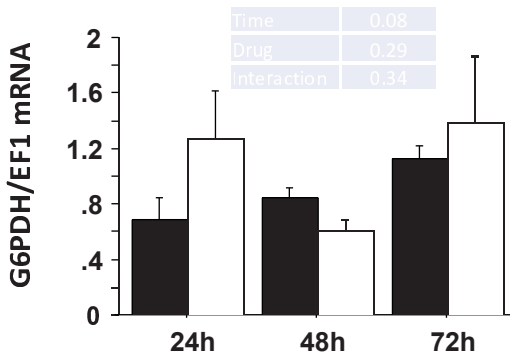
91 **Fig. 1**



Colchicine
 H2O



■ Colchicine
□ H2O



B

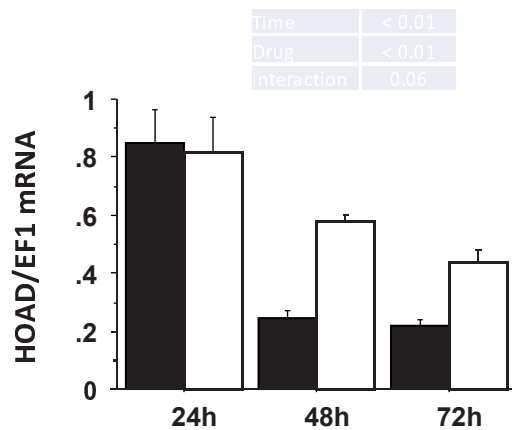
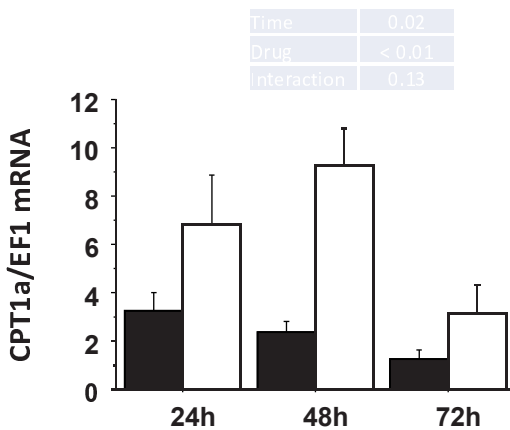
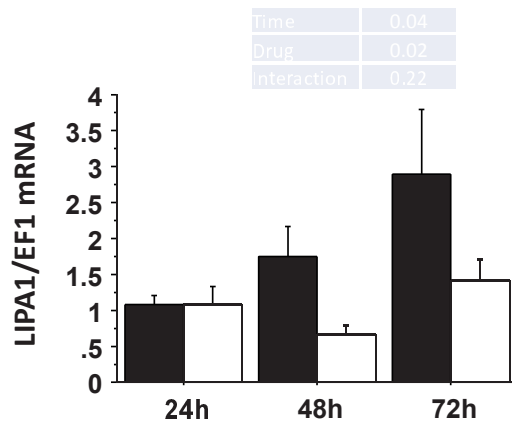
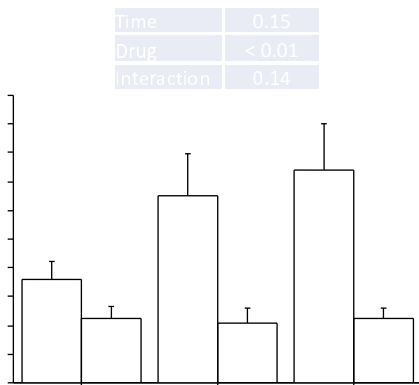


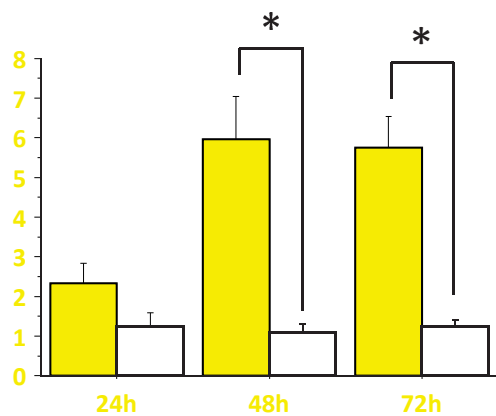
Fig.4

■ Colchicine
□ H2O

A

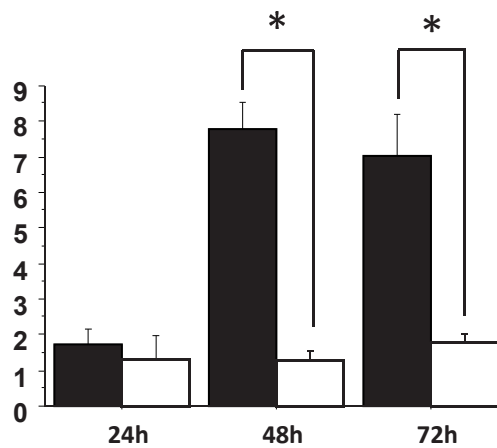
Time	0.68
Drug	< 0.01
Interaction	0.02

CHOP/EF1 mRNA



Time	< 0.01
Drug	< 0.01
Interaction	< 0.01

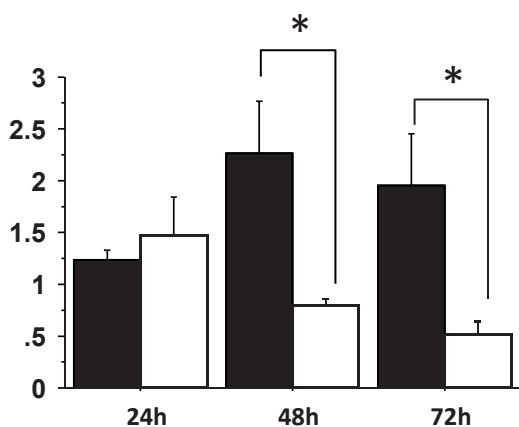
AS/EF1 mRNA



B

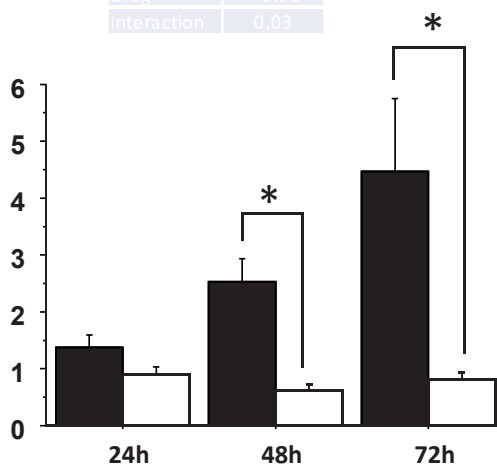
Time	0.01
Drug	< 0.01
Interaction	< 0.01

SQSTM1/EF1 mRNA



Time	0.04
Drug	< 0.01
Interaction	0.03

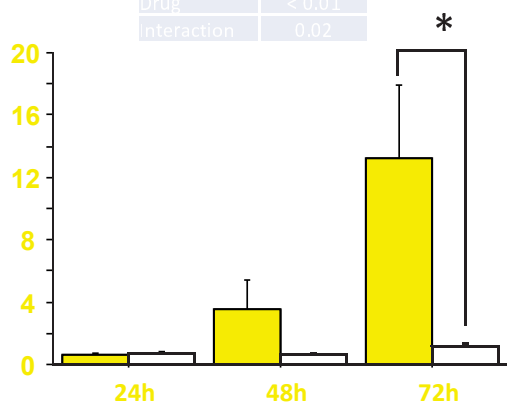
atg4b/EF1 mRNA



C

Time	< 0.01
Drug	< 0.01
Interaction	0.02

ATPaseV1a/EF1 mRNA



Time	0.03
Drug	0.03
Interaction	0.05

Cath D/EF1 mRNA

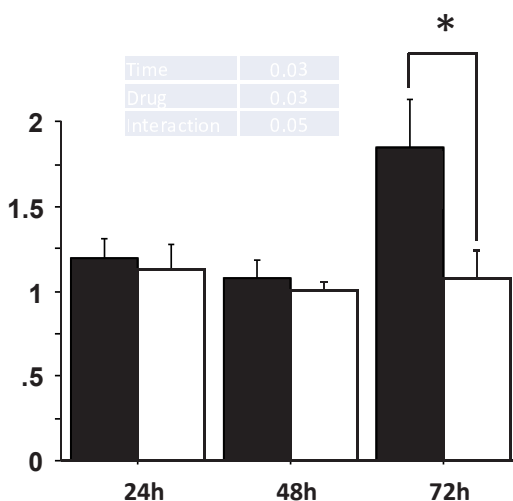


Fig.5

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse avait pour principal objectif d'étudier l'effet de la qualité nutritionnelle de l'aliment sur le contrôle de l'autophagie dans le muscle de truite arc-en-ciel. Afin d'appréhender cette question, nous avons dans un premier temps étudié *in vivo* l'effet de la modification du rapport protéines/glucides dans l'aliment sur les déterminants majeurs de l'autophagie. Les résultats ont montré que l'autophagie (estimée par la mesure du taux de LC3-II) n'est plus inhibée par la réalimentation lorsque la proportion de glucides alimentaires augmente au détriment des protéines. Afin de préciser ces résultats *in vivo*, des myoblastes de truite en culture ont été stimulés avec des acides aminés et/ou du glucose. Les résultats obtenus démontrent que l'addition d'acides aminés dans le milieu de culture inhibe l'autophagie alors que le glucose a un effet inverse. Ces résultats confirmaient l'intérêt de considérer la composition en macronutriments des aliments dans le contrôle de cette voie catabolique. Après avoir démontré l'effet des acides aminés sur l'autophagie, nous nous sommes posé la question si un déséquilibre en un seul acide aminé alimentaire pouvait également affecter cette fonction. Pour cela, nous avons choisi d'étudier l'effet d'un déséquilibre en méthionine dont les niveaux sont trop faibles dans les aliments pour poisson à base de végétaux (Sveier et al., 2001). Les résultats obtenus indiquent que la machinerie autophagosomale mais également les principaux facteurs du renouvellement des protéines musculaires sont effectivement sensible aux variations de teneur en méthionine de l'aliment et que la réponse qui en résulte peut fortement affecter la croissance. Enfin, dans l'optique de préciser les résultats obtenus dans les deux premières études et d'améliorer notre interprétation des changements du niveau de LC3-II, nous avons réalisé une troisième étude visant à déterminer s'il est possible de mesurer le flux autophagique dans le muscle de truite arc-en-ciel par l'emploi d'inhibiteurs des étapes en aval de la formation des autophagosomes. Il s'agissait également de déterminer les limites de l'utilisation de tels inhibiteurs chez cette espèce. Les différents essais effectués n'ont pas permis de mesurer le flux autophagique dans le muscle de truite arc-en-ciel. En revanche, l'injection intrapéritonéale de colchicine a bien bloqué le flux autophagique dans le foie. Ceci nous a permis d'ouvrir un nouveau champ d'investigations sur le rôle de l'autophagie dans le métabolisme intermédiaire. Dans cette section, nous mènerons une discussion sur les principaux résultats obtenus et tenterons d'en tirer des conclusions sur l'intérêt et/ou l'impact de ce travail.

I-Effet des acides aminés et du glucose sur la régulation de l'autophagie

I-1- Effets de la teneur en protéines de l'aliment dans la régulation de l'autophagie

De nombreuses études ont démontré *in vitro* que la formation des autophagosomes est stimulée par une déplétion du milieu de culture en acides aminés (Mizushima and Klionsky, 2007; Mortimore and Poso, 1987). A l'inverse très peu de données étaient disponibles sur l'effet de la teneur de l'aliment en protéines sur le contrôle de cette fonction cellulaire *in vivo*. Les travaux réalisés au cours de ma thèse montrent que **l'autophagie musculaire n'est plus inhibée par la réalimentation lorsque la proportion des protéines alimentaires diminue au détriment des glucides**. Ces résultats sont en accord avec des données antérieures chez les mammifères, montrant qu'une alimentation déficiente en protéines, durant plusieurs mois, induit l'autophagie (De Palma et al., 2012; Grumati et al., 2010; Grumati et al., 2011). Cependant, nos données montrent, tout du moins chez la truite arc-en-ciel, que cet effet se produit dès le premier jour d'alimentation.

Outre l'absence d'inhibition du taux de LC3-II par la réalimentation, les poissons nourris avec le régime LPHC présentaient un défaut d'induction du complexe mTORC1 (mesurée par l'état de phosphorylation de son substrat S6K1). Il est aujourd'hui bien établi que l'activation de ce complexe dépend du niveau des protéines dans l'aliment (Kimball and Jefferson, 2004; Kimball et al., 1999; Yoshizawa et al., 1998) et que les acides aminés jouent un rôle majeur dans cette activation (Cf section 4.1.1). Il est donc possible que la faible teneur en protéines du régime LPHC soit responsable de l'absence d'activation du complexe mTORC1 et par voie de conséquence de l'absence d'inhibition de l'autophagie dans le muscle des poissons nourris avec ce régime. En effet, bien que le rôle du complexe mTORC1 dans la régulation de l'autophagie dans le muscle ait été, dans un premier temps, sous-estimé (Sandri, 2010, 2012), une étude récente a clairement mis en évidence le rôle clé de ce complexe dans la régulation de l'autophagie dans le muscle squelettique (Castets et al., 2013). Nos données sont en accord avec ces résultats et montrent qu'un traitement de myoblastes de truite avec la rapamycine (molécule inhibitrice de la protéine mTOR), empêche l'inhibition de l'autophagie médiée par les acides aminés. **Ainsi nos résultats suggèrent que l'absence de contrôle de l'autophagie avec le régime LPHC est due à un défaut d'activation du complexe mTORC1 lié à la faible teneur en protéines de ce régime.**

Cependant, il n'est pas exclu que cette absence de contrôle de l'autophagie par le régime LPHC soit également liée à un défaut de sécrétion et/ou d'action de l'insuline chez les

poissons alimentés avec le régime LPHC. En effet, bien que nous n'ayons pas la capacité de mesurer le taux d'insuline plasmatique chez la truite, la plus faible phosphorylation de la protéine Akt (protéine amont de la voie insulinique) chez les poissons du groupe LPHC par rapport aux poissons du groupe HPLC suggère une insuliniémie plus faible chez les premiers. Ce résultat pourrait être lié au caractère insulinothrope de certains acides aminés (comme l'arginine mais aussi l'alanine, la méthionine et la sérine) qui sont reconnus pour être de meilleurs sécrétagogues d'insuline que le glucose chez les poissons (Andoh, 2007). Or, des études antérieures, chez les mammifères mais aussi chez la truite, ont montré l'importance de la coopération entre l'insuline et les acides aminés pour une pleine activation du complexe mTORC1 (Chotechuan et al., 2011; Lansard et al., 2010). Ainsi, il serait possible, que le défaut d'activation du complexe mTORC1 et donc l'absence de contrôle de l'autophagie par le régime LPHC soit due à une faible concentration cellulaire en acides aminés liée à un faible taux d'insuline plasmatique.

I-2-Effet de la teneur en méthionine de l'aliment dans la régulation de l'autophagie

Outre la teneur en protéines de l'aliment, l'équilibre entre les différents acides aminés est un facteur important dans le contrôle de l'autophagie. En effet, nous démontrons, dans cette thèse, qu'**une carence en méthionine alimentaire, est capable d'induire le taux de LC3-II ainsi que l'expression d'un certain nombre de gènes de la voie autophagique-lysosomale dans muscle de la truite.** Ces résultats semblent étroitement liés à l'induction de la phosphorylation de la protéine eIF2 α , reconnu comme un acteur important dans la régulation de l'expression des gènes de ce système de dégradation (B'chir et al., 2013). Bien que le rôle des acides aminés, comme la leucine (B'chir et al., 2013) ou l'arginine (Shuvayeva et al., 2014) dans le contrôle de l'autophagie a largement été démontré *in vitro*, à notre connaissance, nos résultats sont les premiers à montrer qu'une déficience en un seul acide aminé essentiel est capable d'affecter ce système de dégradation *in vivo*.

Par ailleurs, en plus de la voie GCN2-eIF2 α , il existe d'autres voies de signalisation qui assurent le rôle de senseurs de la concentration intracellulaire d'acides aminés. Nos résultats suggèrent que l'induction de la voie autophagique-lysosomale par une carence en méthionine alimentaire est accompagnée d'une diminution de l'activité du complexe mTORC1 (mesurée par l'état de phosphorylation de la protéine S6) dans le muscle de truite. Récemment, il a été démontré que le complexe mTORC1 est le principal régulateur du facteur de transcription

TFEB, reconnu comme un facteur majeur de la régulation de l'expression des gènes de l'autophagie et du lysosome. (Martina et al., 2012; Settembre et al., 2012). En effet, en situation de carence nutritionnelle, TFEB n'est plus phosphorylé par mTORC1 et se retrouve dans le noyau, où il active le programme d'expression de ses gènes cibles (Martina et al., 2012). L'induction de l'expression de ces gènes dans le muscle des poissons nourris avec le régime déficient en méthionine pourrait donc également être liée à l'induction de l'activité de TFEB via l'inhibition de celle de mTORC1. Afin de vérifier cette hypothèse, différents anticorps dirigés contre la protéine TFEB ont été testés au cours de la thèse. Malheureusement, aucun anticorps n'a donné de résultats positifs.

Outre son rôle de molécule signal, la méthionine est également un important précurseur de la S-adenosylméthionine (SAM), un donneur universel de groupe méthyl pour de nombreuses réactions biologiques. Il a ainsi été démontré que la disponibilité en SAM contrôle étroitement l'activité autophagique *via* la méthylation de la Protéine Phosphatase 2A (PP2A), reconnue comme un facteur clé du complexe mTORC1 (Sutter et al., 2013). La SAM exerce également un rôle majeur dans les processus de méthylation des histones. Ces modifications post-traductionnelles des histones, qui influencent l'organisation de la chromatine, sont associées à la fois à l'activation et la répression transcriptionnelle et sont aujourd'hui reconnues comme des acteurs majeurs de régulations de nombreuses fonctions physiologiques. Il a ainsi été démontré que l'expression de certains gènes de l'autophagie dont *LC3b* et *WIP1* est étroitement reliée à la méthylation des résidus lysines de l'histone H3 au niveau de leur promoteur (Artal-Martinez de Narvajás et al., 2013; Fullgrabe et al., 2014; Füllgrabe et al., 2013). Des modifications du statut de méthylation des histones au niveau des promoteurs des gènes étudiés pourraient ainsi être impliquées dans les effets observés chez les poissons nourris avec le régime déficient en méthionine.

Enfin, en tant que précurseur de la cystéine, la méthionine intervient également dans le système de protection antioxydant de la cellule, en produisant principalement le glutathion et la taurine (Metayer et al., 2008; Tesseraud et al., 2009). Le glutathion, est le principal antioxydant cellulaire nécessaire pour la détoxification de divers composés et la destruction des ROS. Or de nombreuses études ont démontrées que le niveau des ROS dans la cellule contrôle l'activité autophagique (Aucello et al., 2009; Kiffin et al., 2006). En outre, de récents résultats obtenus sur myotubes de truites ont montré une forte induction de l'expression d'un certain nombre de gènes de cette voie de dégradation par l'ajout de ROS dans le milieu de

culture (Seiliez, communication personnelle). Ainsi, la méthionine, en tant que facteur antioxydant, pourrait jouer un rôle important dans la régulation de l'autophagie en contrôlant le niveau des ROS dans la cellule.

Dans l'ensemble, ces données indiquent que l'induction du système autophagique chez les truites élevées avec le régime déficient en méthionine peut être médiée par de nombreux mécanismes. Toutefois, il est également possible que cette induction soit due à des effets indirects (changements hormonaux liés à la carence en méthionine) ou non spécifique, c'est-à-dire identique quel que soit l'acide aminé essentiel carencé. Afin de répondre à cette question, il semblait pertinent d'étudier spécifiquement le rôle de la méthionine sur des cultures primaires de myotubes de truite. Ce modèle d'étude permettait ainsi de se placer en condition contrôlée et d'évaluer l'effet spécifique d'une déplétion en méthionine sur l'autophagie indépendamment des facteurs hormonaux. Les données obtenues durant cette thèse n'ont pas permis de tirer des conclusions claires et définitives sur cette question. Plusieurs difficultés méthodologiques ont été rencontrées durant ces expériences comme la détermination du milieu carencé en méthionine et/ou la difficulté d'obtention de myoblastes en quantité suffisante pour mesurer le taux de LC3-II. Cette question reste donc en suspens et nécessitera d'être traitée ultérieurement par l'amélioration des procédures de cultures propre aux cellules musculaires de truite.

En conclusion, les données générées au cours de cette thèse démontrent que les mécanismes qui contrôlent l'autophagie sont non seulement influencés par la teneur en protéines dans l'aliment mais également par un déséquilibre en un seul acide aminé essentiel alimentaire. Cette étude souligne ainsi la grande sensibilité de ce système de dégradation aux nutriments et mettent en évidence l'intérêt de considérer la composition en macronutriments des régimes dans le contrôle de l'autophagie.

I-3 Effet du glucose sur la régulation de l'autophagie

Les conclusions faites dans la section précédente ne tiennent compte que de la fraction protéique de l'aliment. Or, dans la première étude, la diminution de la teneur en protéines de l'aliment a été faite avec une augmentation de la teneur en glucides, qu'il faut donc considérer dans les effets observés. En ce sens, nos données sur myoblastes de truite en culture montrent que contrairement aux acides aminés, l'addition de glucose dans le milieu induit le flux autophagique (mesurée par le taux de LC3-II en présence de bafilomycine A1).

Ces résultats pourraient apparaître inattendus au regard des données existant chez les mammifères. En effet, de nombreuses études ont clairement démontré *in vitro* qu'une privation, et non une addition, de glucose induit l'autophagie (Duan et al., 2011; Kobayashi et al., 2012). Cet effet est principalement lié à une baisse d'énergie détectée par l'AMPK qui, une fois activée, stimule l'autophagie afin de restaurer l'homéostasie énergétique (Kim et al., 2011). Toutefois, nos résultats ne montrent aucune modification de la phosphorylation de l'AMPK dans nos conditions expérimentales, excluant une possible implication de cette kinase dans l'effet stimulateur du glucose sur l'autophagie. Très récemment, une étude a mis en évidence, sur des cardiomyocytes, l'implication de l'hexokinase II (HKII) dans l'induction de l'autophagie en réponse à une carence en glucose (Roberts et al., 2014). Cette enzyme, qui catalyse la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate (première étape de la glycolyse) dans le cœur, les tissus adipeux ou le muscle, séquestrerait et inhiberait le complexe mTORC1 lors d'une carence en glucose, induisant ainsi l'autophagie. C'est, plus précisément, la baisse du niveau de glucose-6-phosphate qui induirait la liaison de HKII au complexe mTORC1, permettant aux cellules d'ajuster précisément leurs besoins énergétiques. L'ensemble de ces données démontrent ainsi clairement, du moins chez les mammifères, que l'induction de l'autophagie en situation de carence en glucose assure le maintien de l'homéostasie énergétique et donc la survie cellulaire.

Toutefois, un certain nombre d'études menées sur des modèles diabétiques ont démontré un effet stimulateur du glucose sur l'autophagie (Lee et al., 2012; Sedeek et al., 2010; Yan et al., 2012; Yu et al., 2006). Cet effet serait lié, du moins en partie, à une accumulation de ROS associée à un environnement hyper-glycémique. L'autophagie jouerait ainsi un rôle protecteur, en éliminant spécifiquement les agrégats protéiques induits par l'accumulation des ROS. Dans ce contexte, il est important de rappeler que la truite arc-en-ciel est considérée comme "intolérante" au glucose alimentaire et se caractérise par une hyperglycémie prolongée après un repas riche en glucides (Moon, 2001; Panserat et al., 2009). L'induction du taux de LC3-II observée après l'addition de glucose dans le milieu de culture pourrait par conséquent être une conséquence de la spécificité du métabolisme de l'espèce étudiée. En outre, cet effet pourrait également contribuer à l'absence d'inhibition par la réalimentation du niveau de LC3-II avec les régimes MPMC et LPHC. En retour, il est possible que cette absence d'inhibition de l'autophagie chez les poissons nourris avec les régimes riche en glucides contribue à maintenir l'hyperglycémie postprandiale en alimentant la voie de la néoglucogenèse par la libération continue d'acides aminés, générant ainsi une boucle de

rétrocontrôle positive. Un tel rôle de l'autophagie dans le contrôle de la glycémie a récemment été décrit chez la souris (Efeyan et al., 2013; Ezaki et al., 2011).

En conclusion, quels que soit les mécanismes mis en jeu dans les effets du glucose et des acides aminés dans le contrôle de l'autophagie, nos données mettent clairement en évidence l'importance des interactions entre nutriments dans ces effets. Elles soulignent l'intérêt de prendre en compte la composition de l'aliment dans sa globalité et non pas uniquement certains nutriments (si importants soient-ils) dans le contrôle de ce processus biologique, mais également les spécificités métaboliques et/ou physiologiques de l'espèce étudiée. En outre, elles révèlent l'incroyable complexité des mécanismes potentiellement impliqués dans la régulation par les nutriments du système autophagique.

II-Etude du flux autophagique

II.1-Echec de la mesure du flux autophagique dans le muscle de truite

Nos données ont montré que la composition en macronutriments de l'aliment affecte le système autophagique-lysosomal dans le muscle de truite (articles 1 et 2). Toutefois, dans ces études l'activité autophagique n'a été appréciée que par la mesure du taux de LC3-II dont l'augmentation peut, théoriquement, traduire une induction de la formation des autophagosomes ou une inhibition des étapes qui suivent leur formation (fusion avec le lysosome ou dégradation du contenu séquestré par les autophagosomes dont LC3-II). Ainsi, dans l'optique de préciser les résultats obtenus dans les deux premières études et d'améliorer notre interprétation des changements du niveau de LC3-II, nous avons réalisé une troisième étude visant à déterminer s'il est possible de mesurer le flux autophagique dans le muscle de truite arc-en-ciel.

Pour cela, nous avons utilisés différents agents pharmacologiques (colchicine, vinblastine et chloroquine), connus pour bloquer la dégradation des autophagosomes (bloquer la dégradation de LC3-II) chez les mammifères (Haspel et al., 2011; Ju et al., 2010; Klionsky et al., 2012). Les différents essais effectués dans cette étude n'ont pas permis de mesurer le flux autophagique dans le muscle de truite arc-ciel. En effet, quelle que soit la drogue injectée, la dose administrée ou le temps de traitement, le taux de LC3-II est resté inchangé dans le

muscle. Par contre, l'injection intrapéritonéale de la colchicine, pendant deux jours, a augmenté significativement le taux de LC3-II dans le foie (article 3).

Les raisons de l'absence d'effet des drogues administrées dans le muscle restent non élucidées. Toutefois, la différence de résultats entre le foie et le muscle reflète probablement des différences d'accessibilité et/ou de cinétique d'action des drogues entre les deux tissus. En effet, Klionsky et al, ont rapporté, que l'action des drogues utilisées *in vivo*, est spécifique des tissus et peut varier d'un organe à un autre (Klionsky et al., 2012). Une récente étude a mesuré chez la souris, le flux autophagique *in vivo* dans différents organes par injection intrapéritonéale de leupeptine (Haspel et al., 2011). Les résultats ont révélé une induction du niveau de LC3-II dans le foie, mais pas dans d'autres organes, comme la rate, le rein ou le poumon. Les auteurs ont également rapporté une induction transitoire du niveau de LC3-II dans le cœur reflétant probablement une inactivation rapide de la drogue dans cet organe ou une redistribution vers d'autres tissus (Haspel et al., 2011). En revanche, dans cette étude, les auteurs n'ont pas mesuré le flux autophagique dans le muscle.

Il est également possible que des différences de cinétique d'induction de l'autophagie entre organes soient à l'origine des différences des résultats obtenus, comme cela a été démontré ultérieurement (Klionsky et al., 2012; Mizushima et al., 2004). L'induction de l'autophagie dans le muscle, dont le métabolisme est relativement lent par rapport à celui du foie, pourrait ainsi être tardive et nécessiter une utilisation prolongée des drogues. Cela serait d'autant plus accentué chez la truite qui est une espèce poïkilotherme, élevée à 17°C. Cependant, il a été rapporté que l'utilisation prolongée de ces inhibiteurs peut induire des effets collatéraux et affecter (directement ou indirectement) la mesure même du flux autophagique *in vivo* (Klionsky et al., 2012; Mizushima et al., 2010).

Afin de mesurer le flux autophagique dans le muscle, d'autres méthodes pourraient donc être envisagées. La spécificité de l'autophagie vis-à-vis des agrégats protéiques marqués par une queue poly-Q (chaîne constituée d'une répétition de glutamine) a ainsi été utilisée pour mesurer le flux autophagique *in vivo* (Ju et al., 2009). Cette méthode propose de suivre la dégradation d'une construction chimérique composée de la luciférase fusionnée à un peptide de 80 poly-Q. L'induction de l'autophagie par le jeûne ou un traitement à la rapamycine se traduit ainsi par une baisse de la fluorescence qui peut être mesurée par imagerie. Toutefois, cette méthode nécessite de transfecter le rapporteur 80 poly-Q-luciférase et reste encore peu accessible à des organismes non modèles comme la truite arc-en-ciel.

En conclusion, la mesure du flux autophagique *in vivo* reste encore très peu développée et l'appréciation de l'activité autophagique requière de multiplier les mesures de marqueurs autophagiques (LC3-II, p62, NBR1, ...) et d'effecteurs proximaux (mTORC1, FoxO, TFEB, ...) ainsi que les approches de détection (Western blot, microscopie électronique, microscopie à fluorescence, ...).

II-2 Rôle de l'autophagie dans le métabolisme hépatique intermédiaire

Comme indiqué dans la section précédente, les différents essais effectués dans la troisième étude n'ont pas permis de mesurer le flux autophagique dans le muscle de truite arc-en-ciel. En revanche, l'injection intrapéritonéale de colchicine a bien bloqué le flux autophagique dans le foie et nous a ouvert un nouveau champ d'investigations sur le rôle de l'autophagie dans le métabolisme intermédiaire chez la truite. Nous essayerons ici d'en tirer les principaux enseignements.

Les résultats obtenus, montrent que le blocage du flux autophagique dans le foie, après deux jours de traitement à la colchicine, s'accompagne d'une inhibition significative de la glycémie et d'une baisse concomitante de l'expression des gènes de la néoglucogénèse. Ces résultats s'apparentent à des données récemment publiées à partir de souris dont le gène *Atg7* a été spécifiquement invalidé dans le foie, montrant que durant le jeûne, l'autophagie joue un rôle déterminant dans le maintien de la glycémie, en permettant la libération d'acides aminés pour la production de glucose via la néoglucogénèse (Ezaki et al., 2011). Toutefois, il est important de préciser que cette dernière étude porte sur la disponibilité des substrats de la néoglucogénèse et non (comme dans notre étude) sur le taux d'ARNm des gènes associés. Or, il est aujourd'hui bien établi que l'expression de ces gènes est aussi sous le contrôle étroit de la disponibilité même des acides aminés (Deval et al., 2009; Jousse et al., 2004; Lansard et al., 2011; Lansard et al., 2010). Ainsi, l'ensemble de ces données suggèrent qu'en plus de son rôle dans la fourniture de substrats pour la néoglucogénèse, l'autophagie pourrait également exercer un rôle majeur dans la régulation de l'expression des gènes associés. Il s'agirait là d'une fonction encore inconnue pour l'autophagie.

Outre la baisse de la glycémie, les poissons traités à la colchicine présentaient une stéatose hépatique associée à une augmentation du niveau de triglycérides dans le foie ainsi qu'une induction de l'expression des gènes *ADRP* et *TIP47* codant pour des protéines spécifiques des gouttelettes lipidiques. Ces résultats corroborent avec les données, publiées par Singh et al. en

2009, montrant que des souris à jeun dont le gène *Atg7* a été spécifiquement invalidé dans le foie présentent une augmentation du nombre et de la taille des gouttelettes lipidiques, du niveau de triglycérides et des marqueurs ADRP et TIP47 dans cet organe. Les auteurs de cette étude démontrent que ces effets sont dus à l'absence, chez les souris invalidées, de dégradation des gouttelettes lipidiques par l'autophagie, un processus appelé lipophagie (Singh and Cuervo, 2012; Singh et al., 2009a). En ce sens, nos résultats suggèrent que la stéatose hépatique observée chez les poissons traités à la colchicine soit liée à un défaut de lipophagie.

Une des conséquences de ce défaut de lipophagie est la baisse du taux d'acides gras libres disponible pour la β -oxydation mitochondriale et la fourniture d'énergie (Singh et al., 2009a). En ce sens, nos données montrent une baisse de l'expression des gènes *CPT1* et *HOAD*, impliqués respectivement dans le transport des acides gras libres à travers la membrane mitochondriale et la β -oxydation, chez les poissons traités à la colchicine. Elles suggèrent que ce traitement induit à terme un stress énergétique. En outre, la stéatose hépatique, induite par ce défaut de lipophagie, pourrait entraîner un stress du RE comme cela a été rapporté précédemment (Yang et al., 2010; Zhou and Liu, 2010). En ce sens, nos résultats montrent une forte induction de deux gènes du stress du RE (*CHOP* et *AS*) chez les poissons traités à la colchicine. Au-delà d'être un simple marqueur de stress du RE, *CHOP* code pour un facteur de transcription ubiquitaire qui présente un rôle majeur dans la régulation de l'expression des gènes inductible par un stress (Bruhat et al., 1997; Ohoka et al., 2005; Sok et al., 1999). Récemment, l'implication de *CHOP* a été mise en évidence dans la régulation de nombreux gènes du processus autophagique (B'chir et al., 2014; B'chir et al., 2013; Rouschop et al., 2010). Nos résultats sont en accord avec ces données et montrent que l'induction de l'expression des gènes de l'autophagie et du lysosome suit celle du gène *CHOP* chez les poissons traités à la colchicine. Ainsi, ces données suggèrent que le défaut de lipophagie, induit par l'injection de colchicine, conduit à une stéatose hépatique associée à un stress énergétique et cellulaire ainsi qu'à l'induction de l'expression des gènes codant pour la machinerie autophagique.

En conclusion, les résultats obtenus dans cette étude démontrent pour la première fois chez la truite, la faisabilité de mesurer le flux autophagique *in vivo* dans le foie. En outre, ils montrent que cette inhibition conduit à une perturbation profonde du métabolisme intermédiaire comparable à ce qui est décrit chez les mammifères. Ainsi, l'autophagie jouerait un rôle central dans le contrôle de l'homéostasie cellulaire chez

cette espèce. Une meilleure compréhension des mécanismes sous-tendant l'action de cette fonction cellulaire chez la truite revêt donc d'un intérêt particulier dans de nombreux domaines. Nous détaillerons ci-dessous quelques exemples.

III- Intérêts de nos résultats dans différents domaines (agronomique, thérapeutique et écologique)

III-1-Implications de ces travaux dans le développement de nouveaux aliments piscicoles

Nos résultats ont mis en évidence *in vivo* que la composition d'un aliment peut affecter la réponse de l'autophagie à la réalimentation. Les effets observés sont dépendants du ratio entre les principaux macronutriments (article 1), mais aussi de l'équilibre entre les acides aminés au sein de la fraction protéique (article 2). Or, la composition en macronutriments ainsi que le profil en acides aminés des nouveaux régimes pour poissons à base de végétaux sont différents de ceux des aliments classiques à base de poisson (farine et huile de poisson). Il est donc probable que la disponibilité postprandiale en nutriments (acides aminés et glucose plasmatiques) soit modifiée avec les nouveaux régimes alternatifs. Certaines matières premières sont également plus ou moins facilement digérées, ce qui change alors la cinétique d'apparition des nutriments dans le plasma. Enfin les acides aminés rajoutés sous forme cristalline dans les aliments à base de végétaux (comme la méthionine ou la lysine) n'ont pas besoin d'être digérés et sont donc théoriquement absorbés plus rapidement.

Nos résultats sont pour le moment trop préliminaires pour aider les producteurs dans la formulation des aliments. Par contre, nos données permettent aujourd'hui de prédire que les nouveaux régimes à base végétale peuvent profondément impacter le système autophagique-lysosomal et donc le métabolisme dans son ensemble. Il faudra ainsi tenir compte dans les nouveaux aliments (dans lesquels les sources protéiques pourront encore varier, par exemple : algues, protéines de levures, insectes...) (Naylor et al., 2009) de la composition mais également de la disponibilité des nutriments afin d'aboutir à un aliment qui ne perturbe pas le système autophagique-lysosomal et donc le métabolisme et la croissance.

III-2-Implications de nos travaux dans des situations pathologiques

Récemment, une déficience de l'activité autophagique a été mise en cause dans l'aggravation de certaines maladies neuromusculaires dégénératives comme la dystrophie musculaire congénitale d'Ullrich, la myopathie de Bethlem ou la myopathie de Duchenne (De Palma et

al., 2014; Sandri et al., 2013). Des expériences visant à réactiver l'autophagie par un régime pauvre en protéines ont démontrées une nette amélioration du phénotype musculaire chez des souris Col6a1 (-/-) mimant la myopathie de Bethlem (Grumati et al., 2010; Grumati et al., 2011). Très récemment, cette approche nutritionnelle a été appliquée chez des patients atteints de dystrophie musculaire congénitale d'Ullrich et de Becker et a montré des résultats prometteurs, ouvrant ainsi des perspectives de traitement très intéressantes (Merlini and Nishino, 2014). Les résultats obtenus dans la présente thèse (article2) montrent qu'en plus d'une déficience en protéines de l'aliment, un déséquilibre en un seul acide aminé essentiel (la méthionine) induit l'autophagie. Ces données ouvrent de nouvelles pistes de recherche pour l'amélioration thérapeutique des myopathies décrites ci-dessus. En effet, le régime déséquilibré en acides aminés se différencie de la sous-nutrition protéino-énergétique de par le fait que l'apport calorique n'est pas affecté dans ce type de régime et que la déplétion plasmatique ne concernera qu'un seul acide aminé ou celui d'une même famille. Afin d'éviter toutes complications liées à la carence induite par la consommation d'un régime déséquilibré, il serait aussi envisageable d'appliquer une alimentation dite séquentielle, alternant une alimentation normale et une alimentation déséquilibrée.

III-3-Implication de nos travaux dans la compréhension des différentes stratégies de résistances au jeûne mise en place chez les poissons

Dans un tout autre contexte, l'autophagie pourrait également jouer un rôle majeur dans la capacité des certaines espèces de poissons à migrer et/ou survivre durant des phases critiques de leur cycle de vie. Ainsi, chez l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*), les jeunes stades, ou civelles, subissent une période de jeûne prolongée durant la migration estuarienne (Bardonnnet and Riera, 2005). L'accomplissement de sa migration pourrait ainsi dépendre de sa capacité à mobiliser ses propres réserves et donc de la mise en place des mécanismes d'autophagie.

Il est classiquement admis chez les poissons, que l'énergie en période de jeûne provient des réserves de glycogène du foie et des muscles (très vite épuisées) puis du catabolisme des lipides et des protéines (Hemre et al., 1993). Les grandes réserves de graisses chez la civelle pourraient en partie expliquer sa résistance au jeûne et favoriser l'épargne protéique au niveau musculaire pour maintenir l'activité de nage. Cependant, les civelles de fin de saison de pêche possèdent beaucoup moins de réserves lipidiques que celles de début de saison et sont néanmoins capables de maintenir une importante activité de nage pendant au moins deux mois (Bolliet, communication personnelle). Elles peuvent perdre plus de 50% de leur poids

durant cette période et rétrécir de plusieurs millimètres. Il semble donc que la civelle soit également contrainte de puiser dans ses protéines musculaires pour assurer un apport énergétique suffisant à l'activité de migration. La civelle va ainsi devoir trouver un compromis entre la mobilisation de ses réserves et l'épargne de ses protéines musculaires. L'accomplissement de sa migration estuarienne pourrait ainsi dépendre de sa capacité à adapter au plus juste son système autophagique.

Les résultats obtenus dans la présente thèse (article 3) montrent une bonne conservation du rôle de l'autophagie dans le contrôle du métabolisme intermédiaire au cours de l'évolution. Ils ouvrent ainsi des perspectives de recherches sur l'implication de cette fonction catabolique dans les différentes stratégies de résistance au jeûne mises en place chez la civelle. Une meilleure connaissance de ces mécanismes de résistance au jeûne permettrait ainsi de mieux comprendre le déterminisme du comportement migratoire en estuaire des civelles et fournirait de précieuses indications sur l'évolution de cette population, qui subit une chute drastique de ses effectifs depuis 3 décennies.

CONCLUSION

Tout au long leur vie, les organismes doivent s'adapter à différentes situations de stress environnementaux. Un des mécanismes clés de cette adaptation est le système autophagique-lysosomal qui assure le maintien de l'homéostasie énergétique et nutritive des cellules. **Nos résultats montrent que l'autophagie n'est pas uniquement sensible à l'état nutritionnel (jeûne/nourris) mais également à la nature des aliments consommés.** Ces données mettent ainsi en évidence l'extrême sensibilité de ce système à l'environnement. Outre leurs intérêts agronomique et thérapeutique, elles ouvrent de nouvelles perspectives pour une meilleure compréhension des mécanismes d'action de l'autophagie au niveau cellulaire et métabolique mais également de son rôle dans l'adaptation des espèces au cours l'évolution.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agarraberes, F. A., and J. F. Dice. 2001. A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J. Cell Sci.* 114: 2491-2499.
- Albracht, S. P., A. J. Meijer, and J. Rydstrom. 2011. Mammalian NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) and nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) together regulate the mitochondrial production of H₂O₂--implications for their role in disease, especially cancer. *J. Bioenerg. Biomembr.* 43: 541-564.
- Alers, S., A. S. Loffler, S. Wesselborg, and B. Stork. 2012. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol. Cell. Biol.* 32: 2-11.
- Andoh, T. 2007. Amino acids are more important insulinotropins than glucose in a teleost fish, barfin flounder (*Verasper moseri*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 151: 308-317.
- Artal-Martinez de Narvajas, A. et al. 2013. Epigenetic regulation of autophagy by the methyltransferase G9a. *Mol. Cell. Biol.* 33: 3983-3993.
- Aucello, M., G. Dobrowolny, and A. Musaro. 2009. Localized accumulation of oxidative stress causes muscle atrophy through activation of an autophagic pathway. *Autophagy* 5: 527-529.
- Averous, J. et al. 2004. Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 279: 5288-5297.
- Axe, E. L. et al. 2008. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology* 182: 685-701.
- B'chir, W. et al. 2014. 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.
- B'chir, W. et al. 2013. The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* 41: 7683-7699.
- Baerga, R., Y. Zhang, P. H. Chen, S. Goldman, and S. Jin. 2009. Targeted deletion of autophagy-related 5 (atg5) impairs adipogenesis in a cellular model and in mice. *Autophagy* 5: 1118-1130.
- Bardag-Gorce, F. et al. 2005. Modifications in P62 occur due to proteasome inhibition in alcoholic liver disease. *Life Sci.* 77: 2594-2602.
- Bardonnet, A., and P. Riera. 2005. Feeding of glass eels (*Anguilla anguilla*) in the course of their estuarine migration: new insights from stable isotope analysis. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 63: 201-209.

- Benato, F. et al. 2013. Ambra1 knockdown in zebrafish leads to incomplete development due to severe defects in organogenesis. *Autophagy* 9: 476-495.
- Berg, T. O., M. Fengsrud, P. E. Strømhaug, T. Berg, and P. O. Seglen. 1998. Isolation and Characterization of Rat Liver Amphisomes: EVIDENCE FOR FUSION OF AUTOPHAGOSOMES WITH BOTH EARLY AND LATE ENDOSOMES. *J. Biol. Chem.* 273: 21883-21892.
- Birkenfeld, A. L. et al. 2011. Influence of the hepatic eukaryotic initiation factor 2alpha (eIF2alpha) endoplasmic reticulum (ER) stress response pathway on insulin-mediated ER stress and hepatic and peripheral glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 286: 36163-36170.
- Biswas, K., J. L. Khongsngi, D. Haussinger, and N. Saha. 2009. Influence of cell volume changes on autophagic proteolysis in the perfused liver of air-breathing walking catfish (*Clarias batrachus*). *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 311: 115-124.
- Bjorkoy, G. et al. 2005. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* 171: 603-614.
- Bodemann, B. O. et al. 2011. RalB and the exocyst mediate the cellular starvation response by direct activation of autophagosome assembly. *Cell* 144: 253-267.
- Bodine, S. C. et al. 2001. Identification of Ubiquitin Ligases Required for Skeletal Muscle Atrophy. *Science* 294: 1704-1708.
- Bonaldo, P., and M. Sandri. 2013. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease Models & Mechanisms* 6: 25-39.
- Boya, P., F. Reggiori, and P. Codogno. 2013. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol* 15: 713-720.
- Bruhat, A. et al. 1997. 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.
- Brunk, U. T., and A. Terman. 2002. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 611-619.
- Cao, P. R., H. J. Kim, and S. H. Lecker. 2005. Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37: 2088-2097.
- Castets, P. et al. 2013. Sustained Activation of mTORC1 in Skeletal Muscle Inhibits Constitutive and Starvation-Induced Autophagy and Causes a Severe, Late-Onset Myopathy. *Cell Metab* 17: 731-744.

- Chauhan, S. et al. 2013. ZKSCAN3 is a master transcriptional repressor of autophagy. *Mol. Cell* 50: 16-28.
- Chotechuang, N. et al. 2011. Down-regulation of the ubiquitin-proteasome proteolysis system by amino acids and insulin involves the adenosine monophosphate-activated protein kinase and mammalian target of rapamycin pathways in rat hepatocytes. *Amino Acids* 41: 457-468.
- Colecchia, D. et al. 2012. MAPK15/ERK8 stimulates autophagy by interacting with LC3 and GABARAP proteins. *Autophagy* 8: 1724-1740.
- Cook, K. et al. 2014. Mitochondria directly donate their membrane to form autophagosomes during a novel mechanism of parkin-associated mitophagy. *Cell & Bioscience* 4: 16.
- Cowey, C. B., C. Y. Cho, J. G. Sivak, J. A. Weerheim, and D. D. Stuart. 1992. Methionine Intake in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Relationship to Cataract Formation and the Metabolism of Methionine. *The Journal of Nutrition* 122: 1154-1163.
- Cuervo, A. M. 2004. Autophagy: many paths to the same end. *Mol. Cell. Biochem.* 263: 55-72.
- Cuervo, A. M., and E. Wong. 2014. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res.* 24: 92-104.
- Dawaliby, R., and A. Mayer. 2010. Microautophagy of the nucleus coincides with a vacuolar diffusion barrier at nuclear-vacuolar junctions. *Mol. Biol. Cell* 21: 4173-4183.
- De Duve, C., and R. Wattiaux. 1966. Functions of lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.* 28: 435-492.
- De Palma, C. et al. 2012. Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Death Dis* 3: e418.
- Deter, R. L., P. Baudhuin, and C. De Duve. 1967. Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon. *J. Cell Biol.* 35: C11-16.
- Deval, C. et al. 2009. Amino acid limitation regulates the expression of genes involved in several specific biological processes through GCN2-dependent and GCN2-independent pathways. *FEBS Journal* 276: 707-718.
- Dong, J., H. Qiu, M. Garcia-Barrio, J. Anderson, and A. G. Hinnebusch. 2000. Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Mol. Cell* 6: 269-279.
- Dowling, J. J., S. E. Low, A. S. Busta, and E. L. Feldman. 2010. Zebrafish MTMR14 is required for excitation-contraction coupling, developmental motor function and the regulation of autophagy. *Hum. Mol. Genet.* 19: 2668-2681.

- Doyle, A., G. Zhang, E. A. Abdel Fattah, N. T. Eissa, and Y. P. Li. 2011. Toll-like receptor 4 mediates lipopolysaccharide-induced muscle catabolism via coordinate activation of ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways. *FASEB J.* 25: 99-110.
- Duan, X., L. Ponomareva, S. Veeranki, and D. Choubey. 2011. IFI16 Induction by Glucose Restriction in Human Fibroblasts Contributes to Autophagy through Activation of the ATM/AMPK/p53 Pathway. *PLoS ONE* 6: e19532.
- Duran, R. V. et al. 2012. Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling. *Mol. Cell* 47: 349-358.
- Efeyan, A. et al. 2013. Regulation of mTORC1 by the Rag GTPases is necessary for neonatal autophagy and survival. *Nature* 493: 679-683.
- Egan, D. F. et al. 2011. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-Activated Protein Kinase Connects Energy Sensing to Mitophagy. *Science* 331: 456-461.
- Ezaki, J. et al. 2011. Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels. *Autophagy* 7: 727-736.
- Fader, C. M., and M. I. Colombo. 2008. Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death Differ.* 16: 70-78.
- Feng, Y., D. He, Z. Yao, and D. J. Klionsky. 2014. The machinery of macroautophagy. *Cell Res.* 24: 24-41.
- Forgac, M. 2007. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 917-929.
- Fujita, N. et al. 2008. An Atg4B Mutant Hampers the Lipidation of LC3 Paralogues and Causes Defects in Autophagosome Closure. *Mol. Biol. Cell* 19: 4651-4659.
- Fukuda, T., A. Roberts, P. H. Plotz, and N. Raben. 2007. Acid alpha-glucosidase deficiency (Pompe disease). *Curr Neurol Neurosci Rep* 7: 71-77.
- Fullgrabe, J., D. J. Klionsky, and B. Joseph. 2014. The return of the nucleus: transcriptional and epigenetic control of autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 65-74.
- Füllgrabe, J., D. J. Klionsky, and B. Joseph. 2013. Histone post-translational modifications regulate autophagy flux and outcome. *Autophagy* 9: 1621-1623.
- Garcia-Valtanen, P. et al. 2014. Autophagy-inducing peptides from mammalian VSV and fish VHSV rhabdoviral G glycoproteins (G) as models for the development of new therapeutic molecules. *Autophagy* 10: 1666-1680.
- Geisler, S. et al. 2010. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* 12: 119-131.

- Geng, J., and D. J. Klionsky. 2010. The Golgi as a potential membrane source for autophagy. *Autophagy* 6: 950-951.
- Ghislat, G., M. Patron, R. Rizzuto, and E. Knecht. 2012. Withdrawal of Essential Amino Acids Increases Autophagy by a Pathway Involving Ca²⁺/Calmodulin-dependent Kinase Kinase- β (CaMKK- β). *J. Biol. Chem.* 287: 38625-38636.
- Glass, D. J. 2010. Signaling pathways perturbing muscle mass. *Curr Opin Clin Nutr* 13: 225-229. [229 210.1097/MCO.1090b1013e32833862df](https://doi.org/10.1097/MCO.1090b1013e32833862df).
- Greenberg, A. S. et al. 2011. The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. *J. Clin. Invest.* 121: 2102-2110.
- Grumati, P. et al. 2010. Autophagy is defective in collagen VI muscular dystrophies, and its reactivation rescues myofiber degeneration. *Nat. Med.* 16: 1313-1320.
- Grumati, P., L. Coletto, M. Sandri, and P. Bonaldo. 2011. Autophagy induction rescues muscular dystrophy. *Autophagy* 7: 426-428.
- Guderley, H., D. Lapointe, M. Bédard, and J.-D. Dutil. 2003. Metabolic priorities during starvation: enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 135: 347-356.
- Gurkan, C., A. Koulov, and W. Balch. 2007. An Evolutionary Perspective on Eukaryotic Membrane Trafficking Eukaryotic Membranes and Cytoskeleton. *Advances in Experimental Medicine and Biology* No. 607. p 73-83. Springer New York.
- Gwinn, D. M. et al. 2008. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* 30: 214-226.
- Harding, H. P. et al. 2000. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* 6: 1099-1108.
- Haspel, J. et al. 2011. Characterization of macroautophagic flux in vivo using a leupeptin-based assay. *Autophagy* 7: 629-642.
- Hawley, S. A. et al. 1995. 5'-AMP activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca²⁺/calmodulin activates the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* 270: 27186-27191.
- Hayashi-Nishino, M. et al. 2009. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol* 11: 1433-1437.
- He, C., C. R. Bartholomew, W. Zhou, and D. J. Klionsky. 2009. Assaying autophagic activity in transgenic GFP-Lc3 and GFP-Gabarap zebrafish embryos. *Autophagy* 5: 520-526.

- He, C., and D. Klionsky. 2009b. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* 43: 67 - 93.
- Hemre, G. I., O. Lie, and A. Sundby. 1993. Dietary carbohydrate utilization in cod (*Gadus morhua*): metabolic responses to feeding and fasting. *Fish Physiol Biochem* 10: 455-463.
- Hong, S. P., F. C. Leiper, A. Woods, D. Carling, and M. Carlson. 2003. Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 8839-8843.
- Hosokawa, N. et al. 2009. Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1–Atg13–FIP200 Complex Required for Autophagy. *Mol. Biol. Cell* 20: 1981-1991.
- Hosseini, R. et al. 2014. Correlative light and electron microscopy imaging of autophagy in a zebrafish infection model. *Autophagy* 10: 1844-1857.
- Hu, Z., J. Zhang, and Q. Zhang. 2011. Expression pattern and functions of autophagy-related gene atg5 in zebrafish organogenesis. *Autophagy* 7: 1514-1527.
- Huang, W.-P., and D. J. Klionsky. 2002. Autophagy in Yeast: A Review of the Molecular Machinery. *Cell Struct. Funct.* 27: 409-420.
- Hughes, T., and T. Rusten. 2007. Origin and Evolution of Self-Consumption: Autophagy Eukaryotic Membranes and Cytoskeleton. *Advances in Experimental Medicine and Biology* No. 607. p 111-118. Springer New York.
- Ichimura, Y. et al. 2008. Structural Basis for Sorting Mechanism of p62 in Selective Autophagy. *J. Biol. Chem.* 283: 22847-22857.
- Iwai-Kanai, E. et al. 2008. A method to measure cardiac autophagic flux in vivo. *Autophagy* 4: 322-329.
- Iwata, J. et al. 2006. Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals. *J. Biol. Chem.* 281: 4035-4041.
- Jaber, N. et al. 2012. Class III PI3K Vps34 plays an essential role in autophagy and in heart and liver function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 2003-2008.
- Jackson, A. J., and B. S. Capper. 1982. Investigations into the requirements of the tilapia *Sarotherodon mossambicus* for dietary methionine, lysine and arginine in semi-synthetic diets. *Aquaculture* 29: 289-297.
- Jahreiss, L., F. M. Menzies, and D. C. Rubinsztein. 2008. The Itinerary of Autophagosomes: From Peripheral Formation to Kiss-and-Run Fusion with Lysosomes. *Traffic* 9: 574-587.

- Jewell, J. L., R. C. Russell, and K. L. Guan. 2013. Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 133-139.
- Jin, M., X. Liu, and D. J. Klionsky. 2013. SnapShot: Selective autophagy. *Cell* 152: 368-368 e362.
- Jousse, C. et al. 2004. Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313: 447-452.
- Ju, J.-S., A. S. Varadhachary, S. E. Miller, and C. C. Wehl. 2010. Quantitation of "autophagic flux" in mature skeletal muscle. *Autophagy* 6: 929-935.
- Ju, J. S. et al. 2009. Quantitation of selective autophagic protein aggregate degradation in vitro and in vivo using luciferase reporters. *Autophagy* 5: 511-519.
- Juhász, G. et al. 2007. Gene expression profiling identifies FKBP39 as an inhibitor of autophagy in larval *Drosophila* fat body. *Cell Death Differ.* 14: 1181-1190.
- Jung, C. H. et al. 2009. ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Mol. Biol. Cell* 20: 1992-2003.
- Kabeya, Y. et al. 2004. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J. Cell Sci.* 117: 2805-2812.
- Kalamidas, S. A., and O. B. Kotoulas. 2000. Glycogen autophagy in newborn rat hepatocytes. *Histol. Histopathol.* 15: 1011-1018.
- Kee, A. J. et al. 2003. Ubiquitin–proteasome-dependent muscle proteolysis responds slowly to insulin release and refeeding in starved rats. *J. Physiol. (Lond).* 546: 765-776.
- Kiffin, R., U. Bandyopadhyay, and A. M. Cuervo. 2006. Oxidative stress and autophagy. *Antioxid Redox Signal* 8: 152-162.
- Kim, I., S. Rodriguez-Enriquez, and J. J. Lemasters. 2007. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch. Biochem. Biophys.* 462: 245-253.
- Kim, J. et al. 2013. Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell* 152: 290-303.
- Kim, J., and D. J. Klionsky. 2000. autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 303-342.
- Kim, J., M. Kundu, B. Viollet, and K.-L. Guan. 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 13: 132-141.
- Kim, K.-I., T. B. Kayes, and C. H. Amundson. 1992. Requirements for sulfur amino acids and utilization of D-methionine by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 101: 95-103.

- Kimball, S. R., and L. S. Jefferson. 2004. Regulation of global and specific mRNA translation by oral administration of branched-chain amino acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313: 423-427.
- Kimball, S. R., L. M. Shantz, R. L. Horetsky, and L. S. Jefferson. 1999. Leucine Regulates Translation of Specific mRNAs in L6 Myoblasts through mTOR-mediated Changes in Availability of eIF4E and Phosphorylation of Ribosomal Protein S6. *J. Biol. Chem.* 274: 11647-11652.
- Klionsky, D. J. 2005. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J. Cell Sci.* 118: 7-18.
- Klionsky, D. J. et al. 2012. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8: 445-554.
- Klionsky, D. J., and P. Codogno. 2013. The mechanism and physiological function of macroautophagy. *J Innate Immun* 5: 427-433.
- Klionsky, D. J., Z. Elazar, P. O. Seglen, and D. C. Rubinsztein. 2008. Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? *Autophagy* 4: 849-850.
- Klionsky, D. J., and S. D. Emr. 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290: 1717-1721.
- Kobayashi, S., X. Xu, K. Chen, and Q. Liang. 2012. Suppression of autophagy is protective in high glucose-induced cardiomyocyte injury. *Autophagy* 8: 577-592.
- Komatsu, M. et al. 2006. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441: 880-884.
- Komatsu, M. et al. 2005. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *The Journal of Cell Biology* 169: 425-434.
- Korolchuk, V. I., A. Mansilla, F. M. Menzies, and D. C. Rubinsztein. 2009. Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. *Mol. Cell* 33: 517-527.
- Kotoulas, O. B., S. A. Kalamidas, and D. J. Kondomerkos. 2006. Glycogen autophagy in glucose homeostasis. *Pathology - Research and Practice* 202: 631-638.
- Kraft, C., A. Deplazes, M. Sohrmann, and M. Peter. 2008. Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nat Cell Biol* 10: 602-610.
- Kuma, A. et al. 2004. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432: 1032-1036.

- Kurihara, Y. et al. 2012. Mitophagy plays an essential role in reducing mitochondrial production of reactive oxygen species and mutation of mitochondrial DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast. *J. Biol. Chem.* 287: 3265-3272.
- Lansard, M. et al. 2011. L-leucine, L-methionine, and L-lysine are involved in the regulation of intermediary metabolism-related gene expression in rainbow trout hepatocytes. *J. Nutr.* 141: 75-80.
- Lansard, M., S. Panserat, E. Plagnes-Juan, I. Seiliez, and S. Skiba-Cassy. 2010. Integration of insulin and amino acid signals that regulate hepatic metabolism-related gene expression in rainbow trout: role of TOR. *Amino Acids* 39: 801-810.
- Laplante, M., and D. M. Sabatini. 2012. mTOR Signaling. *Cell*; 149 (2):274-293.
- Lazarou, M. et al. 2013. PINK1 drives Parkin self-association and HECT-like E3 activity upstream of mitochondrial binding. *J. Cell Biol.* 200: 163-172.
- Lecker, S. H. et al. 2004. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J.* 18: 39-51.
- Lecker, S. H., V. Solomon, W. E. Mitch, and A. L. Goldberg. 1999. Muscle Protein Breakdown and the Critical Role of the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Normal and Disease States. *J. Nutr.* 129: 227S-237S.
- Lee, Y. et al. 2012. Prophylactic effects of swimming exercise on autophagy-induced muscle atrophy in diabetic rats. *Lab Anim Res* 28: 171-179.
- Levine, B., and V. Deretic. 2007. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 7: 767-777.
- Li, W.-w., J. Li, and J.-k. Bao. 2012. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell. Mol. Life Sci.* 69: 1125-1136.
- Liang, C. et al. 2006. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol* 8: 688-698.
- Liou, W., H. J. Geuze, M. J. Geelen, and J. W. Slot. 1997. The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles. *J. Cell Biol.* 136: 61-70.
- Majeski, A. E., and J. Fred Dice. 2004. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36: 2435-2444.
- Mambrini, M., A. J. Roem, J. P. Carvèdi, J. P. Lallès, and S. J. Kaushik. 1999. Effects of replacing fish meal with soy protein concentrate and of DL-methionine supplementation in high-energy, extruded diets on the growth and nutrient utilization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Anim. Sci.* 77: 2990-2999.

- Mammucari, C. et al. 2007. FoxO3 Controls Autophagy in Skeletal Muscle In Vivo. *Cell Metab* 6: 458-471.
- Manjithaya, R., T. Y. Nazarko, J. C. Farre, and S. Subramani. 2010. Molecular mechanism and physiological role of pexophagy. *FEBS Lett.* 584: 1367-1373.
- Mari, M., S. A. Tooze, and F. Reggiori. 2011. The puzzling origin of the autophagosomal membrane. *F1000 Biol Rep* 3: 25.
- Martina, J. A., Y. Chen, M. Gucek, and R. Puertollano. 2012. MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy* 8: 903-914.
- Martinet, W., G. Y. Meyer, A. Herman, and M. Kockx. 2005. Amino Acid Deprivation Induces Both Apoptosis and Autophagy in Murine C2C12 Muscle Cells. *Biotechnology Letters* 27: 1157-1163.
- Martinez-Vicente, M. et al. 2010. Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat. Neurosci.* 13: 567-576.
- Marzella, L., J. Ahlberg, and H. Glaumann. 1981. Autophagy, heterophagy, microautophagy and crinophagy as the means for intracellular degradation. *Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 36: 219-234.
- Masiero, E. et al. 2009. Autophagy Is Required to Maintain Muscle Mass. *Cell Metab* 10: 507-515.
- Massey, A. C., S. Kaushik, G. Sovak, R. Kiffin, and A. M. Cuervo. 2006. Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 5805-5810.
- Matsuzawa, T. et al. 2012. IFN-gamma elicits macrophage autophagy via the p38 MAPK signaling pathway. *J. Immunol.* 189: 813-818.
- Meijer, A. J., and P. Codogno. 2008. Nutrient sensing: TOR's Ragtime. *Nat Cell Biol* 10: 881-883.
- Merlini, L., and I. Nishino. 2014. 201st ENMC International Workshop: Autophagy in muscular dystrophies--translational approach, 1-3 November 2013, Bussum, The Netherlands. *Neuromuscul. Disord.* 24: 546-561.
- Metayer, S. et al. 2008. Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status. *J Nutr Biochem* 19: 207-215.
- Mijaljica, D., M. Prescott, and R. J. Devenish. 2011. Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* 7: 673-682.

- Mizushima, N., and D. J. Klionsky. 2007. Protein Turnover Via Autophagy: Implications for Metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 27: 19-40.
- Mizushima, N., and M. Komatsu. 2011. Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell* 147: 728-741.
- Mizushima, N., A. Yamamoto, M. Matsui, T. Yoshimori, and Y. Ohsumi. 2004. In Vivo Analysis of Autophagy in Response to Nutrient Starvation Using Transgenic Mice Expressing a Fluorescent Autophagosome Marker. *Mol. Biol. Cell* 15: 1101-1111.
- Mizushima, N., and T. Yoshimori. 2007. How to Interpret LC3 Immunoblotting. *Autophagy* 3: 542-545.
- Mizushima, N., T. Yoshimori, and B. Levine. 2010. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 140: 313-326.
- Momcilovic, M., S. P. Hong, and M. Carlson. 2006. Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *J. Biol. Chem.* 281: 25336-25343.
- Mommsen, T. P. 2004. Salmon spawning migration and muscle protein metabolism: the August Krogh principle at work. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 139: 383-400.
- Mommsen, T. P., C. J. French, and P. W. Hochachka. 1980. Sites and patterns of protein and amino acid utilization during the spawning migration of salmon. *Can. J. Zool.* 58: 1785-1799.
- Moon, T. W. 2001. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 129: 243-249.
- Moore, M. N. 1990. Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring. *Histochem. J.* 22: 187-191.
- Moore, M. N. 2004. Diet restriction induced autophagy: a lysosomal protective system against oxidative- and pollutant-stress and cell injury. *Mar Environ Res* 58: 603-607.
- Moore, M. N., J. I. Allen, A. McVeigh, and J. Shaw. 2006a. Lysosomal and autophagic reactions as predictive indicators of environmental impact in aquatic animals. *Autophagy* 2: 217-220.
- Moore, M. N., J. Icarus Allen, and A. McVeigh. 2006b. Environmental prognostics: an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Mar Environ Res* 61: 278-304.
- Mordier, S., C. Deval, D. Béchet, A. Tassa, and M. Ferrara. 2000. Leucine Limitation Induces Autophagy and Activation of Lysosome-dependent Proteolysis in C2C12

- Myotubes through a Mammalian Target of Rapamycin-independent Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* 275: 29900-29906.
- Moreau, K. et al. 2014. PICALM modulates autophagy activity and tau accumulation. *Nat Commun* 5: 4998.
- Mortimore, G. E., and A. R. Poso. 1987. Intracellular Protein Catabolism and its Control During Nutrient Deprivation and Supply. *Annu. Rev. Nutr.* 7: 539-568.
- Moscat, J., and M. T. Diaz-Meco. 2009. To aggregate or not to aggregate? A new role for p62. *EMBO Rep* 10: 804.
- Mostowy, S. et al. 2013. The zebrafish as a new model for the in vivo study of *Shigella flexneri* interaction with phagocytes and bacterial autophagy. *PLoS Pathog* 9: e1003588.
- Munafó, D. B., and M. I. Colombo. 2001. A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *J. Cell Sci.* 114: 3619-3629.
- Naimi, M., and E. Van Obberghen. 2008. [Nuclear FoxO1 as a bridge between metabolism and mitogenesis]. *Med Sci (Paris)* 24: 635-639.
- Narendra, D., L. A. Kane, D. N. Hauser, I. M. Fearnley, and R. J. Youle. 2010. p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy* 6: 1090-1106.
- Naylor, R. L. et al. 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 15103-15110.
- Nishino, I. et al. 2000. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature* 406: 906-910.
- Nixon, R. A. 2013. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat. Med.* 19: 983-997.
- Noda, T., N. Fujita, and T. Yoshimori. 2009. The late stages of autophagy: how does the end begin. *Cell Death Differ.* 16: 984-990.
- Ohoka, N., S. Yoshii, T. Hattori, K. Onozaki, and H. Hayashi. 2005. TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J.* 24: 1243-1255.
- Ohsumi, Y. 2014. Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res.* 24: 9-23.
- Orsi, A. et al. 2012. Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* 23: 1860-1873.
- Palmieri, M. et al. 2011. Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Hum. Mol. Genet.* 20: 3852-3866.

- Paludan, C. et al. 2005. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* 307: 593-596.
- Panserat, S. et al. 2009. Metformin improves postprandial glucose homeostasis in rainbow trout fed dietary carbohydrates: a link with the induction of hepatic lipogenic capacities? *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 297: R707-715.
- Papinski, D. et al. 2014. Early steps in autophagy depend on direct phosphorylation of Atg9 by the Atg1 kinase. *Mol. Cell* 53: 471-483.
- Parzych, K. R., and D. J. Klionsky. 2014. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal* 20: 460-473.
- Pattingre, S. et al. 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122: 927-939.
- Pietrocola, F. et al. 2013. Regulation of autophagy by stress-responsive transcription factors. *Semin. Cancer Biol.* 23: 310-322.
- Pipe, R. K., and M. N. Moore. 1985. The ultrastructural localization of lysosomal acid hydrolases in developing oocytes of the common marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochem. J.* 17: 939-949.
- Polson, H. E. J. et al. 2010. Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy* 6: 506-522.
- Raben, N. et al. 2008. Suppression of autophagy in skeletal muscle uncovers the accumulation of ubiquitinated proteins and their potential role in muscle damage in Pompe disease. *Hum. Mol. Genet.* 17: 3897-3908.
- Ramachandran, N. et al. 2009. RETRACTED: VMA21 Deficiency Causes an Autophagic Myopathy by Compromising V-ATPase Activity and Lysosomal Acidification. *Cell* 137: 235-246.
- Ravikumar, B. et al. 2009. Mammalian macroautophagy at a glance. *J. Cell Sci.* 122: 1707-1711.
- Ravikumar, B., K. Moreau, L. Jahreiss, C. Puri, and D. C. Rubinsztein. 2010. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol* 12: 747-757.
- Ravikumar, B. et al. 2003. Raised intracellular glucose concentrations reduce aggregation and cell death caused by mutant huntingtin exon 1 by decreasing mTOR phosphorylation and inducing autophagy. *Hum. Mol. Genet.* 12: 985-994.

- Roberts, D. J., V. P. Tan-Sah, E. Y. Ding, J. M. Smith, and S. Miyamoto. 2014. Hexokinase-II positively regulates glucose starvation-induced autophagy through TORC1 inhibition. *Mol. Cell* 53: 521-533.
- Rouschop, K. M. et al. 2010. The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J. Clin. Invest.* 120: 127-141.
- Rubinsztein, David C., T. Shpilka, and Z. Elazar. 2012. Mechanisms of Autophagosome Biogenesis. *Curr. Biol.* 22: R29-R34.
- Rumsey, G. L., J. W. Page, and M. L. Scott. 1983. Methionine and Cystine Requirements of Rainbow Trout. *The Progressive Fish-Culturist* 45: 139-143.
- Russell, R. C., H.-X. Yuan, and K.-L. Guan. 2014. Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Res.* 24: 42-57.
- Rusten, T. E., and H. Stenmark. 2009. How do ESCRT proteins control autophagy? *J. Cell Sci.* 122: 2179-2183.
- Rzymiski, T., M. Milani, D. C. Singleton, and A. L. Harris. 2009. Role of ATF4 in regulation of autophagy and resistance to drugs and hypoxia. *Cell Cycle* 8: 3838-3847.
- Saftig, P., and J. Klumperman. 2009. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 623-635.
- Salem, M., P. B. Kenney, C. E. Rexroad, and J. Yao. 2006. Molecular characterization of muscle atrophy and proteolysis associated with spawning in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 1: 227-237.
- Sandri, M. 2008. Signaling in Muscle Atrophy and Hypertrophy. *Physiology* 23: 160-170.
- Sandri, M. 2010. Autophagy in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 584: 1411-1416.
- Sandri, M. 2012. FOXOphagy path to inducing stress resistance and cell survival. *Nat Cell Biol* 14: 786-788.
- Sandri, M., L. Coletto, P. Grumati, and P. Bonaldo. 2013. Misregulation of autophagy and protein degradation systems in myopathies and muscular dystrophies. *J. Cell Sci.* 126: 5325-5333.
- Sardiello, M. et al. 2009. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* 325: 473-477.
- Sasaki, T. et al. 2014. Aberrant autolysosomal regulation is linked to the induction of embryonic senescence: differential roles of Beclin 1 and p53 in vertebrate Spns1 deficiency. *PLoS Genet* 10: e1004409.

- Scherz-Shouval, R., and Z. Elazar. 2007. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol.* 17: 422-427.
- Schiaffino, S., and C. Mammucari. 2011. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skelet Muscle* 1: 4.
- Schneider, J. L., Y. Suh, and A. M. Cuervo. 2014. Deficient chaperone-mediated autophagy in liver leads to metabolic dysregulation. *Cell Metab* 20: 417-432.
- Scott, S. V., J. Guan, M. U. Hutchins, J. Kim, and D. J. Klionsky. 2001. Cvt19 is a receptor for the cytoplasm-to-vacuole targeting pathway. *Mol. Cell* 7: 1131-1141.
- Sedeek, M. et al. 2010. Critical role of Nox4-based NADPH oxidase in glucose-induced oxidative stress in the kidney: implications in type 2 diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 299: F1348-1358.
- Seiliez, I. et al. 2012. Amino acids downregulate the expression of several autophagy-related genes in rainbow trout myoblasts. *Autophagy* 8: 364-375.
- Seiliez, I. et al. 2010. 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.
- Seiliez, I. et al. 2011. Dietary carbohydrate-to-protein ratio affects TOR signaling and metabolism-related gene expression in the liver and muscle of rainbow trout after a single meal. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 300: R733-R743.
- Sengupta, A., J. D. Molkenin, and K. E. Yutzey. 2009. FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 284: 28319-28331.
- Sengupta, S., T. R. Peterson, and D. M. Sabatini. 2010. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol. Cell* 40: 310-322.
- Settembre, C., and A. Ballabio. 2011. TFEB regulates autophagy: An integrated coordination of cellular degradation and recycling processes. *Autophagy* 7: 1379-1381.
- Settembre, C. et al. 2012. A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J.* 31: 1095-1108.
- Sheen, J. H., R. Zoncu, D. Kim, and D. M. Sabatini. 2011. Defective regulation of autophagy upon leucine deprivation reveals a targetable liability of human melanoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Cell* 19: 613-628.
- Shelburne, J. D., A. U. Arstila, and B. F. Trump. 1973. Studies on cellular autophagocytosis. The relationship of autophagocytosis to protein synthesis and to energy metabolism in rat liver and flounder kidney tubules *in vitro*. *Am. J. Pathol.* 73: 641-670.

- Shintani, T., and D. J. Klionsky. 2004. Cargo Proteins Facilitate the Formation of Transport Vesicles in the Cytoplasm to Vacuole Targeting Pathway. *J. Biol. Chem.* 279: 29889-29894.
- Shuvayeva, G. et al. 2014. Single Amino Acid Arginine Deprivation Triggers Prosurvival Autophagic Response in Ovarian Carcinoma SKOV3. *BioMed Research International* 2014: 10.
- Singh, R. 2011. Hypothalamic lipophagy and energetic balance. *Aging (Albany NY)* 3: 934-942.
- Singh, R., and A. M. Cuervo. 2012. Lipophagy: Connecting Autophagy and Lipid Metabolism. *International Journal of Cell Biology* 2012: 12.
- Singh, R. et al. 2009a. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458: 1131-1135.
- Singh, R. et al. 2009b. Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *J. Clin. Invest.* 119: 3329-3339.
- Sok, J. et al. 1999. CHOP-Dependent stress-inducible expression of a novel form of carbonic anhydrase VI. *Mol. Cell. Biol.* 19: 495-504.
- Sutter, Benjamin M., X. Wu, S. Laxman, and Benjamin P. Tu. 2013. Methionine Inhibits Autophagy and Promotes Growth by Inducing the SAM-Responsive Methylation of PP2A. *Cell* 154: 403-415.
- Sveier, Nordås, Berge, and Lied. 2001. Dietary inclusion of crystalline D- and L-methionine: effects on growth, feed and protein utilization, and digestibility in small and large Atlantic salmon (*Salmon salar* L.). *Aquaculture Nutrition* 7: 169-181.
- Takikita, S., R. Myerowitz, K. Zaal, N. Raben, and P. H. Plotz. 2009. Murine muscle cell models for Pompe disease and their use in studying therapeutic approaches. *Mol. Genet. Metab.* 96: 208-217.
- Tanida, I., N. Minematsu-Ikeguchi, T. Ueno, and E. Kominami. 2005. Lysosomal Turnover, but Not a Cellular Level, of Endogenous LC3 is a Marker for Autophagy. *Autophagy* 1: 84-91.
- Tanida, I., T. Ueno, and E. Kominami. 2004. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36: 2503-2518.
- Tassa, A., M. P. Roux, D. Attaix, and D. M. Bechet. 2003. Class III phosphoinositide 3-kinase--Beclin1 complex mediates the amino acid-dependent regulation of autophagy in C2C12 myotubes. *Biochem. J.* 376: 577-586.
- Tesseraud, S. et al. 2007. Insulin and amino acid availability regulate atrogen-1 in avian QT6 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357: 181-186.

- Tesseraud, S., S. Métayer Coustard, A. Collin, and I. Seiliez. 2009. Role of sulfur amino acids in controlling nutrient metabolism and cell functions: implications for nutrition. *Br. J. Nutr.* 101: 1132-1139.
- Todde, V., M. Veenhuis, and I. J. van der Klei. 2009. Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1792: 3-13.
- Tsukamoto, S. et al. 2008. Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science* 321: 117-120.
- Urrutia, R. 2003. KRAB-containing zinc-finger repressor proteins. *Genome Biol* 4: 231.
- Van der Vaart, M. et al. 2014. The DNA damage-regulated autophagy modulator DRAM1 links mycobacterial recognition via TLP-MYD88 to autophagic defense. *Cell Host Microbe* 15: 753-767.
- Van der Vos, K. E., and P. J. Coffey. 2012. Glutamine metabolism links growth factor signaling to the regulation of autophagy. *Autophagy* 8: 1862-1864.
- Van der Vos, K. E. et al. 2012a. Modulation of glutamine metabolism by the PI(3)K-PKB-FOXO network regulates autophagy. *Nat Cell Biol* 14: 829-837.
- Van der Vos, K. E., C. Gomez-Puerto, and P. J. Coffey. 2012b. Regulation of autophagy by Forkhead box (FOX) O transcription factors. *Adv Biol Regul* 52: 122-136.
- Von der Decken, A. 1992. Physiological changes in skeletal muscle by maturation-spawning of non-migrating female atlantic salmon, *Salmo salar*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 101: 299-301.
- Wang, R. C. et al. 2012. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science* 338: 956-959.
- Warr, M. R. et al. 2013. FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells. *Nature* 494: 323-327.
- Webber, J. L., and S. A. Tooze. 2010. Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP. *EMBO J.* 29: 27-40.
- Weber, S. M., and S. M. Levitz. 2000. Chloroquine interferes with lipopolysaccharide-induced TNF-alpha gene expression by a nonlysosomotropic mechanism. *J. Immunol.* 165: 1534-1540.
- Wei, Y. et al. 2013. EGFR-mediated Beclin 1 phosphorylation in autophagy suppression, tumor progression, and tumor chemoresistance. *Cell* 154: 1269-1284.
- Weidberg, H. et al. 2010. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis.

- Xie, R., S. Nguyen, W. L. McKeehan, and L. Liu. 2010. Acetylated microtubules are required for fusion of autophagosomes with lysosomes. *BMC Cell Biol* 11: 89.
- Xie, Z., and D. J. Klionsky. 2007. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 9: 1102-1109.
- Yabu, T., S. Imamura, N. Mizusawa, K. Touhata, and M. Yamashita. 2012. Induction of Autophagy by Amino Acid Starvation in Fish Cells. *Mar. Biotechnol.* 14: 491-501.
- Yamamoto, H. et al. 2012. Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *J. Cell Biol.* 198: 219-233.
- Yamashita, M., and S. Konagaya. 1990. High activities of cathepsins B, D, H, and L in the white muscle of chum salmon in spawning migration. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 95: 149-152.
- Yan, J. et al. 2012. Enhanced autophagy plays a cardinal role in mitochondrial dysfunction in type 2 diabetic Goto–Kakizaki (GK) rats: ameliorating effects of (–)-epigallocatechin-3-gallate. *J. Nutr. Biochem.* 23: 716-724.
- Yang, L., P. Li, S. Fu, E. S. Calay, and G. S. Hotamisligil. 2010. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab* 11: 467-478.
- Yla-Anttila, P., H. Vihinen, E. Jokitalo, and E. L. Eskelinen. 2009. Monitoring autophagy by electron microscopy in Mammalian cells. *Methods Enzymol.* 452: 143-164.
- Yoon, Y. H. et al. 2010. Induction of Lysosomal Dilatation, Arrested Autophagy, and Cell Death by Chloroquine in Cultured ARPE-19 Cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51: 6030-6037.
- Yoshizawa, F., S. R. Kimball, T. C. Vary, and L. S. Jefferson. 1998. Effect of dietary protein on translation initiation in rat skeletal muscle and liver. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 275: E814-E820.
- Yu, T., J. L. Robotham, and Y. Yoon. 2006. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 2653-2658.
- Zhang, Y. et al. 2007. The role of autophagy in mitochondria maintenance: characterization of mitochondrial functions in autophagy-deficient *S. cerevisiae* strains. *Autophagy* 3: 337-346.
- Zhao, J. et al. 2007. FoxO3 Coordinately Activates Protein Degradation by the Autophagic/Lysosomal and Proteasomal Pathways in Atrophiying Muscle Cells. *Cell Metab* 6: 472-483.

- Zheng, Y. T. et al. 2009. The Adaptor Protein p62/SQSTM1 Targets Invading Bacteria to the Autophagy Pathway. *The Journal of Immunology* 183: 5909-5916.
- Zhong, Y., Q. J. Wang, and Z. Yue. 2009. Atg14L and Rubicon: yin and yang of Beclin 1-mediated autophagy control. *Autophagy* 5: 890-891.
- Zhou, L., and F. Liu. 2010. Autophagy: roles in obesity-induced ER stress and adiponectin downregulation in adipocytes. *Autophagy* 6: 1196-1197.

Résumé:

Très peu de données sont aujourd'hui disponibles sur le rôle des nutriments et de leurs interactions *in vivo* dans la régulation de l'autophagie. L'objectif principal de cette thèse était donc d'étudier l'effet de la qualité nutritionnelle de l'aliment sur le contrôle de cette fonction cellulaire. Une première étude a permis de montrer que les différents ratios en protéines et en glucides influencent significativement les mécanismes de contrôle de l'autophagie dans le muscle de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Ces résultats ont été renforcés par une étude sur culture primaire de myoblaste de truite montrant que l'addition d'acides aminés dans le milieu de culture inhibe l'autophagie alors que le glucose a un effet inverse (article 1). Une seconde étude a porté sur la fraction protéique de l'aliment et notamment sur la teneur en méthionine, dont le niveau est trop faible dans les aliments pour poissons à base de végétaux. Les résultats obtenus indiquent que la machinerie autophagosomale mais également les principaux facteurs du renouvellement des protéines musculaires sont sensible aux variations de la teneur en méthionine de l'aliment et que la réponse qui en résulte peut fortement affecter la croissance (article 2). L'ensemble des données obtenues dans les deux premières études reposaient sur la mesure du taux d'un marqueur de l'autophagie (LC3-II) qui est à la fois produite et dégradée au cours du processus (flux) autophagique. Ainsi, dans l'optique de préciser les résultats obtenus dans les deux premiers articles, une troisième étude a été effectuée afin de déterminer s'il est possible de bloquer le flux autophagique dans le muscle de truite par l'emploi de différents agents pharmacologiques (inhibiteurs du flux autophagique). Il s'agissait également de déterminer les limites de l'utilisation de tels inhibiteurs chez cette espèce. Les essais effectués n'ont pas permis de mesurer le flux autophagique dans le muscle. En revanche, l'injection intrapéritonéale de colchicine a bien bloqué le flux autophagique dans le foie, ouvrant ainsi un nouveau champ d'investigations sur le rôle de l'autophagie dans le métabolisme intermédiaire. En conclusion, l'ensemble de ces travaux montre que l'autophagie n'est pas uniquement sensible à l'état nutritionnel (jeûne/nourris) mais également à la nature des aliments consommés. Outre leurs intérêts agronomique et thérapeutique, ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour une meilleure compréhension des mécanismes d'action de l'autophagie au niveau cellulaire et métabolique mais également de son rôle dans l'adaptation des espèces au cours l'évolution.

Mots clés : truite arc-en-ciel, composition des macronutriments, muscle, flux autophagique, métabolisme hépatique.

Abstract:

Few data has been published on the role of nutrients and their interactions *in vivo* in the regulation of autophagy. The main objective of this thesis was therefore to characterize the response of the autophagic/lysosomal pathway to the macronutrients composition of the diets. The first study showed that different ratio of proteins and carbohydrates in the diet significantly affect the controls of autophagy in the muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). These results were strengthened by study on primary culture of trout myoblasts showing that the addition of amino acids in cell culture medium inhibited the formation of autophagosomes, whereas the addition of glucose had an opposite effect (paper 1). A second study focused on the protein fraction of the diet and specifically on the content of methionine, whose the levels are low in fish feed plant-based diets. The obtained results showed that both autophagy machinery and the main factors of muscle protein turnover are significantly sensitive to change in dietary methionine levels and the resulting response may strongly affect growth and feed utilization (paper 2). The data obtained in these two first studies were based on measuring the level of autophagy marker (LC3-II), which is both produced and degraded during autophagic (flux) process. Thus, in view to clarify the results obtained in the two first studies, we conducted a third study to determine whether it is possible to block the autophagic flux in trout muscle by using different lysosomotropic agents (autophagic flux inhibitors). The objective was also to determine the limits of autophagic flux inhibitors utilisation *in vivo*. Different tests failed to measure autophagic flux in the muscle of rainbow trout. In contrast, intraperitoneal injection of colchicine blocked the autophagic flux in the liver. This study allowed us to investigate the function of autophagy in the intermediary metabolism. In conclusion, these studies show that autophagy is not only sensitive to the nutritional status (fasting/fed) but also to the nature of the consumed diets. In addition to their therapeutic and agricultural interests, these results open new perspectives to better understand the mechanisms of autophagy at metabolic and cellular level but also its role in the adaptation of species during evolution.

Key words: Rainbow trout, macronutrients composition, muscle, autophagic flux, hepatic metabolism.

