

THÈSE

UNIVERSITE DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR
École doctorale 211-SCIENCES EXACTES ET LEURS APPLICATIONS

Présentée et soutenue le 14 mai 2019
par Sarah Sétit

pour obtenir le grade de docteur
de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour
Spécialité : Doctorat Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

ROLES DE LA METHIONINE SUR LE METABOLISME HEPATIQUE DE LA TRUITE ARC-EN-CIEL (*Oncorhynchus mykiss*) : FOCUS SUR LES MITOCHONDRIES

MEMBRES DU JURY

RAPPORTEURS

- | | |
|--------------------|-----------------------------|
| • Sophie Tesseraud | Directeur de recherche/INRA |
| • Alain Bruhat | Directeur de recherche/INRA |

EXAMINATEURS

- | | |
|-------------------|---|
| • Valérie Bolliet | Professeur/ Université de Pau et des Pays de l'Adour (Présidente du Jury) |
| • José Zambonino | Directeur de recherche /IFREMER |
| • Vincent Hess | Vice President Animal Nutrition Services, Evonik Nutrition & Care GmbH |

DIRECTEURS

- | | |
|---------------------|-----------------------------|
| • Iban Seiliez | Directeur de recherche/INRA |
| • Stéphane Panserat | Directeur de recherche/INRA |



Remerciements

Au cours de cette thèse, qui a été réalisée dans le cadre d'une convention CIFRE entre la société EVONIK REXIM et l'institut National de Recherche Agronomique (INRA) dans l'unité Nutrition, Métabolisme, Aquaculture (NuMeA), j'ai rencontré de nombreuses personnes que j'aimerais aujourd'hui remercier.

Dans un premier temps je souhaiterais remercier mes deux directeurs de thèse Iban Seiliez et Stéphane Panserat de m'avoir permis de réaliser cette thèse. Travailler et apprendre à vos côtés, durant ces trois années, a été une expérience extrêmement enrichissante pour moi. Merci pour toute l'aide que vous m'avez apporté et pour votre gentillesse et votre bonne humeur. Je n'oublierai pas toutes ces conversions scientifiques (ou non ^^) que nous avons eu.

I would like to thank Claudia Figueiredo Silva and Karthik Masagounder, my two scientific supervisors from Evonik. Thank you for sharing your experience with me during these three years.

Je voudrais également remercier Lucie Marandel, Stéphanie Fontagné, Anne-Catherine Maurin, Vincent Hess d'avoir accepté de participer à mes comités de thèse. Vos remarques m'ont permis d'avancer et de mûrir mon projet de thèse.

Merci aux membres de mon jury de thèse, Sophie tesseraud, Alain bruhat, Valérie Bolliet, Vientent Hess, José Zambonino, d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

J'aimerais remercier Bénédicte Salin, Arnaud Mourier et Nadine Camougrand de l'IBGC pour ces magnifiques photos de microscopie électronique et pour m'avoir aidé à mesurer les activités enzymatiques des différents complexes de la chaîne respiratoire. Merci pour tous les conseils et échanges que nous avons eu à propos des mitochondries et de la mitophagie.

Ces trois années de thèse ne se seraient pas déroulées aussi bien sans l'équipe NuMeA qui m'a accompagné durant ces trois années. Merci à Inge, Christine, Elisabeth, Anne, Alexandre, Cécile, Marianne, Fred, Anthony, Franck, Peyo, Karine, Florian, Maryse pour m'avoir aidé et conseillé dans mes manip ou autres. Je tiens également à remercier particulièrement Vincent et Karine qui ont toujours répondu présent pour me former ou pour répondre à mes nombreuses questions.

Mis à part le côté technique, durant ces trois années de thèse, j'ai rencontré de nombreuses personnes qui ont su éclairer mes journées. Je ne vais pas vous faire tout un blabla (surtout que je n'ai jamais été douée pour ça) mais je souhaiterais tout simplement vous dire :

Merci *

* Ludo, Lucie, Sarah, Jacques, Pantxo, Fred, Luis, Stéphane, Simon, Marion, Guillaume et bien sûr Laury, Elorri Thérèse et Colin.

Enfin je souhaiterais remercier mon pilier porteur, ma petite famille : Maman, Laurent, Florie, Fanny, Coralie, Quentin, et enfin PC.

PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS

Publications

Sarah Séité, Arnaud Mourier, Nadine Camougrand, Bénédicte Salin, A. Cláudia Figueiredo-Silva, Stéphanie Fontagné-Dicharry, Stéphane Panserat & Iban Seilliez (2018). Dietary methionine deficiency affects oxidative status, mitochondrial integrity and mitophagy in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). ***Scientific Reports***, 8, 10151.

Sarah Séité, Karthik Masagounder, Cécile Herault, Lucie Marandel, Stéphane Panserat & Iban Seilliez. Early feeding of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with methionine deficient diet during two weeks: consequences on mitochondria in liver of juveniles. *Submitted in **Journal of Experimental Biology***.

Sarah Séité, Tracy Pioche, Nicolas Ory, Elisabeth Plagnes-Juan, Stephane Panserat, Iban Seilliez (2019). The autophagic flux inhibitor bafilomycin a1 affects the expression of intermediary metabolism-related genes in trout hepatocytes. Accepted in ***Frontiers in Physiology***.

Sarah Séité, Karthik Masagounder, Stéphane Panserat & Iban Seilliez (February 2019). There is more to methionine than growth. ***International Aquafeed***, Volume 2, Issue 02.

Communication

Communications orales

Sarah Séité, A. Cláudia Figueiredo-Silva, Bénédicte Salin, Nadine Camougrand, Stéphanie Fontagné-Dicharry, Inge Geurden, Stéphane Panserat, Iban Seiliez. Dietary methionine restriction decreases oxidative status in rainbow trout liver through autophagy-mediated mitochondrial degradation. *Aquaculture Europe society* (Dubrovnik, Croatie, 2017)

Sarah Séité, Karthik Masagounder, Stéphane Panserat & Iban Seiliez. Short and long term impact of methionine deficiency on mitochondria in rainbow trout. *International symposium on the Feeding and Nutrition, 5th Aqua Pre-Symposium* Evonik Nutrition & Care GmbH (Gran Canaria, 2018)

Sarah Séité, Tracy Pioche, Nicolas Ory, A. Cláudia Figueiredo-Silva, Stéphane Panserat, Iban Seiliez. Highlighting the role of autophagy in metabolic adaptation of trout hepatocytes to fasting. *The 13th International congress on the biology of fish* (Calgary Canada, 2018)

Communication affichée

Sarah Séité, A. Cláudia Figueiredo-Silva, Stéphane Panserat, Iban Seiliez. Short- and long-term impacts of methionine deficiency on hepatic mitochondria in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International symposium on the Feeding and Nutrition* (Gran Canaria, 2018)

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE

Développement de l'aquaculture	1
Stratégie pour une aquaculture durable : Trouver un substitut aux farines de poisson- l'importance de l'apport en méthionine	3
La truite arc-en-ciel : une espèce importante pour l'aquaculture et un modèle en nutrition	4
Objectif général de la thèse	6

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE 1: LES DIFFERENTS RÔLES DE LA METHIONINE

1.1. Contrôle des voies de signalisation	9
1.1.1 La voie mTORC1	9
1.1.2 Les effecteurs de mTORC1: S6K1 et 4EBP1	13
1.1.3 La voie GCN2-eIF2 α	13
1.1.4 Déficience en méthionine et signalisation cellulaire chez les poissons	16
1.2. Rôle antioxydant	17
1.2.1 La méthionine : composé essentiel pour la défense de l'hôte contre le stress oxydant	18
1.2.2 Le rôle antioxydant des métabolites de la méthionine issus de la voie de transsulfuration	20
1.2.3 Impact d'une déficience en méthionine sur le statut oxydant des poissons	22
1.3. Donneur de groupement méthyl	24
1.3.1 Méthylation de l'ADN et des histones	25
1.3.2 Epigénétique et programmation nutritionnelle	30
1.3.3 Conséquences d'une déficience en méthionine sur la programmation nutritionnelle et l'épigénétique chez le poisson	32

PARTIE 2 : LA MITOCHONDRIE UN ACTEUR MAJEUR A PRENDRE EN CONSIDERATION LORS D'UNE CARENCE EN METHIONINE

2.1. Généralités sur les mitochondries	34
2.1.1 Les différentes structures des mitochondries	34
2.1.2 Le cycle de Krebs.....	38
2.1.3 La chaîne respiratoire	40
2.2. Les mitochondries des organites dynamiques.....	43
2.2.1 La biogénèse mitochondriale	43
2.2.2 Fusion et fission mitochondriale	46
2.2.3 La dégradation des mitochondries	51
2.3. Les mitochondries et leurs implications dans différents systèmes cellulaires primordiaux.....	61
2.3.1 Les mitochondries et le métabolisme intermédiaire.....	61
2.3.2 Les mitochondries et le statut oxydant.....	68
2.3.3 Les mitochondries et le réticulum endoplasmique	72

OBJECTIFS DE LA THESE.....79

RESULTATS

PARTIE 1 Une déficience en méthionine impacte le statut oxydant, l'intégrité mitochondriale et la mitophagie dans le foie de truite arc-ciel.....	82
PARTIE 2 Alimentation précoce de la truite arc-en-ciel avec un régime déficient en méthionine pendant deux semaines : conséquences sur les mitochondries dans le foie des juvéniles.....	97
PARTIE 3 L'inhibition de l'autophagie avec la bafilomycine A1 affecte l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire	136

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

PARTIE 1: EFFETS A COURT ET LONG TERMES D'UNE DEFICIENCE EN METHIONINE SUR LES MITOCHONDRIES DANS LE FOIE DE TRUITE ARC-EN-CIEL

1.1. Effet à court terme d'une déficience en méthionine sur les mitochondries.....	148
1.1.1 Causes potentielles de l'altération de l'intégrité mitochondriale en situation de déficience en méthionine	148

1.1.2	Perturbations mitochondriales et conséquences sur différents systèmes cellulaires primordiaux.....	154
1.2.	Effet d'une déficience en méthionine au premier repas sur les mitochondries des juvéniles	160
1.2.1	Carence en méthionine et méthylation de l'ADN	160
1.2.2	Carence en méthionine et méthylation des histones	162
1.2.3	D'autres acides aminés peuvent-ils jouer un rôle dans la programmation nutritionnelle ?	163

PARTIE 2 : AUTOPHAGIE, STRESS DU RE ET METABOLISME INTERMEDIAIRE

2.1.	Spécificité de l'effet de l'inhibition de l'autophagie sur l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire.....	164
2.2.	Comment une inhibition de l'autophagie peut impacter le niveau des ARNm des gènes du métabolisme intermédiaire	165
2.2.1.	Le rôle des acides aminés	165
2.2.2.	Le rôle du stress du réticulum endoplasmique	166
2.2.3.	Le rôle des mitochondries.....	167

CONCLUSIONS	170
-------------------	-----

BIBLIOGRAPHIE.....	172
--------------------	-----

ANNEXES	194
---------------	-----

LISTE DES FIGURES & TABLEAUX

FIGURES

Figure 1 : Utilisation et consommation apparente de poisson dans le monde	2
Figure 2 : Production halieutique et aquacole mondiale	2
Figure 3 : métabolisme de la méthionine	8
Figure 4 : Les acides aminés activent la voie mTORC1	10
Figure 5 : Rôle de SAMTOR dans la régulation de la voie mTORC1	12
Figure 6 : Déficit en acides aminé et voie de signalisation GCN2-eIF2 α	15
Figure 7 : Oxydation de la méthionine	19
Figure 8 : Oxydation du glutathion	21
Figure 9 : Méthylation de l'ADN	27
Figure 10 : Les différentes étapes de la programmation nutritionnelle	31
Figure 11 : Structure des mitochondries	35
Figure 32 : Structure de la membrane interne mitochondriale	37
Figure 13 : Représentation schématique des 8 étapes du cycle de Krebs	39
Figure 14 : Système des oxydations phosphorylante (OXPHOS)	41
Figure 15 : Représentation schématique de la biogénèse mitochondriale	45
Figure 16 : Adaptation de la morphologie des mitochondries suivant les conditions environnementales et la demande énergétique	47
Figure 17 : Représentation schématique de la fusion et de la fission	

Mitochondriale	49
Figure 18 : Illustration des différentes formes d'autophagie: la macroautophagie, l'autophagie médiée par les chaperones (CMA) et la microautophagie (y compris la microautophagie endosomale)	53
Figure 19 : Représentation schématique de la macroautophagie	53
Figure 20 : Représentation schématique des différentes étapes d'initiation, de nucléation et d'élongation des autophagosomes	55
Figure 21 : dégradation des mitochondries par mitophagie	58
Figure 22 : Représentation schématique de la relation entre les mitochondries et le métabolisme glucidique	63
Figure 23 : Relation entre la β -oxydation et cycle de krebs	65
Figure 24 : Lipogenèse et cycle de Krebs	67
Figure 25 : système antioxydant mitochondrial	71
Figure 26 : Les différentes voies de signalisation impliquées dans le stress du RE	76
Figure 27 : Quantité de glutathion dans le foie des truites arc-en-ciel	150
Figure 28 : Les différents modèles proposés pour expliquer comment une déficience en méthionine peut impacter l'intégrité mitochondriale	153
Figure 29 : Conséquence d'une déficience en méthionine sur le métabolisme du glucose	156
Figure 30 : Représentation schématique de l'impact d'un dysfonctionnement mitochondrial sur le statut oxydant, le métabolisme du glucose et le stress du RE	158
Figure 31 : Effet direct ou programmé d'une déficience en méthionine sur l'abondance relative de Bnip3a dans le foie de truite arc-en-ciel	161
Figure 32 : Représentation schématique des conséquences d'une inhibition de l'autophagie avec de la bafilomycine A1 sur l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire dans des hépatocytes de truite arc-en-ciel à jeun	169
TABLEAU	
Tableau 1 : Méthylation des histones sur leurs résidus lysine	29

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Développement de l'aquaculture	1
Stratégie pour une aquaculture durable : Trouver un substitut aux farines de poisson- l'importance de l'apport en méthionine	3
La truite arc-en-ciel : une espèce importante pour l'aquaculture et un modèle en nutrition	4
A°) La truite arc-en-ciel : une des espèces phares en aquaculture.....	4
B°) La truite arc-en-ciel : un modèle en nutrition en tant qu'espèce carnivore	5
Objectif général de la thèse	6

INTRODUCTION

Développement de l'aquaculture

Depuis les années 50, la demande mondiale de poisson n'a cessé d'augmenter, passant de 20 millions de tonnes en 1950 à 171 millions de tonnes en 2016 (Figure 1) (FAO, 2018). Cette augmentation exponentielle est due à la fois à l'accroissement démographique mondiale, mais également à une augmentation de la consommation de poissons par habitant (tous pays confondus, Figure 1). En 1961, 9 kg de poissons étaient consommés par habitant. Au fil du temps, cette consommation a augmenté, jusqu'à atteindre 20,2 kg/hab en 2015. Ainsi, entre 1961 et 2016, l'augmentation annuelle moyenne de la consommation mondiale de poisson destiné à l'alimentation était telle (3,2%) qu'elle a distancé l'accroissement démographique et également celle de la viande, tous animaux terrestres confondus (2,8 %) (FAO, 2018).

Jusqu'en 1980, la production halieutique était suffisante pour répondre à la demande. Toutefois, les ressources halieutiques n'étant pas illimitées, l'aquaculture a été un levier important pour permettre à la production mondiale de poisson d'atteindre un tel rendement (Figure 2). L'aquaculture fournit désormais la moitié du poisson destiné à la consommation humaine, et devrait dépasser la production halieutique dans les années qui viennent. Néanmoins, l'expansion de l'aquaculture se heurte à de nombreux problèmes et notamment l'utilisation dans les aliments aquacoles de matières premières à base de farine et d'huile de poisson dépendants de la pêche minière.

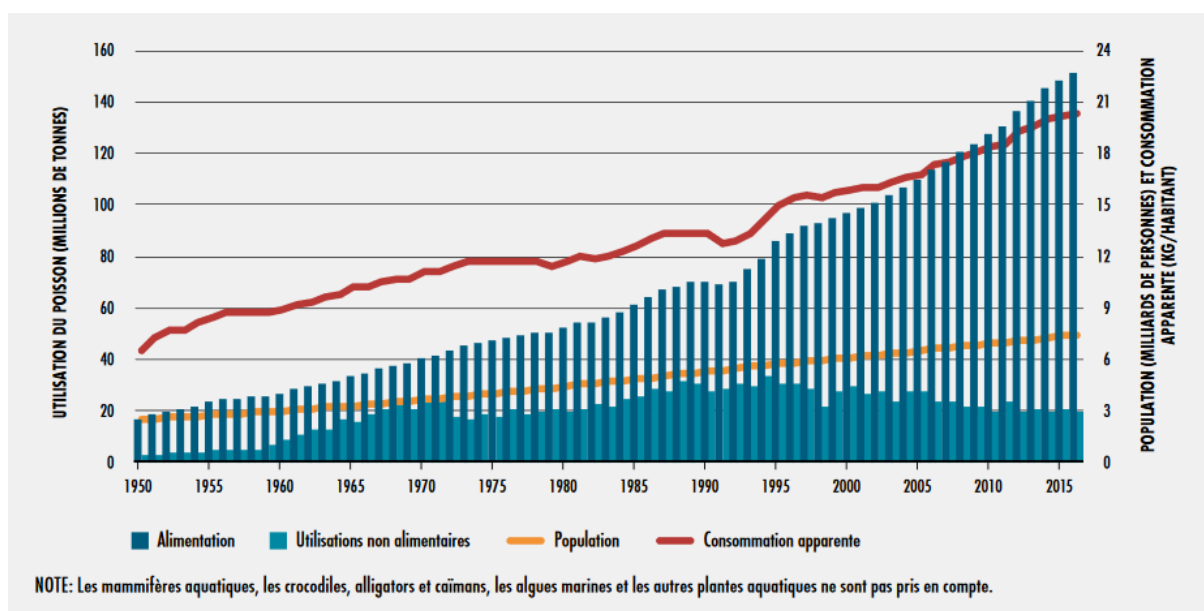


Figure 1 : Utilisation et consommation apparente de poisson dans le monde. Source FAO 2018

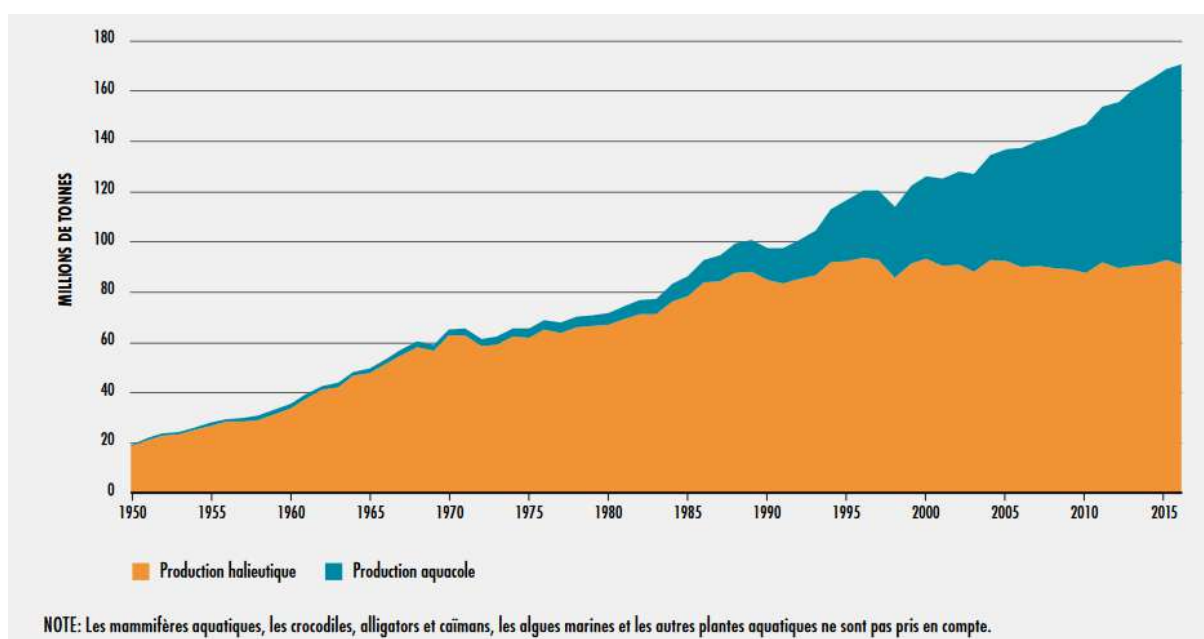


Figure 2 : Production halieutique et aquacole mondiale. Source FAO 2018

Stratégie pour une aquaculture durable : Trouver un substitut aux farines de poisson- l'importance de l'apport en méthionine

La farine et l'huile de poisson issus de la pêche minotière, sont considérées comme les ingrédients les plus nutritifs et digestibles des aliments destinés aux poissons d'élevage. Toutefois, ces matières premières, de plus en plus demandées, présentent de nombreux désavantages tant sur le plan écologique qu'économique. En effet, les poissons pélagiques utilisés pour la fabrication de ces matières premières, sont tributaires des effets combinés de la pression de pêche et des perturbations environnementales. Actuellement, les stocks de petits pélagiques utilisés pour la fabrication d'aliments aquacoles, sont considérés comme pleinement exploités. La production de la farine et d'huile de poisson a donc atteint un plafond et ces matières premières deviennent de plus en plus onéreuses (Tacon and Metian, 2008). Un des enjeux pour le développement de l'aquaculture durable est donc de trouver un substitut, économiquement rentable, en mesure de répondre aux besoins nutritifs des poissons tout en impactant au minimum l'environnement et garantissant un produit de qualité.

Ces dernières années, la majorité des recherches se sont donc concentrées sur le remplacement des farines et huiles de poisson par des matières premières à base de végétaux telles que les graines oléagineuses (Gatlin et al., 2007). Ces recherches ont permis de réduire l'apport de farines ou d'huile de poisson dans les aliments piscicoles, en les substituant par des mélanges de sources protéiques et lipidiques d'origine végétale (Corraze and Kaushik, 2009; Kaushik, 2014; Kaushik et al., 2008; Médale and Kaushik, 2009). Ainsi, le pourcentage de farines de poisson dans les aliments destinés au saumon est passé de 65% en 1990 à seulement 24% en 2013 (FAO, 2018). Cependant, le remplacement total de la farine de poisson dans les aliments aquacoles par des matières premières végétales se heurte à un certain nombre d'obstacles. En effet, moins adaptées aux besoins des poissons, elles n'ont pas les mêmes valeurs nutritionnelles et la même appétence que la farine de poisson. Outre le fait que les farines végétales soient pauvres en protéines (au maximum 48 à 55% de protéine contre 65 à 72% pour les farines de poisson), l'un des principaux obstacles rencontrés est leur composition en acides aminés. En effet, la farine de poisson permet d'apporter les 10 acides aminés essentiels utilisés par les poissons (Cho and Kaushik, 1990), tandis que les végétaux présentent un profil carencé par un ou plusieurs acides aminés essentiels et notamment la méthionine (Medale et al., 2013). Ainsi pour pallier aux carences nutritionnelles induites par

une alimentation riche en matières végétales, des acides aminés de synthèses sous forme cristalline, tels que la méthionine et la lysine, sont ajoutés dans les aliment aquacoles (Rodehutsord et al., 1997).

La méthionine, est le premier acide aminé limitant dans la majorité des aliments aquacoles. Plusieurs études, ont démontré l'importance de supplémenter les aliments à base de végétaux avec de la méthionine de synthèse, afin d'optimiser la valeur nutritionnelle de ces aliments et ainsi permettre une croissance optimale des poissons (Elmada et al., 2016; Jackson and Capper, 1982a; Mambrini et al., 1999; Sveier et al., 2001; Wang et al., 2016) . Toutefois, un certain nombres d'études ont également montré qu'un excès de méthionine peut au contraire affecter les performances de croissance des poissons ainsi que leur physiologie (Jackson and Capper, 1982; Mambrini et al., 1999; Rumsey et al., 1983; Skiba-Cassy et al., 2016; Sveier et al., 2001). Or, les besoins en méthionine peuvent différer entre espèces, stades de développement, ou conditions physiologiques ou physiopathologiques. Il est donc essentiel d'adapter les apports en méthionine à chaque situation, ce qui nécessite une meilleure compréhension de son rôle physiologique.

La truite arc-en-ciel: une espèce importante pour l'aquaculture et un modèle en nutrition

A°) La truite arc-en-ciel : une des espèces phares en aquaculture

La truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* fait partie de la famille des salmonidés. Originaire de l'ouest de l'Amérique du Nord, son aire de répartition s'étendait à l'origine de l'Alaska au Mexique. C'est à partir de 1874, qu'elle a commencé à être introduite dans les eaux de tous les continents (excepté en Antarctique) à des fins de pêche récréative et pour la production aquacole. Mais c'est seulement en 1950, avec l'apparition des aliments sous formes de granulés, que la production de truite a pu se développer (Hardy et al., 2002). La truite arc-en-ciel présente de nombreuses caractéristiques qui en font un excellent candidat pour l'aquaculture. Premièrement, les femelles peuvent produire une grande quantité d'œufs et leur période de frai peut être modifiée (par sélection ou par ajustement de la photopériode), permettant ainsi d'avoir des œufs disponibles toute l'année (Hardy et al., 2002). Deuxièmement, les alevins sont de grandes tailles et peuvent être alimentés dès le premier repas avec des granulés adaptés à la taille de leurs bouches (Hardy et al., 2002).

Troisièmement, les truites arc-en-ciel présentent une croissance rapide. Elles atteignent une taille commercialisable en seulement 9 mois. Enfin, elles ont une plasticité phénotypique importante. En effet, ces poissons tolèrent de larges gammes de paramètres environnementaux. Elles sont notamment capables de résister à des températures allant de 0°C à 27°C, permettant ainsi de les élever dans de nombreuses régions tempérées. Actuellement, en France, la truite arc-en-ciel est le poisson le plus produit en pisciculture (36500 tonnes en 2015, Source FishStatJ, version 3.03.2) et c'est également, avec le saumon l'espèce la plus vendue (70% du tonnage vendue).

B°) La truite arc-en-ciel : un modèle en nutrition en tant qu'espèce carnivore

La truite arc-en-ciel fait partie des rares espèces carnivores stricts étudiés (Panserat et al., 2013). En milieu naturel, la truite arc-en-ciel occupe un haut niveau trophique. Elle se nourrit exclusivement de mollusques, d'insectes et de petits poissons pélagiques. Ainsi, ses besoins en protéines (entre 36 à 38% dans l'aliment) et en lipides (25% environ), sont très élevés. En revanche, alors que le glucose est une source importante d'énergie chez les mammifères, il est une source relativement mineure chez la truite (Panserat et al., 2013). Elle utilise préférentiellement les acides aminés comme substrat pour la production d'énergie. Ceci s'explique par le fait que chez cette espèce, le catabolisme des acides aminés est peu coûteux en énergie. En effet, chez les poissons, l'ammoniaque qui est le produit final de la dégradation des acides aminés, peut être facilement excrété par les branchies, la peau et les urines, sans dépense d'énergie. Tandis que chez les vertébrés terrestres, l'élimination de l'ammoniaque nécessite au préalable sa transformation en urée (chez les mammifères) ou en acide urique (chez les oiseaux et reptiles) et demande donc plus d'énergie. De plus, outre leur rôle dans la production d'énergie, les acides aminés sont également utilisés pour synthétiser des lipides et du glucose. Ainsi, la truite arc-en-ciel s'avère être un modèle pertinent et original pour l'étude du contrôle du métabolisme dans son ensemble et plus particulièrement celui du métabolisme des acides aminés.

Objectif général de la thèse

Une meilleure compréhension du rôle de la méthionine chez les poissons d'élevage est essentielle afin de développer des régimes alimentaires adaptés aux contraintes de croissance, environnementale et économique, mais également pour identifier de nouveaux biomarqueurs qui pourraient être utiles pour la sélection génétique des poissons ou pour développer de nouvelles stratégies alimentaires.

Dans ce contexte, nous cherchons à mieux comprendre les conséquences directes d'une déficience en méthionine alimentaire sur le métabolisme de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Puis nous étudierons les effets de deux semaines de carence en méthionine au premier repas des alevins sur leur métabolisme.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE 1 : LES DIFFERENTS RÔLES DE LA METHIONINE

1.1. Contrôle des voies de signalisation	9
1.1.1 La voie mTORC1.....	9
1.1.2 Les effecteurs de mTORC1 : S6K1 et 4EBP1	13
1.1.3 La voie GCN2-eIF2α	13
1.1.4 Déficience en méthionine et signalisation cellulaire chez les poissons	16
1.2. Rôle antioxydant.....	17
1.2.1 La méthionine : composé essentiel pour la défense de l'hôte contre le stress oxydant	18
1.2.2 Le rôle antioxydant des métabolites de la méthionine issus de la voie de transsulfuration	20
1.2.3 Impact d'une déficience en méthionine sur le statut oxydant des poissons	22
1.3. Donneur de groupement méthyl.....	24
1.3.1 Méthylation de l'ADN et des histones	25
1.3.2 Epigénétique et programmation nutritionnelle	30
1.3.3 Conséquences d'une déficience en méthionine sur la programmation nutritionnelle et l'épigénétique chez le poisson	32

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE 1: LES DIFFERENTS ROLES DE LA METHIONINE

L'optimisation de l'apport en méthionine dans les aliments aquacoles requiert la prise en compte des différents rôles de cet acide aminé et de ses métabolites, qui sont connus pour influencer significativement le métabolisme. En effet, outre son rôle d'élément constitutif des protéines, la méthionine intervient dans de nombreuses voies cellulaires telles que la voie de transsulfuration, la voie de transméthylation ou encore la voie de reméthylation (Figure 3), et permet la synthèse de nombreuses molécules.

Brièvement, au cours de la première réaction de la voie de transméthylation, la méthionine adénosyltransférase (MAT) catalyse la conversion de la méthionine en donneur universel de groupement méthyl nommé S-adénosylméthionine (SAM, Figure 3). La SAM est par la suite déméthylée grâce à la méthyl transférase (MT) et forme la S-adenosylhomocystéine (SAH). La SAH, est ensuite convertie en homocystéine grâce la SAH-hydrolase (SAHH). L'homocystéine est une molécule intermédiaire entre les voies de transsulfuration et de reméthylation, étant donné qu'elle peut être soit re-méthylée en méthionine soit être trans-sulfurée en cystathionine qui *in fine* peut donner de la cystéine (Figure 3). La cystéine est un acide aminé semi-essentiel qui peut être utilisé soit pour la synthèse protéique soit pour la synthèse de deux puissants antioxydants : le glutathion et la taurine (Figure 3). Ainsi, à travers ces voies, la méthionine est un important précurseur pour de nombreuses molécules. Il n'est donc pas surprenant qu'elle puisse être impliquée, directement ou indirectement (via ses métabolites), dans le contrôle de nombreuses fonctions cellulaires et tissulaires. En ce sens, de nombreuses études ont démontré que la méthionine et ses métabolites intervenaient dans le contrôle de certaines voies de signalisation cellulaire, du statut oxydant ou dans les réactions de méthylation.

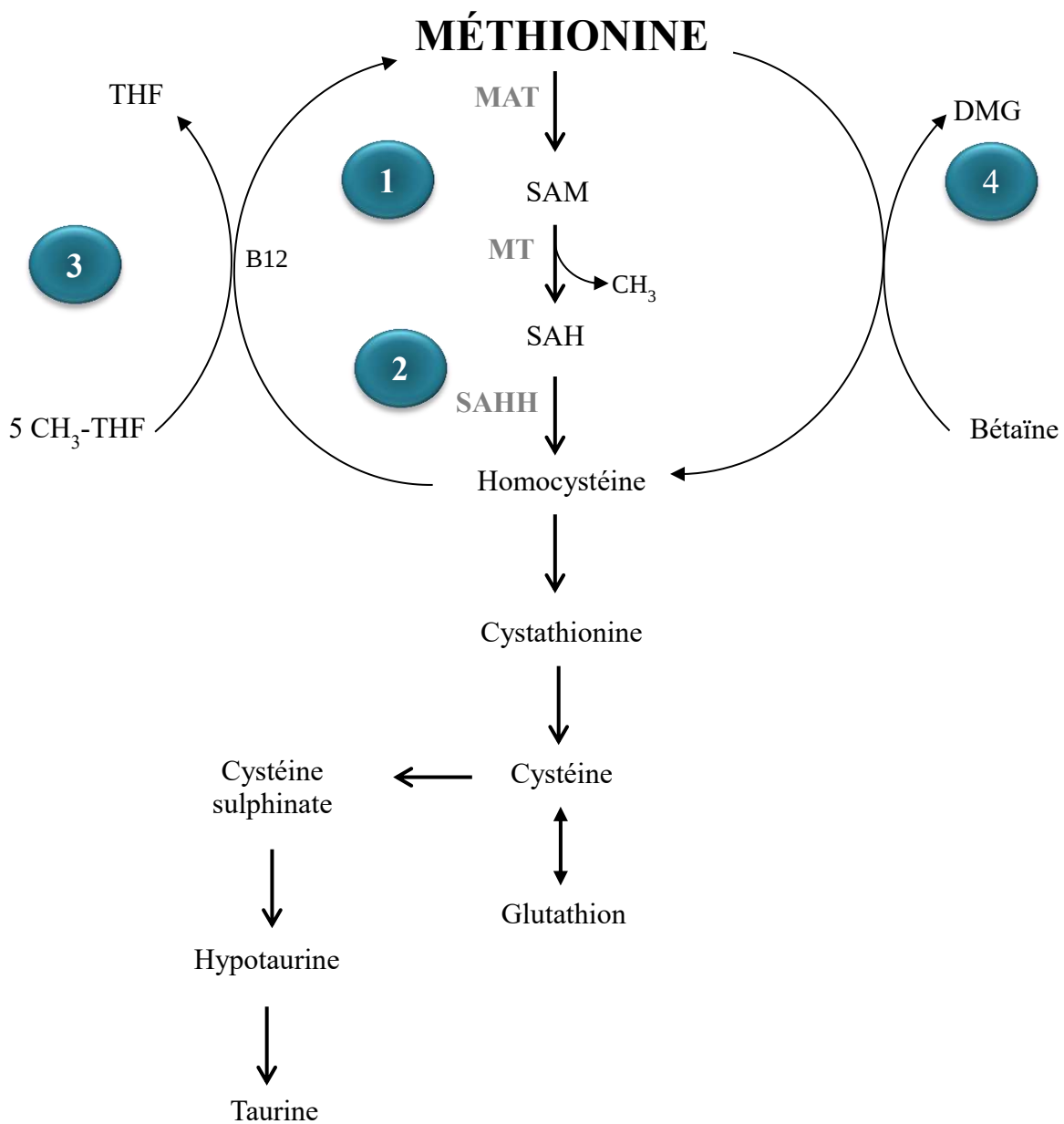


Figure 3 : métabolisme de la méthionine. (1) transméthylation, (2) transsulfuration, (3) reméthylation via les folates, (4) reméthylation indépendant des folates ; B12, vitamine B12 ; DMG, diméthylglycine ; MAT, méthionine adénosyltransférase ; MT, méthyl transférase ; SAHH, SAH-hydrolase ; SAH, S-adénosylhomocystéine ; SAM, S-adénosylméthionine ; THF, tétrahydrofolate ; 5 CH₃-THF, 5-méthyltétrahydrofolate

Au cours de ce chapitre nous détaillerons les différents rôles de la méthionine et présenterons les données disponibles concernant l'impact d'une déficience en méthionine chez les poissons.

1.1. Contrôle des voies de signalisation

Ces 20 dernières années, de nombreuses études ont démontré que les acides aminés agissaient comme régulateurs de plusieurs voies métaboliques, notamment les voies de signalisation mTORC1 et GCN2-eIF2 α , connues pour jouer un rôle clé dans la synthèse protéique (Jewell et al., 2013; Lansard et al., 2010; Meijer and Dubbelhuis, 2004; Métayer et al., 2008; Métayer-Coustard et al., 2010; Prod'homme et al., 2004). En effet, il a été démontré qu'en présence d'acides aminés en quantité suffisante, le processus d'initiation de la traduction des ARNm en protéines était activé notamment par la voie mTORC1. En revanche, en situation de carence en acides aminés, la voie GCN2-eIF2 α , permet d'inhiber la synthèse protéique et de stimuler les voies d'adaptation au stress de la cellule. Dans cette partie nous allons nous intéresser au rôle des acides aminés dans le contrôle de ces voies de signalisation en faisant un focus sur le rôle de la méthionine (en particulier chez les poissons).

1.1.1 La voie mTORC1

La protéine kinase mTOR (mammalian target of rapamycin ou mechanistic target of rapamycin) est une serine / thréonine kinase que l'on retrouve chez tous les eucaryotes. Elle fait partie de deux complexes multiprotéiques, mTORC1 et mTORC2, qui diffèrent par leurs constituants protéiques, leurs fonctions, leur régulation et leur sensibilité à la rapamycine (Jhanwar-Uniyal et al., 2015). Le complexe mTORC1 est le seul des deux complexes sensible à la disponibilité en nutriments (Jhanwar-Uniyal et al., 2015). Il est composé de la protéine RAPTOR (Regulatory-associated protein of mTOR), qui aide à la reconnaissance du substrat, des protéines Pras 40 (Proline-rich AKT substrate 40 KDa) et DEPTOR (DEP-domain-containing mTOR-interacting protein), qui sont toutes deux des régulateurs négatifs de mTORC1, et enfin de mLST8 (mammalian Lethal with Sec 13 protein 8) qui régule positivement le complexe mTORC1 (Jewell et al., 2013). mTORC1 joue de nombreux rôles au niveau cellulaire, notamment, au niveau du métabolisme, de la croissance, du catabolisme (via l'autophagie), de la prolifération cellulaire, de la synthèse protéique ou encore de la transcription (Métayer et al., 2008).

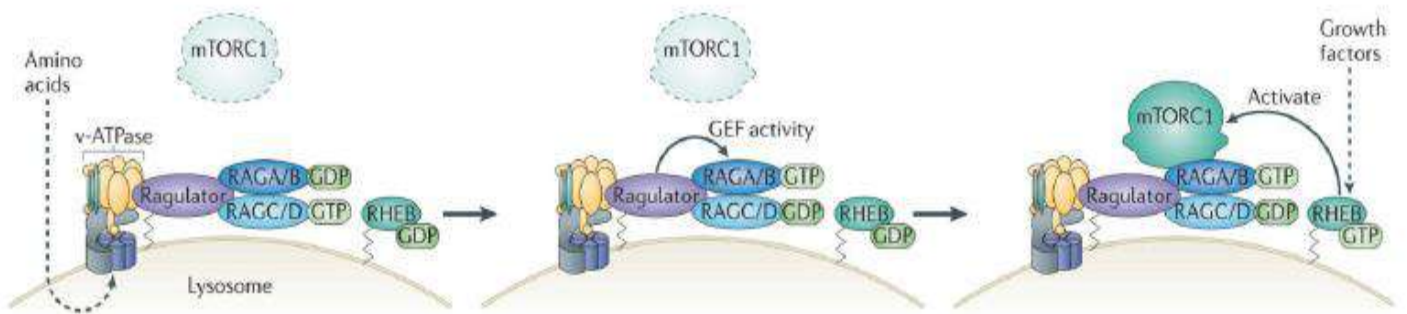


Figure 4 : Les acides aminés activent la voie mTORC1 (adapté de Jewell et al., 2014). En situation de carence en acides aminés, mTORC1 est sous forme inactive dans le cytosol. La présence d'acides aminés active la pompe v-ATPase (vacuolar H(+)-adenosine triphosphatase ATPase) et interagit avec la protéine ragulator qui va permettre l'activation du complexe RAGA/B-GTP-RAGC/D-GDP et ainsi le recrutement de mTORC1

De nombreuses recherches ont démontré le rôle important des acides aminés dans le contrôle de l'activation de mTORC1, et les mécanismes sous-jacents sont aujourd'hui bien caractérisés (Figure 4). Brièvement, en présence d'acides aminés, une pompe à proton lysosomale v-ATPase (vacuolar H⁽⁺⁾-adenosine triphosphatase ATPase) va interagir avec une protéine appelée RAGULATOR. Cette protéine permet l'ancrage d'un hétérodimère formé des GTPases RAG (RAG A/B-RAG C/D) au niveau de la membrane lysosomale. En plus d'être responsable de l'ancrage de cet hétérodimère, RAGULATOR va permettre son activation grâce à une activité GEF (guanine nucleotide exchange factors) capable d'échanger une molécule de GDP avec une molécule de GTP au niveau de RAG A/B. Une fois activé, le complexe RAG A/B-GTP-RagC/D-GDP recrute le complexe mTORC1 sur la membrane lysosomale où se trouve son coactivateur Rheb (Jewell et al., 2013; Kim and Kim, 2016; Rabanal-Ruiz and Korolchuk, 2018) (Figure 4).

Cependant, il ne s'agit là que du mécanisme général de l'activation par les acides aminés du complexe mTORC1, et il est aujourd'hui clairement établi que de nombreux autres acteurs sont impliqués dans cette activation. Parmi ces acteurs, se trouvent notamment des protéines qui reconnaissent spécifiquement certains acides aminés (Shimobayashi and Hall, 2016) comme la leucine ou l'arginine (Chantranupong et al., 2016; Jewell et al., 2015; Wang et al., 2015; Wolfson et al., 2016), permettant ainsi au complexe mTORC1 de s'adapter précisément aux modulations de la concentration en certains acides aminés dans la cellule. En ce sens, récemment, Gu et al., (2017) se sont intéressés au rôle de la méthionine sur le contrôle de l'activité de mTORC1. Ils ont ainsi identifié une nouvelle protéine nommée SAMTOR (S-adenosylmethionine sensor upstream of mTORC1), présente chez les vertébrés et certains invertébrés. Cette protéine a la capacité d'inhiber la signalisation de mTORC1 en s'associant avec GATOR1, une protéine activatrice de GTPases (GAP) des RAG A/B (Figure 5). Ils ont ainsi découvert qu'en quantité suffisante dans les cellules HEK-293T, la SAM (un des métabolites de la méthionine, Figure 3) inhibait l'interaction SAMTOR-GATOR1 en se liant directement à SAMTOR et activait ainsi le complexe mTORC1 (Figure 5). Ils ont également démontré qu'en situation de carence en méthionine, la faible quantité de SAM entraînait une inhibition de la signalisation de mTORC1 via SAMTOR-GATOR1. SAMTOR joue donc le rôle de capteur de SAM, reliant ainsi le métabolisme de la méthionine à la régulation de mTORC1 (Gu et al., 2017).

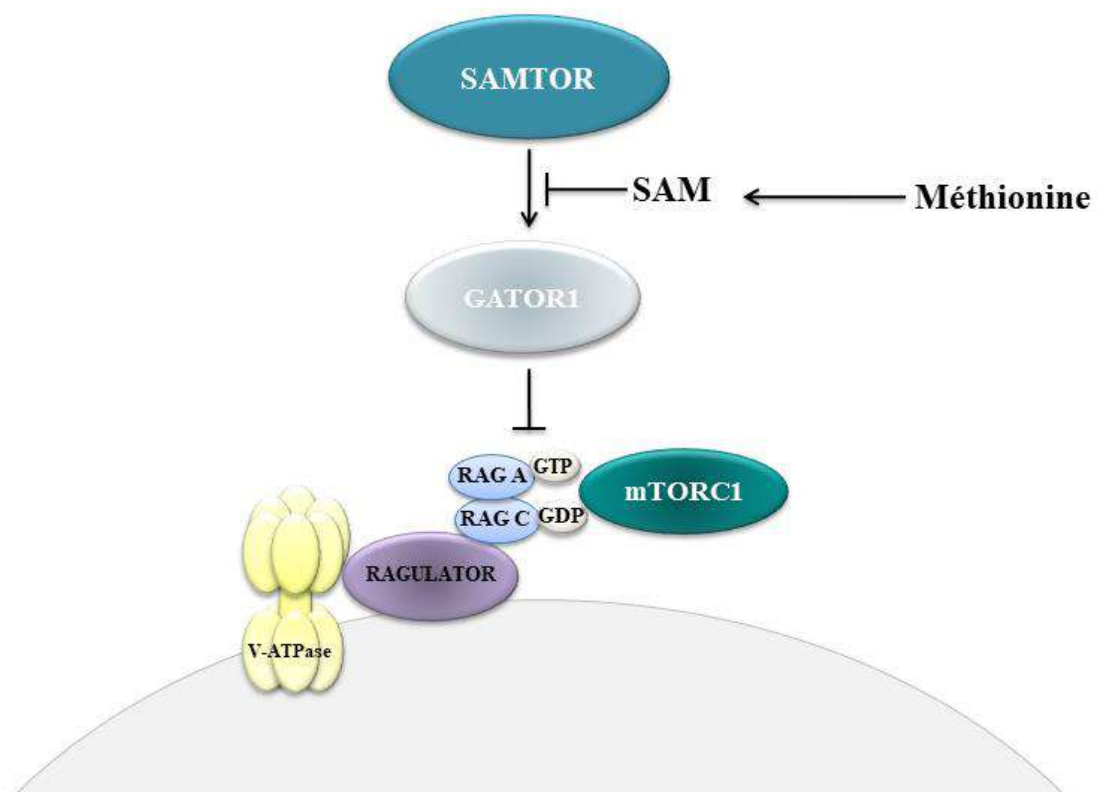


Figure 5 : Rôle de SAMTOR dans la régulation de la voie mTORC1. S-adenosylméthionine inhibe l'interaction entre SAMTOR et GATOR1 Permettant ainsi l'activation de mTORC1

1.1.2 Les effecteurs de mTORC1 : S6K1 et 4EBP1

Une fois activé, mTORC1 va induire la traduction des ARN messagers (ARNm) en protéines en phosphorylant deux principales cibles : 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1) et S6K1 (S6 kinase 1). Ces deux protéines sont impliquées dans l'étape d'initiation de la traduction des ARNm. Le niveau de phosphorylation de ces deux protéines est considéré comme un bon indicateur de l'activité de mTORC1.

Au cours de la première étape de la traduction, le facteur d'initiation de la traduction eIF4E (eucaryotic translation initiation factor 4E) se lie à l'extrémité 5' des ARNm, permettant le recrutement des ribosomes via d'autres facteurs tels que eIF4G, eIF3 ou encore eIF4A (Gingras et al., 1999). 4E-BP1 est un inhibiteur compétitif, capable de se lier à eIF4E, empêchant ainsi la liaison eIF4E-eIF4G et donc la traduction. Lorsque mTORC1 est activé, il permet la phosphorylation de 4EBP-1, ce qui a pour conséquence de bloquer sa liaison avec eIF4E. Une fois libéré, eIF4E peut se lier à eIF4G et former le complexe eIF4F (formé de eIF4A, eIF4G et eIF4E), permettant ainsi l'induction de la traduction (Ma and Blenis, 2009).

S6K1 est une sérine thréonine kinase, qui est essentielle pour la phosphorylation de la protéine S6 de la sous unité 40S du ribosome et d'autres substrats impliqués dans la synthèse protéique tel que eEF2K (eukaryotic translation elongation factor 2 kinase). Afin d'être activée, S6K1 doit changer de conformation. Pour cela elle subit de nombreuses phosphorylations au niveau de ses résidus sérines et thréonines. Au total, on ne compte pas moins de 12 sites de phosphorylation sur S6K1. Ce changement de conformation permet à mTORC1 de phosphoryler la protéine S6K1 en thréonine 389. Cette étape est une des étapes critiques pour l'activation de la fonction kinase de S6K1 (Saitoh et al., 2002). Une fois activée, S6K1 va donc activer la protéine ribosomale S6 par phosphorylation, qui à son tour va participer à la traduction des ARNm TOP (Tract Of Pyrimidine), qui codent entre autre pour des facteurs d'élongation mais également pour des protéines ribosomales (Jefferies et al., 1997).

1.1.3 La voie GCN2-eIF2 α

La protéine GCN2 (general control nonderepressible 2) est une serine thréonine kinase conservée au cours de l'évolution qui est capable de détecter spécifiquement un déficit en acides aminés et d'augmenter son activité en conséquence. En effet, GCN2 est une protéine possédant un domaine homologue à l'histidyl-tRNA synthase, lui permettant de se fixer aux ARN de transfert non chargés, dont la quantité augmente en situation de carence en acide aminé. Suite à cette liaison, GCN2 subit un changement de conformation permissif conduisant

à son auto-activation (Dong et al., 2000). Une fois activée, GCN2 va phosphoryler la sous unité α du facteur d'initiation de la traduction eIF2 (eukaryotic initiation factor 2) au niveau de la serine 51 (Figure 6). Cette phosphorylation, va entraîner une inhibition de la formation du complexe d'initiation à la traduction, induisant une forte diminution de la traduction. Cependant, paradoxalement, la traduction de certains ARNm spécifiques tels que le facteur de transcription ATF4 (activating transcription factor 4) va augmenter (Figure 6). Ceci est possible grâce à la présence de deux uORFs (Upstream Open Reading Frame) au niveau de la région 5'UTR de l'ARNm de ATF4. L'induction de la synthèse du facteur de transcription ATF4 permet la transcription de certains gènes cibles possédant au niveau de leur promoteur des éléments de réponse aux acides aminés (amino acid response element ou AARE) afin de promouvoir la survie cellulaire (Bruhat et al., 2000; Harding et al., 2003; Kilberg et al., 2009; Lu et al., 2004) (Figure 6). Parmi les gènes surexprimés en situation de carence en acides aminés, on retrouve notamment les gènes codant pour des protéines impliquées dans la biosynthèse et le transport des acides aminés, la dégradation des protéines (tels que certains gènes impliqués dans l'autophagie) mais également certains facteurs de transcription tels que chop (connu aussi sous le nom de ddit3 pour DNA Damage Inducible Transcript 3).

De récentes études ont également démontré qu'en situation de carence en leucine, GCN2 participait à la régulation de l'activité de mTORC1 (Anthony et al., 2004; Xiao et al., 2011). En effet, ces deux études ont observé que la carence en leucine ne parvenait pas à inhiber mTORC1 dans les foies des souris dépourvues de la protéine GCN2 (GCN2^{-/-}) alors qu'elle était inhibée dans les foies des souris contrôles, suggérant que GCN2 intervient en amont de mTORC1. Une récente étude, a également observé des résultats similaires dans des fibroblastes embryonnaires de souris (Averous et al., 2016). Dans cette étude, les auteurs ont démontré, que GCN2 jouait effectivement un rôle dans l'inhibition de mTORC1 en situation de carence en leucine et arginine. Cependant, ils ont également démontré que l'activation de GCN2 n'était pas suffisante pour inhiber mTORC1, indiquant l'existence d'un mécanisme supplémentaire impliqué dans l'effet de la carence en leucine et arginine sur l'activation de mTORC1. Dans cette même étude ils ont également observé qu'une carence en lysine activait bien GCN2, sans pour autant affecter l'activité de mTORC1. Dans l'ensemble, ces résultats mettent en lumière la complexité de l'activation et de l'inhibition de ces différentes voies en situation de carence en acides aminés.

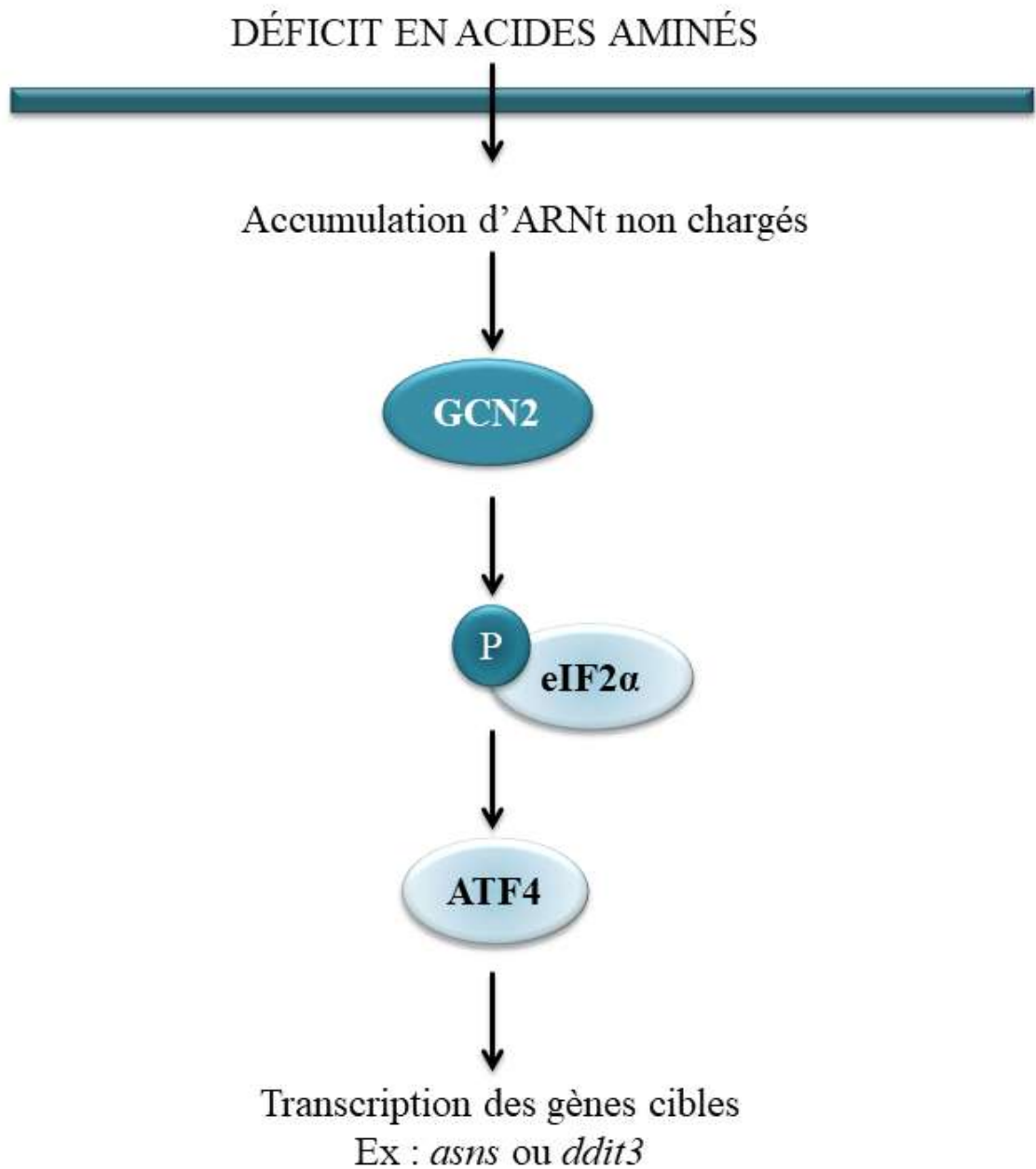


Figure 6: Déficit en acides aminé et voie de signalisation GCN2-eIF2α. GCN2, General control non-repressible; eIF2, eucaryotic initiation factor 2 ; ATF4, activating transcription factor 4

1.1.4 Déficience en méthionine et signalisation cellulaire chez les poissons

Comme chez les mammifères, il est largement admis qu'une carence alimentaire en méthionine entraîne une baisse de la croissance chez les poissons. Plusieurs études se sont donc intéressées aux mécanismes impliqués dans ces effets, et notamment au rôle de la méthionine dans la modulation des voies de signalisation mTORC1 et GCN2-eIF2 α (Belghit et al., 2014 ; Skiba-Cassy et al., 2016). Une étude récente a ainsi démontré que dans le foie de truite arc-en-ciel, une carence en méthionine (32 % de restriction en méthionine par rapport au régime contrôle) induisait la phosphorylation de eIF2 α , ainsi que l'expression de plusieurs gènes cibles de ATF4, tels que *asns* (asparagine synthase), *cat1* (cationic amino transporter 1) et *snat2* (system A amino acid transporter 2), indiquant une activation de la voie GCN2-eIF2 α (Skiba-Cassy et al., 2016). Des résultats similaires, ont été obtenus dans le foie de cobia (*Rachycentron canadum*) soumis à 39% de restriction en méthionine par rapport au régime contrôle (Wang et al., 2016). Ces résultats concordent avec les études réalisées chez des rongeurs montrant une induction des gènes cibles de ATF4 suite à une restriction en méthionine (Lees et al., 2014; Li et al., 2014; Tang et al., 2015). Une autre étude a également démontré que la quantité de méthionine dans l'aliment impactait le niveau de phosphorylation de eIF2 α dans le muscle de truite arc-ciel (Belghit et al., 2014). Toutefois, cette étude ne met en évidence qu'une différence significative entre les poissons nourris avec un régime déficient (32% de restriction en méthionine) et des poissons nourris avec un régime en excès (22,5% d'excès de méthionine par rapport au régime contrôle). La différence observée entre les études de Belghit et al., (2014) et Skiba-Cassy et al., (2016) peut être due aux tissus étudiés (muscle ou foie) et à leurs degrés de sensibilité à la carence en méthionine. Néanmoins, dans ces deux études le niveau de méthionine présent dans l'aliment a influencé l'activation de la voie GCN2-eIF2 α .

Skiba-Cassy et al., (2016) se sont également intéressés au niveau de phosphorylation de plusieurs protéines impliquées dans la voie mTORC1 (P-TOR ; P-S6K1 ; P-S6) en situation de carence en méthionine. Ils ont ainsi observé, que, le niveau de méthionine présent dans l'aliment n'avait aucun impact sur le niveau de phosphorylation de ces protéines et donc sur la voie mTORC1 dans le foie de truite arc-en-ciel. Ces données concordent avec les données obtenues *in vitro* sur des hépatocytes de truite en culture, démontrant que contrairement à la leucine, l'ajout de méthionine dans un milieu de culture dépourvu d'acides aminés n'est pas suffisante pour induire la phosphorylation de S6 (Lansard et al., 2011). Cependant, contrairement à ces études, Belghit et al., (2014) ont rapporté une induction de la phosphorylation de S6 dans les muscles de truite arc-en-ciel nourris avec un régime présentant

un excès de méthionine. Ces résultats suggèrent donc que le niveau de méthionine dans l'aliment peut modifier l'activité de la voie mTORC1 dans le muscle de truite arc-ciel et mettent à nouveau en évidence des différences de sensibilité des tissus (muscle et foie) à la teneur en méthionine dans l'aliment. Une autre étude *in vitro* réalisée sur des cultures primaires de cellules musculaires de turbot, présente des résultats similaires à ceux obtenus chez la truite (Jiang et al., 2017). En effet, dans cette étude les auteurs ont constaté que l'absence de méthionine dans le milieu de culture entraînait une diminution de la phosphorylation de S6K1, S6 et 4EBP1, indiquant une inhibition de la voie mTORC1.

Dans l'ensemble, ces données montrent qu'une déficience en méthionine peut impacter les voies de signalisation mTORC1 et GCN2-eIF2 α chez les poissons, particulièrement dans le muscle, ce qui peut en partie expliquer la baisse de croissance observée chez les poissons nourris avec un régime déficient en méthionine. Toutefois, très peu de données sont encore disponibles sur les mécanismes impliqués dans la régulation de mTORC1 et de GCN2-eIF2 α par les acides aminés chez les poissons.

1.2. Rôle antioxydant

Au cours du cycle de production, les poissons issus de l'aquaculture peuvent être soumis à différents stress biotiques (exposition aux pathogènes) ou abiotiques (mauvaise qualité de l'eau, régime alimentaire déséquilibré, hypoxie, température) pouvant entraîner la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, reactive oxygen species). Les ROS sont définis comme des espèces chimiques possédant un électron célibataire sur leur couche périphérique, ce qui leur confère un fort degré de réactivité. Leur quantité dans la cellule est continuellement régulée par l'équilibre entre leur taux de production et leur taux d'élimination par le système antioxydant des cellules. Une production de ROS modérée est essentielle pour certaine voie de signalisation participant au maintien de l'homéostasie cellulaire. En revanche, une surproduction de ROS ou un déficit au niveau des défenses antioxydantes peuvent entraîner l'oxydation de nombreuses molécules biologiques (telles que les acides aminés, les lipides, l'ADN ou encore les protéines) et impacter leur fonctionnement; on parle alors de stress oxydant. La méthionine et certains de ses métabolites, jouent un rôle d'antioxydant que nous allons développer dans cette partie. De plus, nous ferons un focus sur l'impact d'une déficience en méthionine sur le statut oxydant chez les poissons.

1.2.1 La méthionine : composé essentiel pour la défense de l'hôte contre le stress oxydant

La méthionine libre ou liée aux protéines possède un groupement thioéther, qui est une cible privilégiée de la plupart des ROS. L'oxydation de la méthionine par les ROS conduit à la formation de sulfoxyde méthionine (Met(O)). Cette modification post-traductionnelle non enzymatique des protéines possédant un résidu de méthionine oxydée peut conduire à des modulations voir à une perte de leur fonction. En effet, suivant la localisation des résidus oxydés, cela peut avoir des répercussions sur le site actif de la protéine ou sur le site de fixation du ligand entraînant une modulation de la fonction de la protéine. Cependant, les résidus de méthionine sont parfois exposés à la surface des protéines et peuvent être oxydés sans que cela ait des conséquences sur la fonction de celles-ci. Dans cette situation, l'oxydation des résidus de méthionine pourrait servir de piège à ROS. Par exemple, Levine et al., (1999) ont démontré que l'exposition de la glutamine synthétase d'*Escherichia coli* au peroxyde d'hydrogène entraînait l'oxydation de huit résidus de méthionine sur 16 et ne modifiait pas l'activité de cette enzyme. De plus, ils ont observé que les résidus oxydés étaient disposés en réseau près du site actif et permettaient de protéger les autres acides aminés sensibles à l'oxydation au niveau du site actif.

L'oxydation de la méthionine (libre ou liée aux protéines) en Met(O) conduit à la formation de deux isomères (S et R) qui sont tous deux réduits spécifiquement par deux classes d'enzyme MsrA (Méthionine sulfoxyde réductase A) et MsrB (Méthionine sulfoxyde réductase B) respectivement (Figure 7). Ainsi ces deux enzymes jouent un rôle antioxydant important en facilitant l'interconversion cyclique de la méthionine entre forme oxydée et forme réduite. En effet, il a été démontré que des bactéries et levures dépourvues du gène MsrA présentaient une sensibilité accrue au stress oxydatif ainsi qu'un taux de survie plus faible (Moskovitz et al., 2001, 1997, 1995). En revanche, les lymphocytes T humains transfectés avec la MsrA bovine et exposés à du peroxyde d'hydrogène avaient un taux de survie supérieur aux souches mères (Moskovitz et al., 1998). Ces résultats concordent avec l'étude de Moskovitz et al., (2001) qui ont démontré que des souris MsrA *-/-* exposées à de fortes doses d'O₂ (connues pour engendrer une forte production de ROS) présentaient une quantité élevée de protéines carbonylées (ou protéines oxydées) et avaient un taux de survie 10% inférieur aux souris de type sauvage.

Dans l'ensemble ces données démontrent l'importance de la méthionine comme agent antioxydant, capable de piéger les ROS. Cependant, outre le fait que la méthionine puisse agir

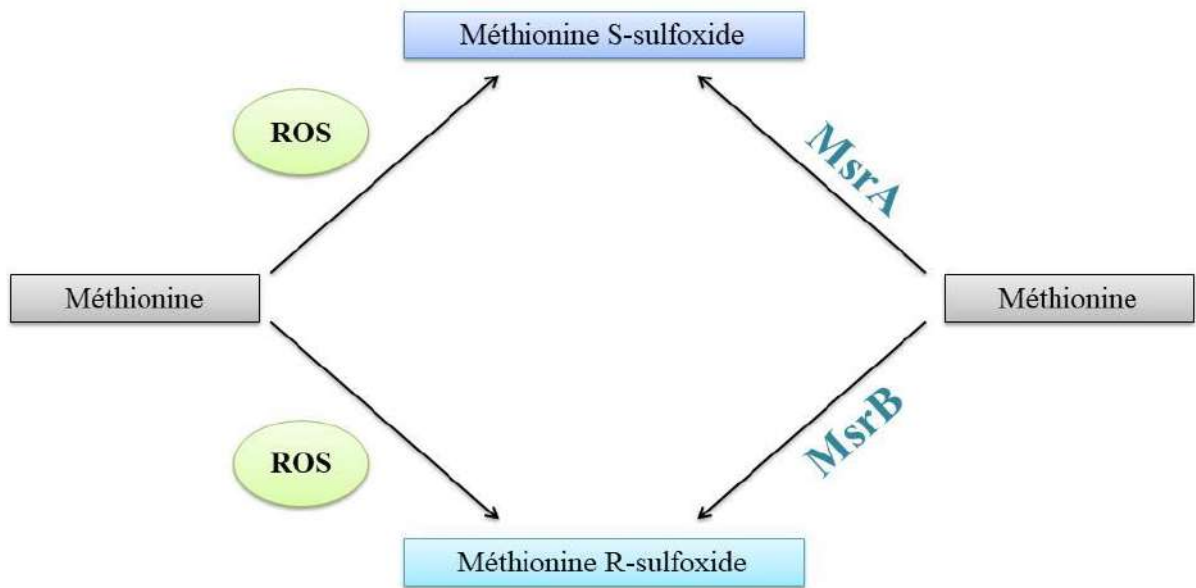


Figure 7: Oxydation de la méthionine. MsrA, méthionine sulfoxyde réductase A ; MsrB, méthionine sulfoxyde réductase B ; ROS, reactive oxygen species

directement sur les ROS, elle permet également la synthèse de deux autres facteurs antioxydants (le glutathion et la taurine) via la voie de transsulfuration (Figure 3).

1.2.2 Le rôle antioxydant des métabolites de la méthionine issus de la voie de transsulfuration

En situation de stress oxydatif, l'homocystéine est préférentiellement transformée en cystéine (via la voie de transsulfuration), au détriment de la voie de reméthylation. En effet il a été démontré que la cystathionine β -synthase, qui permet la conversion de l'homocystéine en cystéine, était activée en situation de stress oxydatif, favorisant ainsi la synthèse de cystéine (Taoka et al., 1998). Cela permet à la cellule de synthétiser d'avantage de glutathion et de taurine, qui pourront, par la suite, être utilisés pour lutter contre les ROS (Banerjee and Zou, 2005).

A°) Le glutathion

Le glutathion est un tripeptide, γ -l-glutamyl-l-cysteinyl-glycine, présent dans tous les tissus des mammifères et qui est particulièrement concentré dans le foie. Le glutathion existe sous les formes thiol réduit (GSH) et disulfure oxydé (GSSG) (Kaplowitz et al., 1985). En situation de stress oxydatif, le glutathion permet de réduire les ROS (radicaux hydroxyle et peroxynitrite) grâce au glutathion peroxydase (GSH-Px). Au cours de ce processus, le GSH est oxydé en GSSG, qui a son tour est soit réduit en GSH grâce à la glutathion réductase (GSR) ou soit exporté et éliminé par les reins (Figure 8). Le GSH est la forme prédominante présente dans les cellules. Cependant en situation de stress oxydatif sévère, la capacité de la cellule à réduire le GSSG en GSH peut être insuffisante, entraînant ainsi, l'accumulation de GSSG dans la cellule. C'est pour cette raison que le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydatif (Pastore et al., 2003). Au cours des réactions catalysées par le glutathion-S-transférase (GST), le glutathion interagit également, avec des composés électrophiles ce qui aboutit à la production de sulfures de glutathions chimiquement stables, qui seront par la suite, catabolisés (Figure 8) (Pastore et al., 2003).

Le glutathion permet également de réguler la fonction de certaines protéines via un mécanisme appelé glutathionylation. Au cours de la glutathionylation, le glutathion se lie de façon réversible au groupement thiol des protéines. Plusieurs études ont démontré que la glutathionylation est impliquée dans la stabilisation des protéines extracellulaires, la

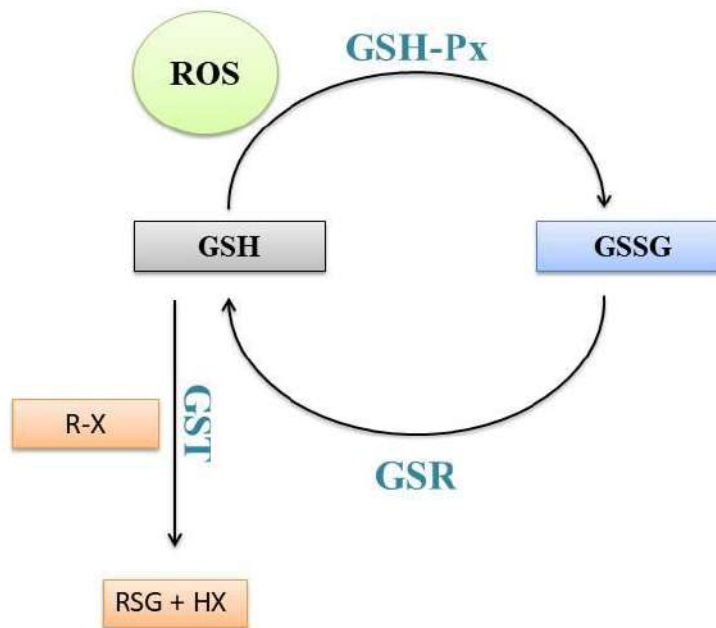


Figure 8: Oxydation du glutathion. GSH, glutathion réduit; GSH-Px, glutathion peroxydase; GSR, glutathion réductase; GSSG, glutathion oxydé; GST, glutathion-S-transférase; ROS, reactive oxygen species; RX est un composé étranger qui est conjugué avec du GSH, formant RSG.

protection des protéines contre l'oxydation (comme la carbonylation des protéines), ou encore dans la régulation enzymatique et la transcription de certains gènes (Cao et al., 2005; Cotgreave, 1998; Klatt et al., 1999; Métayer et al., 2008; Pastore et al., 2003). Ainsi la glutathionylation est un mécanisme pouvant contribuer à une modification réversible de plusieurs fonctions cellulaires et contribuerait à la protection des cellules exposées au stress oxydatif (Cotgreave, 1998; Pastore et al., 2003).

B°) La taurine

La taurine est un acide β -aminé, considéré comme un nutriment essentiel ou semi-essentiel, bien qu'il ne soit pas constitutif des protéines (Bouckennooghe et al., 2006; Gaull, 1986). La taurine joue de nombreux rôles et notamment le rôle d'antioxydant. En effet, la littérature regorge d'études démontrant que l'apport de taurine en situation de stress oxydant réduit les dommages oxydatifs, suggérant qu'elle est capable de piéger les ROS. Cependant, mis à part l'acide hypochloreux, la taurine ne semble pas pouvoir éliminer directement les ROS (Aruoma et al., 1988; Marcinkiewicz, 2010). Récemment, une étude a mis en évidence un mécanisme sous-jacent l'action de la taurine sur les ROS (Jong et al., 2012). Selon les auteurs de cette étude, l'appauvrissement en taurine dans les cardiomyocytes, entraînerait une altération du transport des électrons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, conduisant à une augmentation de la génération de superoxyde. Cet effet serait notamment lié à une diminution de la synthèse de deux sous unités du complexe I mitochondrial, la ND5 (ou NADH dehydrogenase, subunit 5) et la ND6 (ou NADH dehydrogenase, subunit 6). Ces résultats concordent avec des données antérieures démontrant le rôle important de la taurine dans le fonctionnement des ARNt mitochondriaux, responsables de la traduction spécifique des protéines de cette organelle (Kirino et al., 2004). En effet, les uridines situées au niveau de l'anticodon des ARNt^{lys} et ARNt^{leu} mitochondriaux subissent naturellement une modification post-transcriptionnelle conduisant à l'incorporation de taurine, et il est aujourd'hui clairement établi qu'un défaut de cette modification conduit à de graves altérations de la traduction des protéines mitochondriales et donc à la mise en place d'un goulot d'étranglement au niveau de la chaîne respiratoire et la formation de ROS.

1.2.3 Impact d'une déficience en méthionine sur le statut oxydant des poissons

Chez le poisson, de nombreuses études se sont intéressées aux conséquences d'une déficience en méthionine sur le statut oxydant. Elmada et al., (2016) ont ainsi démontré que 11 semaines de carence en méthionine alimentaire (37% de méthionine en moins par rapport

au régime contrôle) induit une augmentation de la quantité de malondialdéhyde (MDA) (indiquant une augmentation de la peroxydation des lipides) et de l'activité de deux enzymes antioxydantes (la superoxyde dismutase (SOD) et la GSH-Px) chez le poisson chat (*Pelteobagrus fulvidraco*). Ces résultats concordent avec l'étude de Wu et al., (2017), qui ont constaté que des carpes (*Ctenopharyngodon idella*) alimentées pendant 8 semaines avec un régime déficient en méthionine (64.5% de méthionine en moins par rapport au régime contrôle) présentaient une augmentation significative de la quantité de MDA ainsi que des protéines carbonylées dans l'intestin et l'hépatopancréas. Ils ont également observé, une modification du métabolisme du glutathion. En effet, la carence en méthionine a induit une baisse du niveau de glutathion total et de l'activité de la GSR (dans l'intestin et l'hépatopancréas) tout en augmentant, en parallèle, l'activité enzymatique de la GSH-Px (dans l'intestin) et de la GST (dans intestin et l'hépatopancréas). Dans l'ensemble, ces études démontrent qu'une déficience en méthionine augmente l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, catalase, GST, GSH-Px, GSR) et induit des dommages oxydatifs tel que la peroxydation des lipides ou la carbonylation des protéines (Cowey et al., 1992; Elmada et al., 2016; Espe et al., 2014; Feng et al., 2011; Fontagné-Dicharry et al., 2017; Li et al., 2009; Wu et al., 2017). Cependant, Espe et al., (2014) ont montré que, contrairement aux résultats présentés ci-dessus, la restriction de méthionine alimentaire (45 % de méthionine en moins que le témoin) n'affectait pas les niveaux de glutathion total dans le foie des jeunes saumons. Cela indique que les effets négatifs de la carence en méthionine sur l'état oxydatif des poissons dépendent de plusieurs facteurs, tels que le niveau de carence en méthionine par rapport aux besoins des animaux, l'espèce et les tissus étudiés, le stade de vie du poisson, la densité des poissons dans les bassins, etc.

Curieusement, chez les mammifères, plusieurs études démontrent que la restriction en méthionine alimentaire (40 à 80% de restriction en méthionine) diminue le taux de production des ROS mitochondriaux ainsi que les dommages oxydatifs associés (Caro et al., 2008, 2009; Naudí et al., 2007; Sanchez-Roman et al., 2011; Sanz et al., 2006). Par exemple il a été démontré que des rats alimentés avec un régime déficient en méthionine (40% de déficience) durant 7 semaines présentaient une baisse de la production de ROS (particulièrement au niveau du complexe I) ainsi que des dommages oxydatifs causés au niveau de l'ADN mitochondrial, des lipides et des protéines (Sanchez-Roman et al., 2011).

1.3. Donneur de groupement méthyl

Le cycle de la méthionine est essentiel à la formation de SAM via l'adénylation de la méthionine par la MAT (Figure 3) (Finkelstein, 1990). Ainsi, la quantité intracellulaire de SAM dépend, en grande partie, de la disponibilité en méthionine des aliments.

La SAM est impliquée dans de nombreuses réactions de méthylation essentielles, permettant notamment la synthèse de phosphatidylcholine, créatine et carnitine (Andersen et al., 2016). Cependant, ces dernières années, de nombreuses recherches se sont concentrées sur la capacité de la SAM à méthyler l'ADN et les histones, et ainsi à entraîner de profonds bouleversements au niveau du métabolisme et du phénotype à court et long terme. Récemment, il a ainsi été démontré que la culture de cellules HCT116 dans un milieu restreint en méthionine diminue la quantité de SAM et SAH, entraînant des changements rapides au niveau de la méthylation des histones et de la transcription des gènes (Mentch et al., 2015). Il a également été démontré qu'une restriction en méthionine alimentaire induit une augmentation de la méthylation globale de l'ADN associée à une augmentation de la quantité de SAH dans le foie de souris adultes (Mattocks et al., 2017). Ces études démontrent ainsi que le niveau de méthionine dans l'aliment (ou dans le milieu de culture) module le taux intracellulaire de SAM et affecte les processus de méthylation dont ceux de l'ADN et des histones.

La méthylation de l'ADN et des histones sont deux mécanismes intervenant dans les processus épigénétiques. L'épigénétique, correspond aux changements héréditaires de l'activité des gènes (exprimé ou réprimé), qui ne sont pas causés par des changements dans la séquence de l'ADN (Waterland, 2006). Ces modifications peuvent être réversibles, perdurer (transmission mitotique), ou même transmises de génération en génération (transmission méiotique). L'épigénome, qui représente l'ensemble des modifications épigénétiques d'une cellule, est sensible aux facteurs environnementaux et plus particulièrement en début de vie où la plasticité métabolique est importante. En effet, plusieurs facteurs environnementaux tels que la nutrition, la pollution ou l'hypoxie peuvent modifier l'épigénome durablement et ainsi entraîner des modifications persistantes au niveau de l'expression des gènes et donc du phénotype. On parle alors de programmation.

Dans les sections qui suivent, (1) nous détaillerons les mécanismes impliqués dans la méthylation de l'ADN et des histones, (2) nous aborderons le rôle de la méthionine comme potentiel acteur dans la programmation nutritionnelle et enfin (3) nous discuterons des

différents travaux disponibles sur la programmation nutritionnelle appliquée chez les poissons.

1.3.1 Méthylation de l'ADN et des histones

Chez les eucaryotes, le génome est constitué de 3 milliards de paires de bases et mesure environ 2 mètres. Ainsi, afin de faire tenir le génome dans le compartiment nucléaire qui mesure environ 10 µm de diamètre, il est indispensable qu'il soit minutieusement compacté. Pour cela, la molécule d'ADN est enroulée autour d'un octamère d'histones (H2A, H2B, H3 et H4) en une structure nommée nucléosome. Les nucléosomes, vont par la suite s'enrouler autour d'eux même de manière plus ou moins condensée afin de former la chromatine. Il existe 2 niveaux de condensation de la chromatine : l'euchromatine et l'hétérochromatine. L'euchromatine correspond à la forme décondensée de la chromatine qui est accessible aux complexes enzymatiques et permet la transcription des gènes. A l'inverse, l'hétérochromatine correspond à la forme condensée de la chromatine qui est donc inaccessible, rendant la transcription des gènes difficile. Les modifications de méthylation de l'ADN et des histones peuvent influencer le niveau de compaction de la chromatine et donc impacter l'expression des gènes.

A°) La méthylation de l'ADN

C'est en 1982 que le lien entre la méthylation de l'ADN et son état transcriptionnel inactif a été établi pour la première fois (Stein et al., 1982; Vardimon et al., 1982). Depuis, la méthylation de l'ADN a toujours été associée à la répression des gènes. Elle joue un rôle important dans de nombreuses formes de répression épigénétique stable, telles que l'empreinte parentale ou l'inactivation du chromosome X.

Chez les vertébrés, la méthylation de l'ADN est une modification post-répllicative qui se produit exclusivement au niveau du carbone 5 des résidus de cytosine (5mC) (Rottach et al., 2009). Les cytosines méthylées sont principalement situées au niveau de dinucléotides CpG (cytosine-phosphate-guanine). L'addition covalente d'un groupement méthyl sur les cytosines est catalysée par les ADN méthyltransférases (DNMT). Chez les mammifères il existe trois DNMT catalytiquement actives : DNMT1, DNMT3A et DNMT3B mais aussi une DNMT3L se trouvant exclusivement dans les cellules germinales et qui agit comme co-facteur avec les DNMT3A et B (Arand et al., 2012). Chez les mammifères, les DNMTs possèdent deux principaux domaines : un domaine N-terminale qui guide la localisation nucléaire des enzymes et permet les interactions avec d'autres protéines, l'ADN et la chromatine, et un

domaine C-terminal catalytique qui abrite le site actif de l'enzyme (Jurkowska et al., 2011). Lors de la méthylation de l'ADN, ces enzymes reconnaissent d'abord le substrat, puis la cytosine ciblée est déplacée hors de la double hélice d'ADN. L'enzyme forme alors un complexe covalent avec le carbone 6 de la cytosine, permettant ainsi le transfert de SAM sur la position C5 et la synthèse de SAH (Jurkowska et al., 2011; Rottach et al., 2009).

Le processus de méthylation de l'ADN se fait selon un mécanisme proposé par Riggs et Holliday en 1975 (Figure 9). La méthylation initiale dite « de novo » est établie par les DNMT3A et B. Après chaque cycle de réplication de l'ADN, l'ADN est alors formé d'un brin portant les marques de méthylation (brin parental) et un brin exempt de méthylation (le brin fille) on parle alors d'ADN hémiméthylé (Figure 9). Le brin fille est alors reméthylé par une méthyltransférase d'entretien, DNMT1, qui est spécifique à l'ADN hémiméthylé. Ceci évite ainsi la méthylation de sites précédemment non méthylés et préserve le modèle de méthylation par division cellulaire (Figure 9) (Jurkowska et al., 2011).

La 5mC peut également être déméthylée grâce à deux processus bien distincts (Figure 9). Le premier mécanisme dit « passif » a lieu lorsque l'activité de DNMT1 est supprimée. Il conduit à une déméthylation passive de l'ADN et entraîne la production d'ADN non méthylé au cours des mitoses successives. La déméthylation dite « active », se produit quant à elle indépendamment de la réplication de l'ADN et nécessite l'activité de plusieurs réactions enzymatiques successives, soit pour éliminer directement le groupement méthyle, soit pour échanger la base par une base non méthylée (Jurkowska et al., 2011; Kohli and Zhang, 2013; Wu and Zhang, 2010; Zhu, 2009).

B°) La méthylation des histones

Il existe de nombreuses modifications post-traductionnelles intervenant au niveau N-terminal des histones, notamment, l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitination et la méthylation (Liu et al., 2009). Les différentes combinaisons de ces modifications ou « code histone » peuvent être lues par des protéines régulatrices, conduisant à une modulation du niveau de compaction de la chromatine (actif ou inactif) mais également au recrutement ou non de la machinerie transcriptionnelle (Bannister and Kouzarides, 2011). Par exemple, il a été démontré que, lors d'un dommage de l'ADN, la triméthylation du résidu lysine 4 de l'histone 3 (H3K4me3) permet le recrutement d'un complexe mSIN3A/HDAC1 permettant de réprimer la transcription de gènes concernés (Shi et al., 2006). Dans cette section, étant donné le rôle de donneur de groupement méthyl de la méthionine, nous nous intéresserons

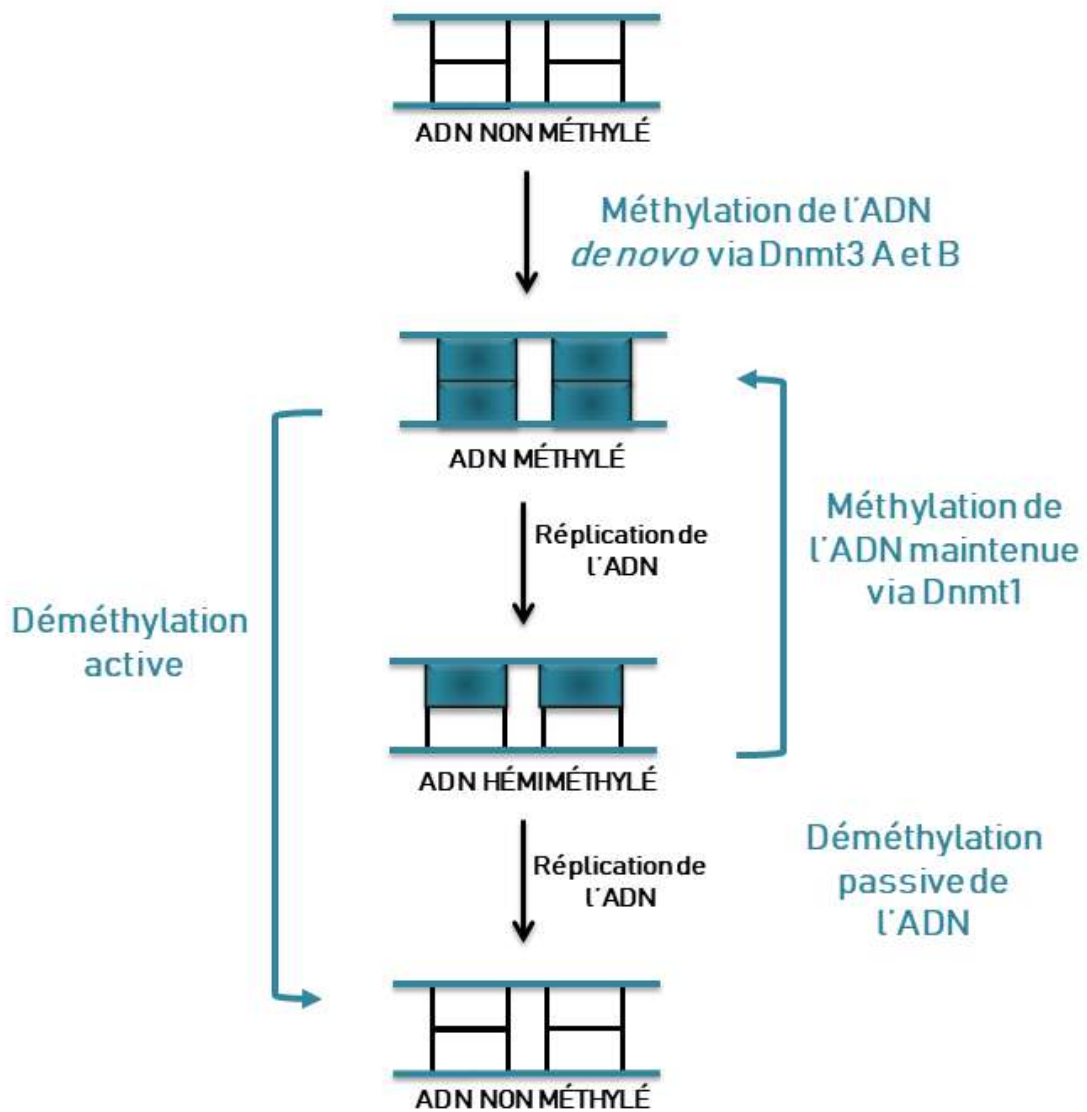


Figure 9 : Méthylation de l'ADN. L'ADN méthylé est maintenu par réplication via Dnmt1, mais peut être déméthylé passivement ou activement. La méthylation peut être également induite *de novo* via Dnmt3A et B

exclusivement à la méthylation des histones et plus particulièrement au niveau de leurs lysines.

Les histones peuvent être méthylées au niveau de leurs résidus lysines (K) (K4, 9, 27, 36 et 79 de H3 et K20 de H4) (Tableau 1) mais également sur les résidus arginines (R), et chaque modification peut avoir plusieurs variantes. Par exemple, les résidus lysines peuvent accepter un mono-, di- et tri-groupement méthyl provenant des SAM (Tableau 1). La méthylation des histones peut soit favoriser l'expression des gènes soit les réprimer (Martin and Zhang, 2005) (Tableau 1). De plus, la transcription sera différemment affectée suivant le nombre de groupement méthyl présent sur un site donné (Tableau 1) et la position du nucléosome sur le gène. Au cours des dernières années, des études sur différents organismes ont permis d'identifier plusieurs enzymes qui catalysent la méthylation des résidus lysine que l'on appelle méthyle-transférases (KMTs). Les KMTs catalysent le transfert d'un groupement méthyl de la SAM au groupement amine d'une lysine. Actuellement, environ 30 KMTs ont été identifiées et une grande majorité sont des protéines à domaine SET (Survivor 3-9 and Enhancer of zeste). La seule KMT ne possédant pas de domaine SET est DOT1L (Disruptor of telomeric silencing 1 like) qui permet de méthyler la H3K79 (Black and Whetstone, 2013).

Shi et al., (2004) ont constaté que le processus de méthylation des histones au niveau des résidus lysine était réversible. En effet dans cette étude, ils ont démontré que LSD1 (lysine-specific demethylase 1) permettait de déméthyler spécifiquement la H3K4 et donc agissait comme un répresseur de transcription. Ces résultats ont révélé que la méthylation des histones était un processus hautement dynamique qui nécessite la coordination des KMTs et des déméthylases (KDMs) afin de maintenir un équilibre au niveau de la méthylation des histones et donc au niveau de l'expression des gènes. Actuellement, 2 classes de KDMs ont été caractérisées : La famille des LSD (déméthylase spécifique de la lysine) et la famille des déméthylases contenant le domaine Jumonji. La famille des LSD permet de retirer un groupement méthyl grâce à un processus d'amine oxydase en présence d'un cofacteur flavine-adénine dinucléotide (FAD). Les LSD sont incapables de déméthyler les résidus triméthylés (Heightman, 2011). La seconde famille de KMT, utilisent du Fe(II) conjointement avec du 2-oxoglutarate pour oxygéner les groupes méthyles sur les lysines méthylées. Ces enzymes permettent la déméthylation des trois états de méthylation possibles sur les résidus de lysine (Heightman, 2011).

Tableau 1 : Méthylation des histones sur leurs résidus lysine

Type de modification	Histone					
	H3K4	H3K9	H3K27	H3K36	H3K79	H4K20
Mono-méthylation	activation	activation	activation		activation	activation
di-méthylation	activation	répression	répression		activation	
Tri-méthylation	activation	répression	répression	activation	activation/ répression	

1.3.2 Epigénétique et programmation nutritionnelle

Il est aujourd'hui admis que les stimuli nutritionnels subits lors de périodes critiques du développement peuvent "programmer" de façon permanente la croissance, la santé et le métabolisme des animaux. Ce phénomène est connu sous le nom de programmation nutritionnelle (Lucas, 1998, 1991). Par exemple, lorsqu'un fœtus ou un nourrisson en développement est soumis à un stimulus nutritionnel externe, les adaptations physiologiques qui se produisent pour assurer sa survie, peuvent laisser un souvenir permanent de cette exposition. La première étude sur la programmation nutritionnelle a été réalisée par Hales and Barker (1992). Ils ont observé qu'en Hollande, les enfants nés pendant la seconde guerre mondiale étaient enclins à développer un diabète de type 2 et que cela était lié à la famine et à la faible alimentation des mères au cours de la guerre. En effet, dans cette étude, les enfants dénutris développaient une résistance à l'insuline (dès le stade fœtal) leur permettant d'optimiser la croissance des organes clés comme le cerveau et le cœur au détriment d'autres organes afin d'assurer leur survie. Cependant, lorsque ces enfants se sont retrouvés dans un environnement nutritif riche et abondant, cette adaptation s'est révélée néfaste et a induit chez eux du diabète de type 2. Hales et Barker ont appelé ce phénotype « thrifty phenotype » ou phénotype économe.

La programmation nutritionnelle peut être résumée en 4 étapes. Premièrement, le stimulus nutritionnel est reçu durant une période critique de développement à forte plasticité métabolique. Ce stimulus est ensuite enregistré, puis mémorisé et enfin révélé plus tard dans la vie dévoilant un phénotype particulier (Figure 10). De nombreuses études se sont focalisées sur les mécanismes impliqués dans la programmation nutritionnelle et plusieurs d'entre elles ont démontré que les processus épigénétiques pouvaient jouer un rôle clé (Burdge et al., 2007; Gabory et al., 2011; Mathers, 2007; Reynolds et al., 2018; Vickers, 2014). L'un des exemples le plus souvent utilisé pour démontrer l'implication des processus épigénétiques dans la programmation nutritionnelle est le cas des abeilles. Les larves femelles possèdent toutes le même patrimoine génétique. Or, suivant leur alimentation elles peuvent soit se développer en abeilles ouvrières soit en reine fertiles. On sait aujourd'hui que ce phénomène est lié en partie à une réduction du niveau de la méthylation du génome des futures reines induite par une alimentation particulièrement riche avec de la gelée royale et qu'il fait intervenir notamment l'orthologue de la protéine DNMT3 des vertébrés. (Kucharski et al., 2008).

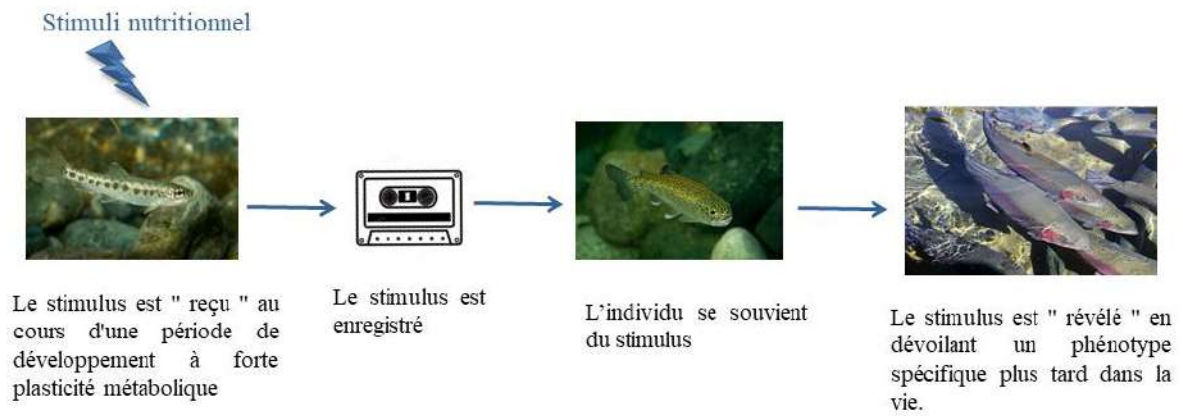


Figure 10 : Les différentes étapes de la programmation nutritionnelle. Cette théorie des quatre R (received, recorded, remembered, revealed) a été proposée par Lucas en 1998.

1.3.3 Conséquences d'une déficience en méthionine sur la programmation nutritionnelle et l'épigénétique chez le poisson

Le concept de programmation nutritionnelle est de plus en plus étudié en aquaculture car il ouvre un nouveau champ de recherche et d'opportunités vers l'optimisation de la nutrition et de la santé des animaux d'élevage avec des implications économiques évidentes (Balasubramanian et al., 2016; Fang et al., 2014; Fontagné-Dicharry et al., 2017; Geurden et al., 2014, 2013, 2007; Liu et al., 2017; Seiliez et al., 2017; Vagner et al., 2007). Il a ainsi été démontré que des alevins de truite arc-en-ciel ayant reçu un régime composé exclusivement de végétaux pendant une courte période (2 semaines) au cours du premier repas, présentaient une meilleure aptitude à utiliser ce même aliment plus tard dans leur vie par rapport à leurs congénères ayant reçu un aliment standard à base de farine et huile de poisson (Geurden et al., 2013). Plus récemment, deux études ont démontré qu'une carence alimentaire en méthionine (50% de carence) chez des géniteurs de truite arc-en-ciel affectait fortement la survie ainsi que les performances de croissance des descendants jusqu'à au moins trois semaines après leur première alimentation (Fontagné-Dicharry et al., 2017; Seiliez et al., 2017). Ces effets s'accompagnaient de fortes perturbations de l'expression de nombreux gènes impliqués dans le contrôle du métabolisme et de la croissance. Une étude complémentaire publiée en 2018 montre que ces mêmes descendants présentaient en outre des modifications de la méthylation de plusieurs sites CpG et du taux d'ARNm des gènes *bnip3* (bcl-2/E1B-19 K interacting protein 3) et *bnip3lb1* (aussi connu sous le nom de *nix*) impliqués dans l'apoptose et la dégradation spécifique des mitochondries par autophagie (Veron et al., 2018).

Dans l'ensemble, ces données valident le concept de programmation nutritionnelle chez les poissons mais montrent surtout que la méthionine peut jouer un rôle important dans ce processus et donc potentiellement modifier à plus ou moins long terme leur métabolisme.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE 2 : LA MITOCHONDRIE UN ACTEUR MAJEUR A PRENDRE EN CONSIDERATION LORS D'UNE CARENCE EN METHIONINE

2.1. Généralités sur les mitochondries	34
2.1.1 Les différentes structures des mitochondries.....	34
2.1.2 Le cycle de Krebs.....	38
2.1.3 La chaîne respiratoire	40
2.2. Les mitochondries des organites dynamiques.....	43
2.2.1 La biogénèse mitochondriale	43
2.2.2 Fusion et fission mitochondriale	46
2.2.3 La dégradation des mitochondries	51
2.3. Les mitochondries et leurs implications dans différents systèmes cellulaires primordiaux.....	61
2.3.1 Les mitochondries et le métabolisme intermédiaire.....	61
2.3.2 Les mitochondries et le statut oxydant.....	68
2.3.3 Les mitochondries et le réticulum endoplasmique	72

PARTIE 2 : LA MITOCHONDRIE UN ACTEUR MAJEUR A PRENDRE EN CONSIDERATION LORS D'UNE CARENCE EN METHIONINE

Paradoxalement, alors que la méthionine joue un rôle clé en tant qu'antioxydant, plusieurs études chez les mammifères ont démontré qu'une restriction en méthionine alimentaire entraînait une diminution de la production de ROS et des dommages oxydatifs associés. En effet, Sanchez-Roman et al. (2011) ont démontré que des rats alimentés avec un régime isocalorique déficient en méthionine (40% de restriction) pendant 7 semaines, présentaient dans le cœur, une diminution de la production de ROS par les mitochondries ainsi qu'une baisse des dommages oxydatifs causés à l'ADN, aux protéines et aux lipides. Des résultats similaires ont été obtenus dans le foie, les reins, et le cerveau de rats nourris avec des aliments restreints en méthionine (de 40% à 93% de restriction en méthionine) (Caro et al., 2009, 2008; Sanz et al., 2006). Actuellement, les mécanismes impliqués sont loin d'être totalement identifiés. Plusieurs hypothèses ont été émises, telles qu'une diminution du niveau d'activité des complexes mitochondriaux (connus pour produire une grande partie des ROS cellulaires), une diminution de la respiration mitochondriale (JO_2), un léger découplage de la chaîne de transport d'électrons, ou encore la substitution des acides gras insaturés de la membrane mitochondriale (20:4 n-6 et 22:6 n-3) par des acides gras moins insaturés (18:2 n-3, 18:1 n-9 et 18:0) (Caro et al., 2009, 2008; Naudí et al., 2007; Sanchez-Roman et al., 2011; Sanchez-Roman and Barja, 2013; Sanz et al., 2006). Dans l'ensemble, ces données suggèrent que la restriction en méthionine provoque un dysfonctionnement général des mitochondries.

Chez les poissons, de nombreuses études ont démontré que la restriction en méthionine induit une baisse de la croissance et altère le statut oxydant (cf. 1.2.2) ainsi que le métabolisme intermédiaire (Craig and Moon, 2013; Elmada et al., 2016; Espe et al., 2010; Fontagné-Dicharry et al., 2017; Li et al., 2009; Skiba-Cassy et al., 2016; Wang et al., 2016; Wu et al., 2017). En revanche, à notre connaissance, chez les poissons, peu voire aucune donnée n'est actuellement disponible sur l'impact d'une déficience en méthionine sur les mitochondries, et ce malgré le rôle clé des mitochondries dans la croissance, la régulation du statut oxydant et du métabolisme intermédiaire.

Ainsi, dans cette partie, nous nous intéresserons particulièrement aux mitochondries et à leur fonctionnement, mais également aux rôles qu'elles jouent dans différents systèmes cellulaires primordiaux.

2.1 Généralités sur les mitochondries

L'apparition des cellules eucaryotes, contenant un noyau et d'autres compartiments cellulaires, est l'un des événements les plus énigmatiques de l'évolution. D'après de nombreuses recherches, au cours du Précambrien, l'endosymbiose de protéobactéries (devenues des mitochondries) avec des cellules hôtes de type archée a été une étape primordiale dans la formation des cellules eucaryotes (Ettema, 2016). Les mitochondries génèrent une grande quantité d'énergie (sous forme d'ATP) à partir d'O₂, grâce à des réactions de phosphorylation oxydatives, et sont parfois comparées à des centrales énergétiques des cellules eucaryotes. C'est grâce à cette capacité à générer de l'énergie, que les mitochondries auraient permis aux cellules eucaryotes d'atteindre un tel niveau de complexité.

Dans cette sous partie, nous décrirons les différents compartiments structurels des mitochondries et préciserons leur rôle dans la synthèse d'énergie. Nous nous intéresserons plus particulièrement au cycle de Krebs et à la chaîne respiratoire.

2.1.1 Les différentes structures des mitochondries

C'est en 1857 que Rudolf Albert von Kölliker décrit pour la première fois les « sarcosomes » (aujourd'hui appelés mitochondries) dans des cellules musculaires (Arismendi-Morillo, 2011). Le développement de la microscopie électronique permettra par la suite de décrire plus précisément la structure des mitochondries (Palade, 1953). La taille et la forme des mitochondries varient en fonction des tissus et de l'état métabolique des cellules. Ces organites cytoplasmiques mesurent en moyenne 0,5-1µm de diamètre sur 1-10µm de long et sont constitués de quatre compartiments: une membrane externe, un espace inter-membranaire, une membrane interne, et enfin, un espace matriciel (Figure 11).

A) La membrane externe

La membrane externe des mitochondries est une bicouche lipidique composée de 50% de lipides (principalement de phospholipides insaturés et en moindre quantité de cholestérol) et 50% de protéines. Cette membrane est perméable à pratiquement toutes les molécules de taille inférieure à 1 kDa (anions, cations, protons, acides gras, pyruvate ou encore nucléotides) grâce à la présence de protéines appelées porine ou VDAC (Voltage-Dependent Anion

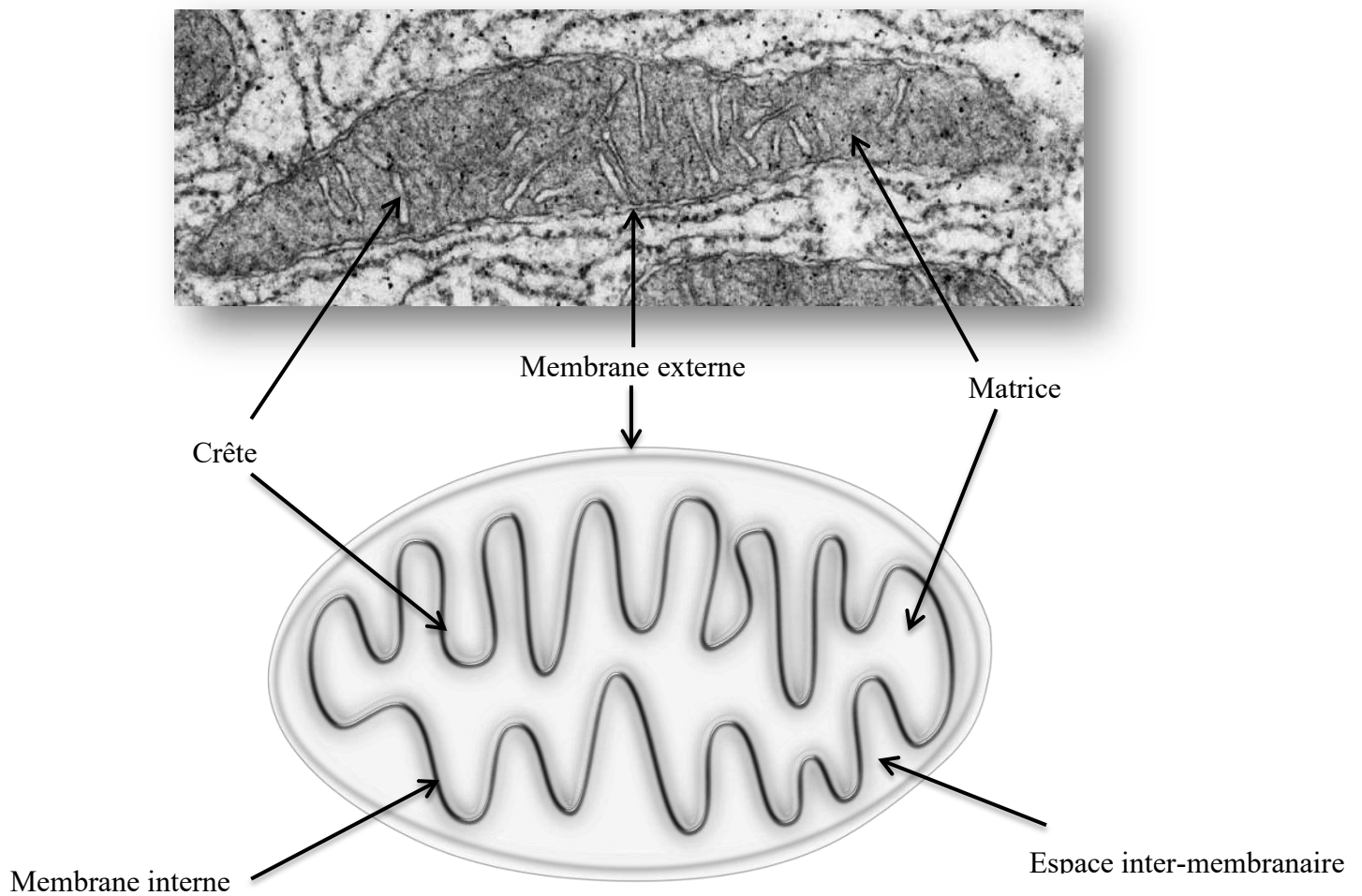


Figure 11 : Structure des mitochondries. Image en microscopie électronique d'une mitochondrie et représentation schématique d'une mitochondrie

channel) qui forment des canaux aqueux traversant la bicouche lipidique et permettant le transport passif de ces petites molécules. Les molécules plus grosses peuvent également passer cette membrane par transport actif, à l'aide de protéines de transport membranaire ou encore de complexes protéiques spécialisés appelés « translocases », tels que le complexe TOM (Translocase of the outer membrane). Ce dernier est composé de plusieurs sous unités capables de reconnaître les séquences d'adressage mitochondrial (MTS, Mitochondrial Targeting Sequence), constituées de 15-30 acides aminés, et souvent positionnées au niveau N-terminal des protéines cytosoliques destinées aux mitochondries (Neupert and Herrmann, 2007). La majorité des protéines mitochondriales étant codée par le génome nucléaire, ce complexe est indispensable au bon fonctionnement des mitochondries.

B) L'espace inter-membranaire

L'espace inter-membranaire (IMS, intermembrane space) est localisé entre la membrane externe et la membrane interne mitochondriale. L'IMS est fortement concentré en protons et contient également plusieurs protéines impliquées dans de nombreux processus physiologiques. On retrouve notamment, des pro-caspases ou des cytochromes c impliqués dans l'apoptose (Muñoz-Pinedo et al., 2006), des protéines impliquées dans le transport des protéines hydrophobes de la membrane externe vers la membrane interne mitochondriale (Koehler et al., 1998), mais également de nombreuses enzymes telles que la SOD (superoxyde dismutase) ou la créatine kinase (Gellerich et al., 1987).

C) La membrane interne

La membrane interne (MI) est essentiellement composée de protéines (75%, dont la majorité est hydrophobe) et contient seulement 25% de lipides dont 20% sont des cardiolipines. La présence de cardiolipines permet de rendre cette membrane imperméable aux ions, en particulier aux protons, ce qui est essentiel au bon fonctionnement du complexe IV de la chaîne respiratoire (que nous détaillerons par la suite). La surface de la MI est 5 à 10 fois supérieure à celle de la membrane externe, car elle possède de nombreux replis orientés vers l'intérieur de la mitochondrie que l'on nomme crête mitochondriale. La membrane interne comporte au moins trois sous-régions morphologiquement distinctes : les crêtes mitochondriales, les jonctions des crêtes mitochondriales et la membrane périphérique (Figure 11). La forme de ces structures est modifiée en réponse aux besoins métaboliques et au stress

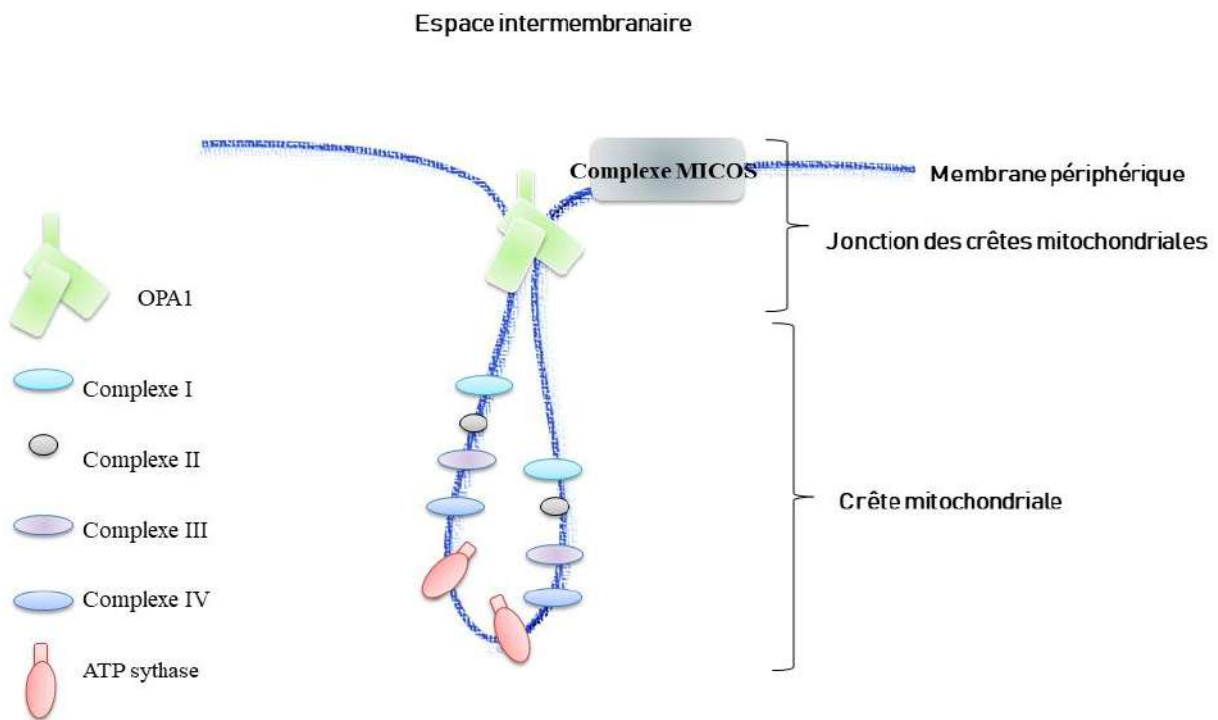


Figure 12 : Structure de la membrane interne mitochondriale

cellulaire (Kausar et al., 2018). Les jonctions des crêtes mitochondriales permettent la diffusion des molécules entre l'espace intra-crête et l'espace intermembranaire mitochondrial. Ces structures sont composées de plusieurs protéines et complexes protéiques tels que OPA1 et MICOS (Figure 12) (Mitochondrial contact site and organizing system complex) qui sont impliqués dans le maintien et la structure des crêtes (Cogliati et al., 2016). Les crêtes permettent d'augmenter la surface d'échange entre le milieu extérieur et la matrice, mais également la production d'énergie, en augmentant la quantité des complexes de la chaîne respiratoire. On retrouve également, au niveau de la MI, de nombreuses protéines enzymatiques telles que les enzymes impliquées dans la synthèse des stéroïdes ou encore des protéines impliquées dans le transport de molécules tel que l'ANT (Adenine Nucleotide Translocator), qui est une translocase permettant d'échanger une molécule d'ATP mitochondriale contre de l'ADP cytosolique, ou encore TIM23 (translocase of the inner membrane) qui permet le passage des protéines de l'espace inter-membranaire vers la matrice.

D) La matrice mitochondriale

La matrice est le siège de nombreuses réactions enzymatiques essentielles au métabolisme énergétique, notamment le cycle de Krebs ou la β -oxydation des acides gras. C'est également le compartiment qui détient l'information génétique des mitochondries (l'ADN mitochondrial circulaire ou ADNmt) et toute la machinerie indispensable pour sa réplication et sa réparation, ainsi que la transcription et la traduction des protéines mitochondriales. L'ADNmt, qui est dépourvu d'histones et d'introns, est capable de coder 13 protéines de la chaîne respiratoire.

2.1.2 Le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs, aussi connu sous le nom de cycle de l'acide citrique ou encore cycle des tricarboxyliques, fonctionne en étroite collaboration avec le métabolisme intermédiaire et la chaîne respiratoire. En effet, l'acétyl-CoA ainsi que l'acide pyruvique, essentiels au bon fonctionnement du cycle, proviennent de la dégradation des glucides, protéines, lipides et certains acides aminés. Au cours du cycle de Krebs, deux coenzymes réduits, le NADH et le FADH₂, sont formés et utilisés par la chaîne respiratoire. Ainsi le cycle de Krebs se trouve à la jonction du métabolisme intermédiaire et de la chaîne respiratoire, ce qui fait de lui un mécanisme clé dans la production énergétique.

Le cycle de Krebs se déroule en 8 étapes (Figure 13) : (1) Premièrement, la citrate synthase catalyse la conversion de l'Acétyl CoA et de l'oxaloacétate en citrate. Deux

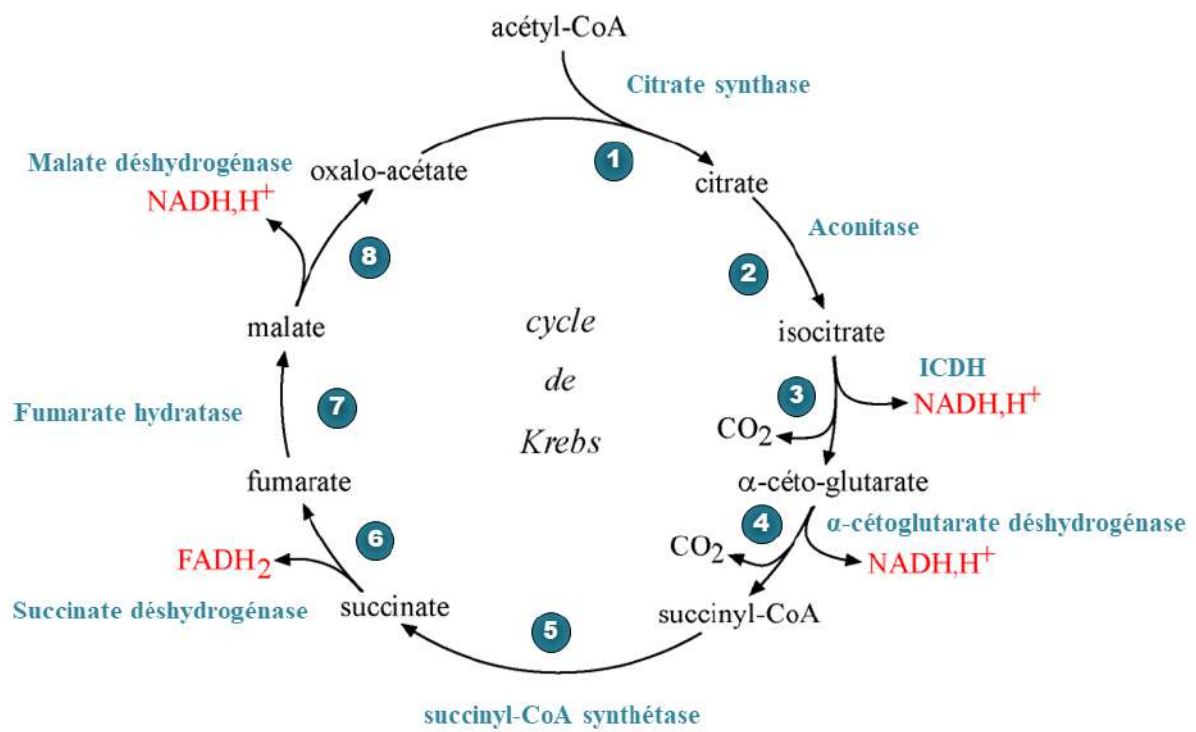


Figure 13 : Représentation schématique des 8 étapes du cycle de Krebs

carbones issus de l'acétyl-CoA, sont ainsi combinés avec quatre carbones provenant de l'oxaloacétate, formant ainsi le citrate. (2) Le citrate formé est ensuite isomérisé par l'aconitase afin de former de l'isocitrate. Cette réaction implique une déshydratation et réhydratation successive via la cis-aconitate qui joue le rôle d'intermédiaire déshydraté, qui reste lié à l'enzyme. (3 et 4) L'isocitrate subit deux décarboxylations oxydatives successives. La première est catalysée par l'isocitrate déshydrogénase permettant la formation d' α -cétooglutarate et la formation de NADH. La seconde, est catalysée par l' α -cétooglutarate déshydrogénase, qui transforme l' α -cétooglutarate en succinyl-CoA et permet également de former du NADH. Le NADH ainsi synthétisé va pouvoir être par la suite utilisé par la chaîne respiratoire. (5) La cinquième étape du cycle de Krebs, consiste à transformer la succinyl-CoA en succinate via le succinyl-CoA synthase. La succinyl-CoA est une molécule riche en énergie et cette énergie est par la suite utilisée pour former du GTP au cours de cette réaction. Les dernières étapes du cycle de Krebs permettent de resynthétiser de l'oxaloacétate à partir de succinate. (6) Tout d'abord, le succinate déshydrogénase oxyde le succinate en fumarate tout en synthétisant une molécule de FADH₂. Le succinate déshydrogénase, qui se situe au niveau de la chaîne respiratoire, fournit ainsi le FADH₂ nécessaire à l'activité du complexe II de la chaîne respiratoire. (7) Par la suite la fumarase ou fumarate hydratase permet la synthèse du malate à partir du fumarate, qui sera par la suite transformé en oxaloacétate grâce au malate déshydrogénase (8). Cette dernière réaction s'accompagne de la réduction du NAD⁺ en NADH. L'oxaloacétate ainsi produit est alors disponible pour un nouveau cycle.

Le flux du cycle de Krebs est contrôlé par des interactions allostériques. En effet, l'accumulation de NADH, H⁺, bloque à la fois l'isocitrate et l' α -cétooglutarate déshydrogénase, tandis que le citrate qui s'accumule inhibe la citrate synthase. De même, l'accumulation de succinyl-CoA entraîne l'inhibition de l' α -cétooglutarate déshydrogénase. La disponibilité en substrat peut également jouer un rôle dans le contrôle du cycle de Krebs. En effet, il est connu que la disponibilité en oxaloacétate et en acétyl-CoA intervient dans la régulation du citrate synthase.

2.1.3 La chaîne respiratoire

Au cours des réactions de phosphorylation oxydatives, des électrons provenant des coenzymes réduits (NADH et FADH₂) produits au cours du cycle de Krebs, vont être pris en charge par les différents complexes de la chaîne respiratoire (Figure 14). Ces électrons, vont circuler à travers les quatre complexes et générer une force « électro-motrice », qui va permettre la libération de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire.

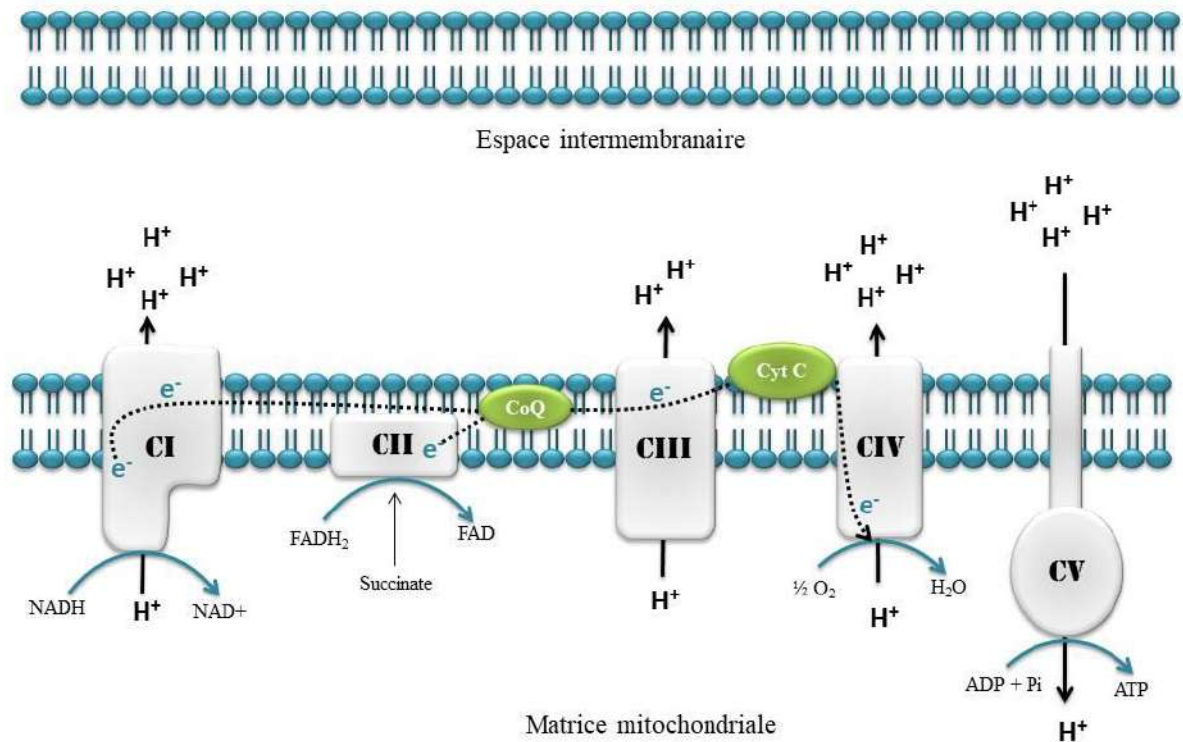


Figure 14 : Système des oxydations phosphorylante (OXPHOS). Les complexes I, III et IV permettent le transfert des Protons (H^+) dans l'espace inter-membranaire. Ces protons passent à travers le complexe V qui utilise la force proton-motrice afin de générer de l'ATP

La libération des protons à lieu au niveau des complexes I, III et IV et permet la création d'une force « proton-motrice ». Cette force est essentielle pour fournir suffisamment d'énergie à l'ATP synthase, qui va à son tour produire de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique. La chaîne respiratoire est organisée en 4 complexes situés dans la membrane interne mitochondriale. Un cinquième complexe protéique sert ensuite à coupler les réactions énergétiques du transport d'électron à la synthèse de l'ATP.

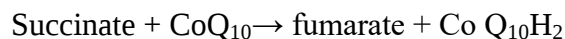
A) NADH-coenzyme Q oxydoréductase ou complexe I

Le complexe I (CI), connu aussi sous le nom de NADH-coenzyme Q oxydoréductase, est le plus gros complexe protéique de la chaîne respiratoire (980 kDa). Il est composé de 45 sous unités dont 7 sont codées par l'ADNmt (ND1 à ND6 et ND4L). Ce complexe permet d'oxyder le NADH en NAD^+ et, de manière concomitante, de réduire le coenzyme Q10 (CoQ_{10}), présent sur la membrane interne, en $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$. Pour chaque paire d'électrons transférée, quatre protons vont transiter de la matrice vers l'espace intermembranaire.



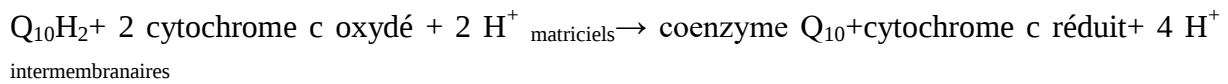
B) Succinate-coenzyme Q oxydoréductase ou complexe II

Le succinate-coenzyme Q oxydoréductase (CII), qui intervient également dans le cycle de Krebs, est le seul complexe qui est entièrement codé par le génome nucléaire. Il est composé de 4 sous unités et de plusieurs co-facteurs. Ce complexe permet d'oxyder le succinate en fumarate et de transférer les électrons au FADH_2 puis au CoQ_{10} entraînant la formation de $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$. Ce complexe libère moins d'énergie que l'oxydation du NADH et ne participe pas au gradient de protons.



C) La coenzyme Q-cytochrome c réductase ou complexe III

Le complexe III, aussi connus sous le nom de coenzyme Q-cytochrome c réductase, est composé de 11 sous-unités, dont seul le cytochrome b est codé par l'ADNmt. Il est capable de transférer des électrons du $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ aux molécules de cytochrome c localisées dans l'espace intermembranaire, entraînant ainsi la réoxydation du $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ en CoQ_{10} et la réduction du cytochrome c. Il permet également le transfert de 4 protons à travers la membrane interne.



D) Cytochrome c oxydase ou complexe IV

Le cytochrome c oxydase (complexe IV) est composé de 13 sous unités dont trois sont codées par le génome mitochondrial. Ce complexe possède un site de liaison avec l'oxygène, permettant le transfert des électrons du cytochrome à l'accepteur final, l'oxygène, qui sera alors réduit en eau. Au cours de cette étape, 4 protons sont consommés et 4 autres sont transloqués de la matrice vers l'espace intermembranaire.



E) Pompe ATP synthase ou complexe V

Le complexe V est constitué de 2 sous unités principales. La première (F1) est située du côté matriciel et correspond à la partie catalytique qui utilise le gradient électrochimique pour synthétiser des molécules d'ATP. La seconde (F0) est intégrée dans la membrane interne et forme un canal ionique permettant le retour des protons dans la matrice. Le retour des protons de l'espace intermembranaire vers la matrice, entraîne la rotation du complexe, permettant de former la liaison entre le phosphore et l'ADP, et ainsi de générer de l'ATP.

2.2 Les mitochondries : des organites dynamiques

La structure et le nombre des mitochondries dans les cellules ne sont pas statiques et peuvent être ajustés en fonction des besoins énergétiques des cellules ou des stimuli physiologiques. La quantité des mitochondries ou volume du réseau mitochondrial est donc extrêmement variable et dépend de plusieurs processus incluant la biogénèse, la fusion, la fission ou encore la dégradation mitochondriale. Dans cette sous-partie nous allons détailler ces différents processus.

2.2.1 La biogénèse mitochondriale

La biogénèse mitochondriale correspond à la croissance et à la division des mitochondries préexistantes (Ventura-Clapier et al., 2008). Elle est déclenchée lors de la division, du renouvellement et de la différenciation cellulaire, mais peut également être

induite par divers stress environnementaux tels qu'un effort physique, l'exposition au froid ou la restriction calorique (Ventura-Clapier et al., 2008).

L'ADN mitochondrial contient 37 gènes codant pour 13 sous-unités de la chaîne respiratoire, ainsi que pour 2 ARNr et 22 ARNt nécessaires à la traduction des ARNm codés par les mitochondries. Etant donné, que le protéome mitochondrial comprend environ 1100 à 1500 protéines, une grande majorité d'entre elles, sont codées par le génome nucléaire (Hock and Kralli, 2009). Ainsi, la biogénèse mitochondriale fait intervenir des gènes appartenant à la fois au génome nucléaire et au génome mitochondrial, ce qui nécessite une coordination de la transcription des gènes de ces deux compartiments.

La biogénèse mitochondriale est stimulée par PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ -coactivator-1) qui est connu pour interagir avec de nombreux facteurs de transcription, et notamment NRF-1 (Nuclear respiratory factor), NRF-2, ERR α , et ERR γ (estrogen-related receptor) (Figure 15). Les facteurs de transcriptions NRF-1 et NRF-2 jouent un rôle majeur dans la régulation des gènes nucléaires codant pour des protéines impliquées dans la chaîne respiratoire et l'import mitochondrial (tel que TOM20). Ils sont également impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes nucléaires codant pour les facteurs de transcription mitochondriaux TFAM (transcription factor A mitochondrial), TFB1M (transcription factor B1 mitochondrial) et TFB2M (transcription factor B1 mitochondrial), qui sont nécessaires à la transcription des gènes mitochondriaux et à la réplication de l'ADNmt (Figure 15) (Hock and Kralli, 2009). Les facteurs de transcription ERR α et ERR γ quant à eux, ciblent un ensemble de gènes impliqués dans la β -oxydation, la chaîne respiratoire, le cycle de Krebs et dans la régulation de la fission et la fusion mitochondriale (Dominy and Puigserver, 2013; Giguère, 2008; Ventura-Clapier et al., 2008).

Toutefois, la biogénèse mitochondriale est une réponse adaptative à long terme et n'est pas toujours nécessaire pour répondre à une augmentation transitoire des besoins énergétiques. Ces changements transitoires de la demande énergétique peuvent ainsi être comblés par une augmentation de l'expression de seulement certains gènes mitochondriaux ou de certains régulateurs critiques permettant l'amélioration de la fonction mitochondriale (Hock and Kralli, 2009).

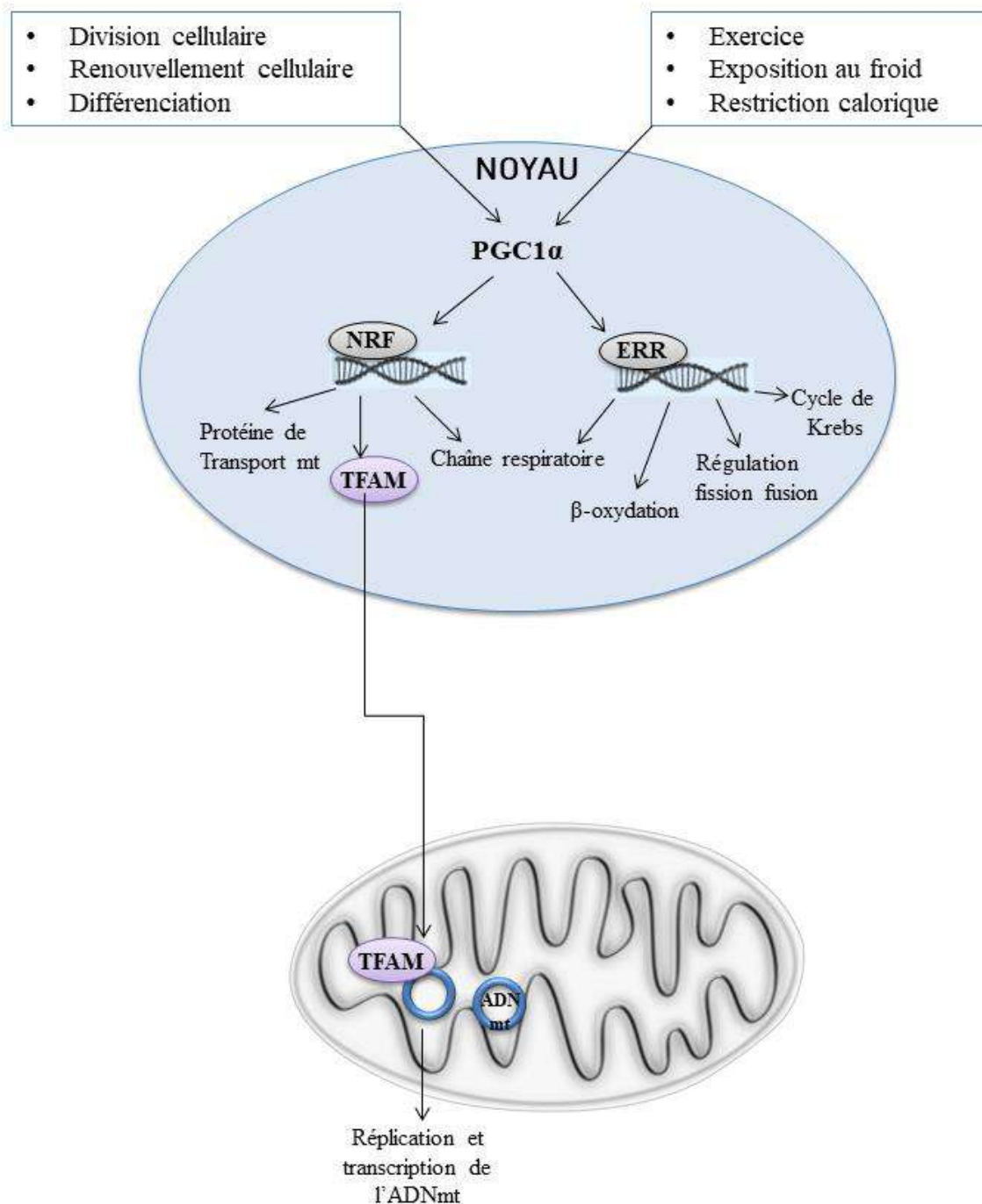


Figure 15: Représentation schématique de la biogénèse mitochondriale. ERR, estrogen-related receptor; mt, mitochondrial; NRF, Nuclear respiratory factor; PGC1α, peroxisome proliferator-activated receptor γ-coactivator-1; TFAM transcription factor A mitochondrial.

2.2.2 Fusion et fission mitochondriale

Dans beaucoup de cellules eucaryotes, les mitochondries se déplacent le long du cytosquelette afin de fournir un approvisionnement immédiat en énergie, sous forme d'ATP, à toutes les zones de la cellule (Westermann, 2010). Non seulement les mitochondries peuvent se déplacer dans la cellule, mais en plus, les avancées techniques d'imagerie cellulaire et l'avènement des marqueurs fluorescents, ont démontré qu'elles subissent fréquemment des événements de fusion et de fission (Hewitt and Whitworth, 2017). Ainsi, suivant le type cellulaire et les conditions environnementales, il existe une forte diversité de la taille, du nombre, et de la forme des mitochondries. Cette diversité résulte de l'équilibre dynamique entre les processus de fission et de fusion mitochondriales. Un déséquilibre du cycle de fusion / fission peut conduire à des modifications morphologiques globales et faire apparaître des mitochondries sous forme de petites sphères fragmentées ou alors sous forme allongées (Figure 16).

La dynamique de cet équilibre permet à la cellule de répondre à des conditions physiologiques changeantes. La fusion mitochondriale, entraînant l'allongement des structures mitochondriales, permet une augmentation de la production d'ATP et le transfert du matériel mitochondrial (tel que les ARN de transfert ou ribosomiques ou encore des protéines) entre les mitochondries qui ont fusionnées. Ainsi, en situation de jeûne, la fusion permet une production maximale d'ATP, afin de promouvoir la survie cellulaire (Hewitt and Whitworth, 2017). De plus l'hyper-fusion des mitochondries, au cours d'un jeûne permet de prévenir leur dégradation par une forme d'autophagie spécifique appelée mitophagie dont on parlera plus en détail ultérieurement (Gomes et al., 2011; Hewitt and Whitworth, 2017; Youle and Narendra, 2011). En revanche, la fission mitochondriale permet de produire des nouvelles mitochondries plus petites et plus faciles à répartir entre les cellules qui se divisent par mitose (Taguchi et al., 2007). De plus les mitochondries générées par fission peuvent être dégradées par mitophagie, permettant ainsi un renouvellement des mitochondries (Farmer et al., 2018; Youle and Narendra, 2011).

Dans l'ensemble ces données indiquent que la fusion et la fission mitochondriale jouent un rôle clé au niveau de l'homéostasie cellulaire en ajustant précisément le réseau mitochondrial aux besoins de la cellule.

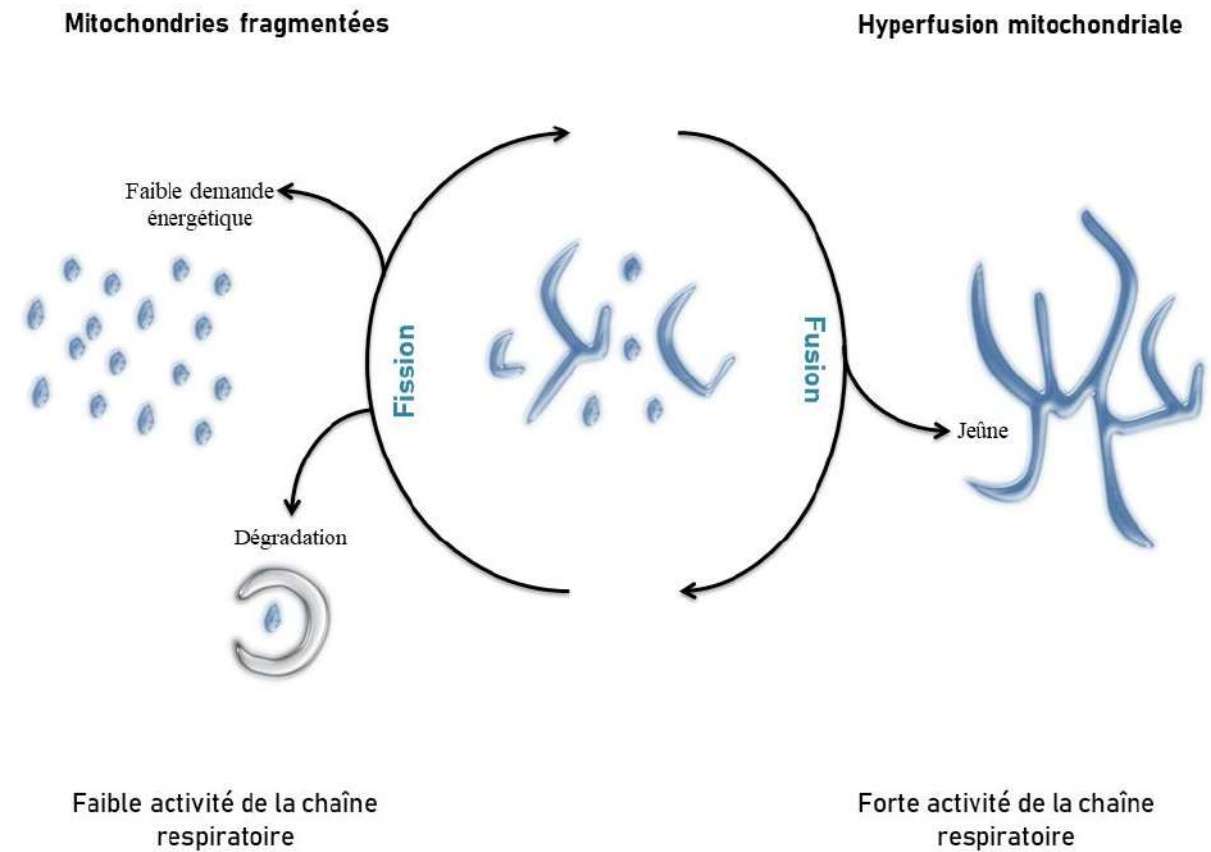


Figure 16: Adaptation de la morphologie des mitochondries suivant les conditions environnementales et la demande énergétique

A) Les différents acteurs de la fusion mitochondriale

La fusion mitochondriale se déroule en trois étapes, incluant (i) l'amarrage des mitochondries, (ii) la fusion de la membrane externe et (iii) la fusion de la membrane interne (Figure 17). Ces trois étapes sont médiées par 3 GTPases, qui font partie de la famille des dynamines : Mfn1 (mitofusine 1), Mfn2 (mitofusine 2) et OPA1 (optic atrophy 1). Ces trois GTPases sont très conservées au cours de l'évolution (Youle and Narendra, 2011). Les protéines Mfn1 et Mfn2 permettent l'amarrage des mitochondries et la fusion des membranes externes, tandis qu'OPA1 permet la fusion des membranes internes (Figure 17).

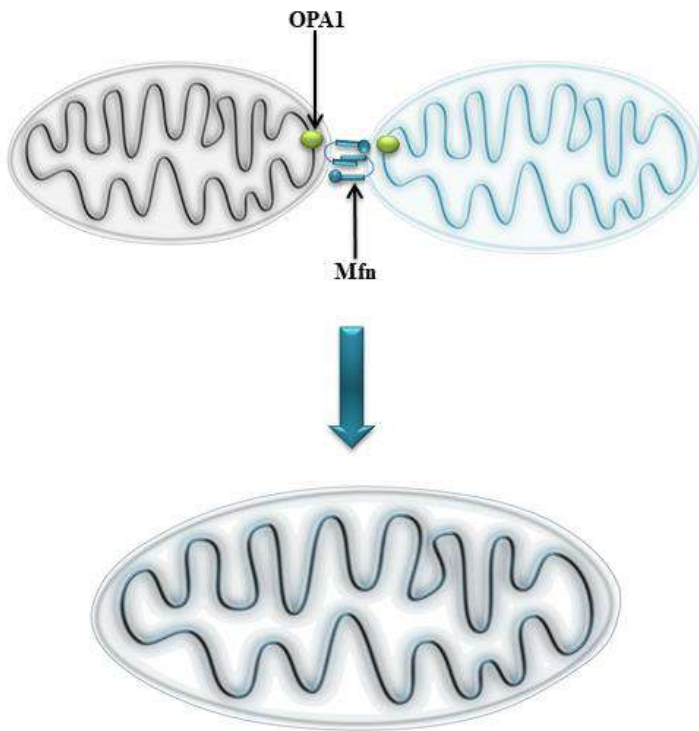
Mfn1 et Mfn2

Mfn1 et Mfn2 sont ancrées dans la membrane externe des mitochondries grâce à leur domaine transmembranaire C-terminal. Elles possèdent toutes deux un domaine GTPase au niveau de leurs extrémités N-terminal qui est essentiel à leur fonction (Wai and Langer, 2016). Au cours de la première étape de la fusion, la dimérisation des domaines en superhélices des mitofusines permet l'amarrage des deux mitochondries prêtes à fusionner. Les mitofusines, permettent ensuite, la fusion des membranes externes grâce à des interactions homo- (tel que Mfn1/Mfn1) et hétéro-typiques (Mfn1/Mfn2) qui dépendent de l'hydrolyse du GTP. La synthèse des mitofusines est régulée par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels tandis que leur dégradation via le protéasome est régulée par ubiquitinylation et phosphorylation. La délétion des mitofusines dans les tissus (cœur, foie, muscle ou encore système nerveux central) compromet le métabolisme et la fonction de l'organe, ce qui démontre leur importance à l'échelle cellulaire mais également à l'échelle de l'organisme (Detmer et al., 2007; Dorn, 2015; Wai and Langer, 2016).

Dans certaines situations, la fusion peut être transitoire et se limiter aux membranes externes, permettant aux mitochondries d'échanger des protéines solubles de l'espace inter-membranaire et de la matrice avant de se séparer à nouveau, on parle alors de « kiss and run » (Liu et al., 2009b).

FUSION

Stimulée par la carence énergétique et le stress



FISSION

Génère de nouvelles mitochondries et permet un contrôle qualité

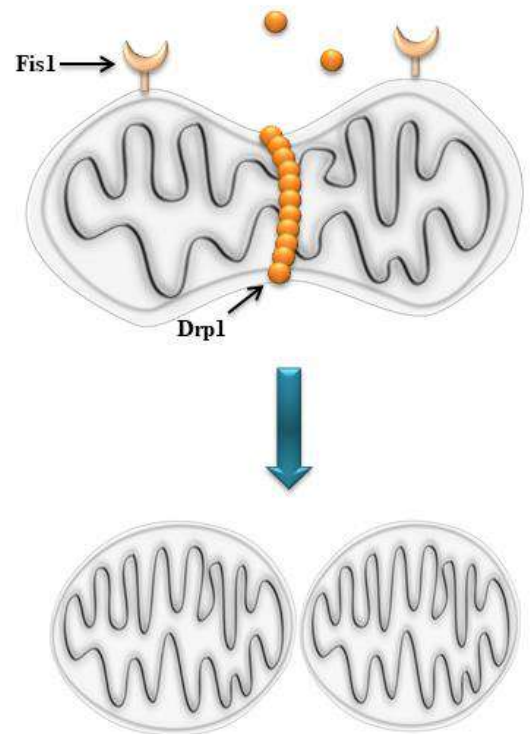


Figure 17: Représentation schématique de la fusion et de la fission mitochondriale. Au cours de la fusion (à gauche) les protéines mfn2 ainsi que OPA1 permettent la fusion des membranes externes et internes des mitochondries. En revanche, lors de la fission (à droite), des protéines telles que Fis1 permettent le recrutement de Drp1 qui va permettre la scission de la membrane interne et externe de la mitochondrie pour former deux mitochondries.

OPA1

OPA1, est une protéine intervenant dans la fusion des membranes internes. Cette protéine est ancrée dans la membrane interne grâce à son domaine N-terminal, mais la majeure partie de cette protéine se trouve dans l'espace inter-membranaire (y compris le domaine de liaison GTP et son domaine effecteur GTPase). Il existe plusieurs isoformes de OPA1 qui résultent d'un épissage alternatif (forme longue, L-OPA1) (Anand et al., 2014) et d'un clivage protéolytique (forme courte, S-OPA1) (Ishihara et al., 2006; Mishra et al., 2014; Wai and Langer, 2016). L-OPA1 est ancrée au niveau de la membrane interne par son domaine transmembranaire N-terminal et peut être libérée par clivage protéolytique pour donner la forme soluble S-OPA1 (Ishihara et al., 2006). Anand et al., (2014) ont démontré que L-OPA1 est suffisante pour induire la fusion mitochondriale et le maintien des mitochondries tubulaire, tandis que S-OPA1 est associée à la fission et à la fragmentation mitochondriale. Plusieurs stress métaboliques, comme par exemple une diminution du potentiel membranaire des mitochondries, peut induire le clivage de L-OPA1 en S-OPA1, empêchant ainsi la fusion de la membrane interne (Mishra and Chan, 2016).

B) Les différents acteurs de la fission mitochondriale

Le principal acteur de la fission mitochondriale est Drp1 (dynamin-related protein 1), une GTPase de la famille des dynamines. Au cours de la fission, Drp1 est transloquée du cytosol vers les futurs sites de scission mitochondriale, où elle va subir une oligomérisation, et former des structures en forme d'anneau (Figure 17). Plusieurs protéines (FIS1, MFF, MiD49 ou encore MiD51) localisées au niveau de la membrane externe mitochondriale permettent son recrutement (Wai and Langer, 2016) (Figure 17). Une fois à la membrane externe mitochondriale, Drp1 va fixer puis hydrolyser du GTP afin d'induire une constriction puis une scission membranaire mitochondriale au niveau des sites de fission (Mears et al., 2011). Plusieurs modifications post-traductionnelles de Drp1 peuvent affecter son recrutement et sa fonction, notamment sa phosphorylation (qui peut inhiber et activer son activité suivant le site concerné), son ubiquitinylation (augmente son activité), ou encore sa SUMOylation (inhibition de la fission) (Wai and Langer, 2016).

Bien que le rôle de Drp1 dans la scission de la membrane externe soit clairement établi, celle de la membrane interne via Drp1 l'est moins. Certaines études suggèrent que d'autres protéines pourraient être impliquées dans ce processus comme S-OPA1 (présentée ci-dessus) ou MTP18, dont le rôle dans le maintien de la morphologie des mitochondries a été démontré (Wai and Langer, 2016).

2.2.3 La dégradation des mitochondries

Les mitochondries sont des organites essentiels qui produisent de l'ATP mais interviennent également dans de nombreuses voies métaboliques nécessaires à l'homéostasie cellulaire. Ainsi, l'accumulation de mitochondries vieillissantes ou défectueuses peut engendrer de graves conséquences au niveau du métabolisme cellulaire (stress oxydatif, apoptose). Les cellules disposent donc de plusieurs mécanismes leur permettant de contrôler la quantité de ces organites, notamment la macroautophagie qui est une des principales voies du catabolisme lysosomal impliquées dans le recyclage des structures cellulaires endommagées.

Dans cette sous-partie nous nous intéresserons à cette fonction cellulaire et son rôle dans la dégradation spécifique des mitochondries, plus communément appelée mitophagie.

A) L'autophagie

L'autophagie a été observée pour la première fois par S.L.Clark en 1957, qui a noté la présence, dans des tubules rénaux de souris, de vacuoles de forme irrégulière contenant des matériaux amorphes et parfois des mitochondries. Novikoff et al., (1956) avaient également observé des structures membranaires similaires contenant du RE, des mitochondries et des ribosomes. Le terme autophagie a été proposé pour la première fois par Christian de Duve en 1963 lors d'une réunion du « Ciba Foundation symposium on lysosome » (Klionsky, 2008). Le terme « autophagie » provient du grecque « phagy » qui signifie manger et « auto » qui signifie soi-même. Ainsi, l'autophagie est une fonction « d'auto-cannibalisme » de la cellule qui a été conservée tout au long de l'évolution.

Au cours de l'autophagie, une partie du cytoplasme contenant les composants cellulaires à dégrader est séquestrée, puis transmise au lysosome afin d'être dégradée. Les produits issus de cette dégradation sont ensuite relargués dans le cytoplasme pour être réutilisés (Cuervo, 2004; Yang and Klionsky, 2010). Initialement, lorsque l'autophagie a été découverte, les chercheurs pensaient que ce processus permettait seulement à la cellule de dégrader ses différents constituants obsolètes ou les agrégats de protéines. Cependant, quelques années plus tard, ils ont découvert que cette fonction était également une réponse adaptative aux situations de stress (carence alimentaire, hypoxie, stress oxydant, etc.) et permettait de fournir des nutriments et de l'énergie à l'organisme en dégradant les principales réserves énergétiques de la cellule comme le glycogène, les gouttelettes lipidiques ou encore les protéines (Komatsu et al., 2005; Yang and Klionsky, 2010).

Il existe trois types d'autophagie qui diffèrent suivant les mécanismes impliqués pour délivrer le matériel à dégrader aux lysosomes : la microautophagie, l'autophagie médiée par les protéines chaperones (plus communément appelée CMA pour Chaperone-Mediated Autophagy), et la macroautophagie (Boya et al., 2013) (Figure 18). Lors de la microautophagie, des invaginations de la membrane lysosomale permettent de séquestrer directement les substrats à dégrader (Boya et al., 2013). Au court de la CMA, les protéines possédant un domaine KFERQ sont reconnues par la protéine chaperone Hsc70 (ou HSPA8), puis adressées à la membrane lysosomale via une interaction avec la protéine lysosomale Lamp2A. Les substrats vont alors être internalisés dans le lysosome afin d'y être dégradés (Boya et al., 2013; Cuervo and Wong, 2014; Parzych and Klionsky, 2014). La macroautophagie quant à elle se différencie de la microautophagie et de la CMA par l'implication d'une vésicule à double membrane qui va transporter le matériel à dégrader aux lysosomes (Parzych and Klionsky, 2014). Dans ce manuscrit nous nous intéresserons seulement à cette dernière forme d'autophagie, dont le rôle dans la dégradation des mitochondries à fait l'objet de nombreuses études.

B) La macroautophagie

Au cours de la macroautophagie, une partie du cytoplasme contenant le matériel cellulaire à dégrader est entourée par une membrane unique que l'on appelle « phagophore » ou membrane d'isolation. Ce phagophore croît et s'allonge jusqu'à se refermer sur lui-même et former une vésicule à double membrane, nommée autophagosome. Les autophagosomes utilisent les dynéines afin de se mouvoir le long des microtubules jusqu'à atteindre le centre organisateur des microtubules, qui est riche en lysosomes. Ensuite, les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes pour former des autolysosomes (Figure 19). A l'intérieur de ces autolysosomes, les différents constituants cellulaires séquestrés sont dégradés via les hydrolases lysosomales et relargués dans le cytoplasme afin d'être réutilisé par la cellule (Figure 19). La macroautophagie se déroule en 5 étapes distinctes : la phase d'initiation, la nucléation, l'élongation, la fusion et la terminaison (Figure 19). Nous en donnons ici les grandes lignes :

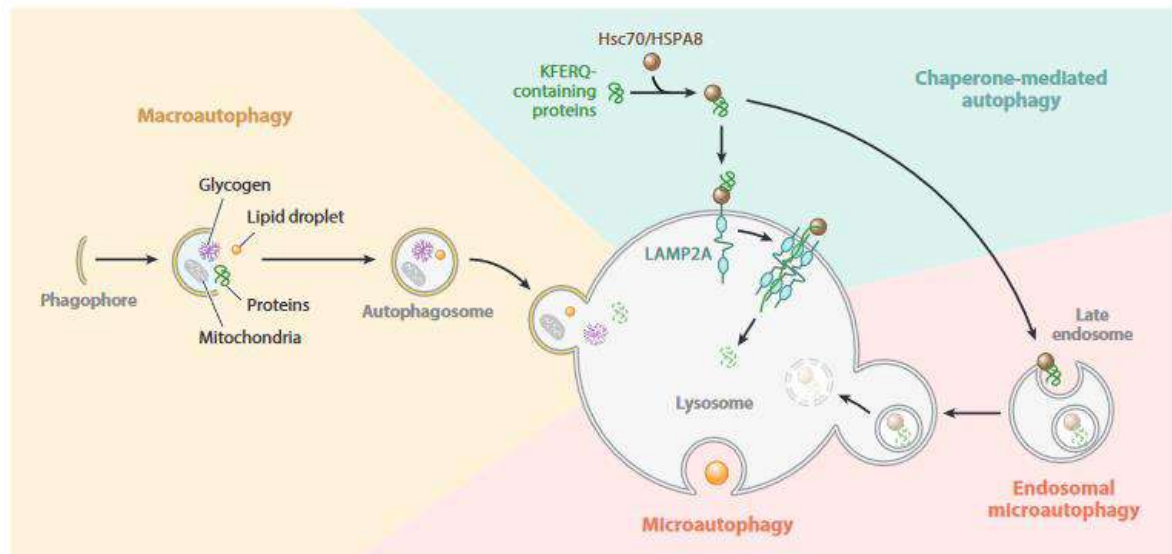


Figure 18 : Illustration des différentes formes d'autophagie: la macroautophagie, l'autophagie médiée par les chaperones (CMA) et la microautophagie (y compris la microautophagie endosomale) (adapté de Panserat et al., 2019). Lors de la macroautophagie, les composants intracellulaires à dégrader sont séquestrés par des organites à double membrane appelés autophagosomes qui fusionnent ensuite avec les lysosomes. Au cours de la CMA, les protéines cytosoliques portant un motif de type KFERQ se lient à Hsc70 et sont transloquées dans les lysosomes selon un mécanisme dépendant de LAMP2A. Au cours de la microautophagie, les entités cytoplasmiques destinées à la dégradation sont absorbées par le lysosome par invagination membranaire directe. Au cours de la microautophagie endosomale, le complexe formé entre Hsc70 et la protéine à dégrader est dirigé vers la membrane endosomale pour être ensuite internalisé dans des corps multivésiculaires, les endosomes, qui fusionnent ensuite avec les lysosomes pour permettre une dégradation de leur contenu.

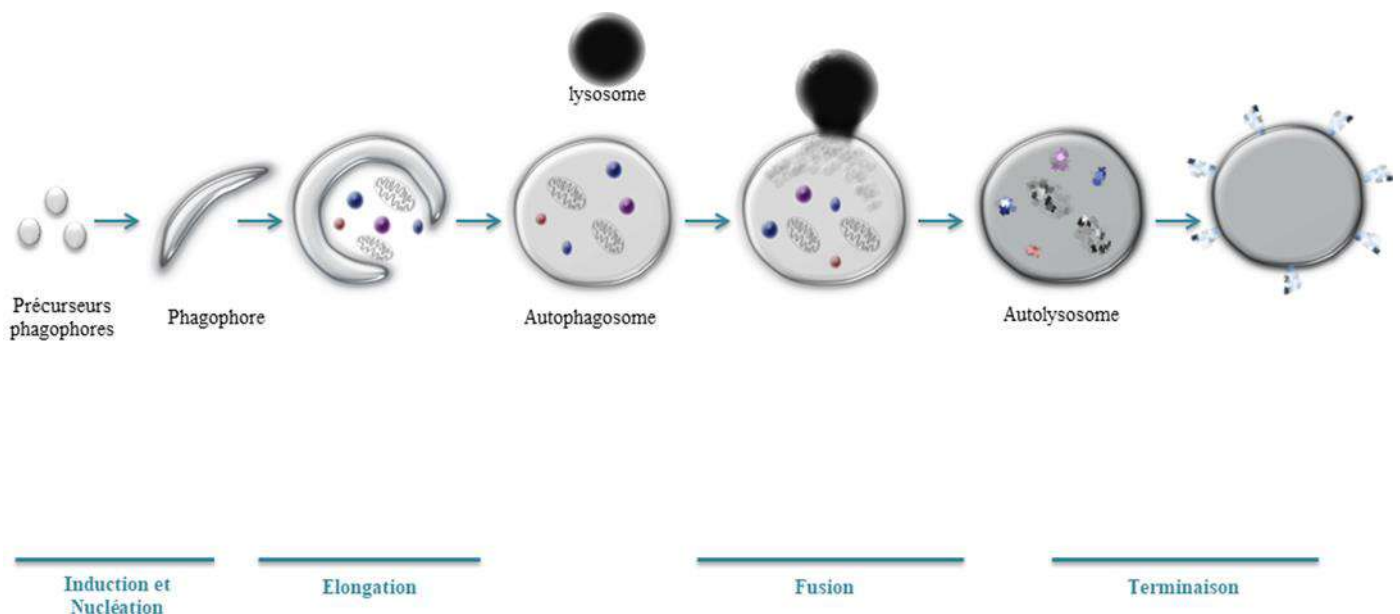


Figure 19: Représentation schématique de la macroautophagie

Phase d'initiation

La phase d'initiation fait intervenir le complexe ULK qui est composé de plusieurs protéines, dont ULK1 (UNC-51-like Ser/Thr kinase), Atg13, FIP200 (FAK (Focal adhesion kinase) family Interacting Protein of 200 kD) et Atg101 (Figure 20). En situation basale, le complexe ULK est lié au complexe mTORC1, le rendant inactif. En revanche, en situation catabolique, le complexe mTORC1 est inhibé et se dissocie du complexe ULK, entraînant l'activation d'ULK1. Une fois actif, ULK1 va phosphoryler les autres protéines du complexe ULK, permettant ainsi le recrutement de diverses protéines essentielles à la formation de l'autophagosome (notamment le complexe protéique PI3K (phosphoInositide-3-kinase) de classe III) (Parzych and Klionsky, 2014) (Figure 20) au niveau du site d'assemblage du phagophore (PAS).

Phase de nucléation

La nucléation de la membrane du phagophore est un processus complexe, et les mécanismes impliqués ne sont pas encore complètement compris. Selon les connaissances actuelles, au cours de cette phase, le complexe PI3K composé de Beclin-1 (orthologue d'Atg6 chez les mammifères), Atg14 (appelée aussi Barkor), Vps34 (vacuolar protein sorting 34) et Vps15 (vacuolar protein sorting 15) induit la production de Phosphatidylinositol 3 phosphate (PI3P) au niveau du phagophore. Cela, permet la formation d'un omégasome (Dikic and Elazar, 2018), qui constitue une plateforme de recrutement d'autres protéines tel que DFCP1 (double FYVE-containing protein 1) et WIPI (WD repeat domain phosphoinositide-interacting) (Figure 20).

Phase d'élongation

Au cours de la phase d'élongation, WIPI permet le recrutement du complexe Atg5-Atg12-Atg16l qui fonctionne comme une enzyme E3 ligase et permet d'initier la lipudation des protéines de la famille des Atg8 telles que LC3 (Dikic and Elazar, 2018) (Figure 20). La lipudation des protéines de la famille Atg8 permet leur recrutement sur la membrane du phagophore et ainsi son élongation et sa fermeture afin de former un autophagosome. Ces protéines permettent aussi de lier différents récepteurs autophagiques tels que p62

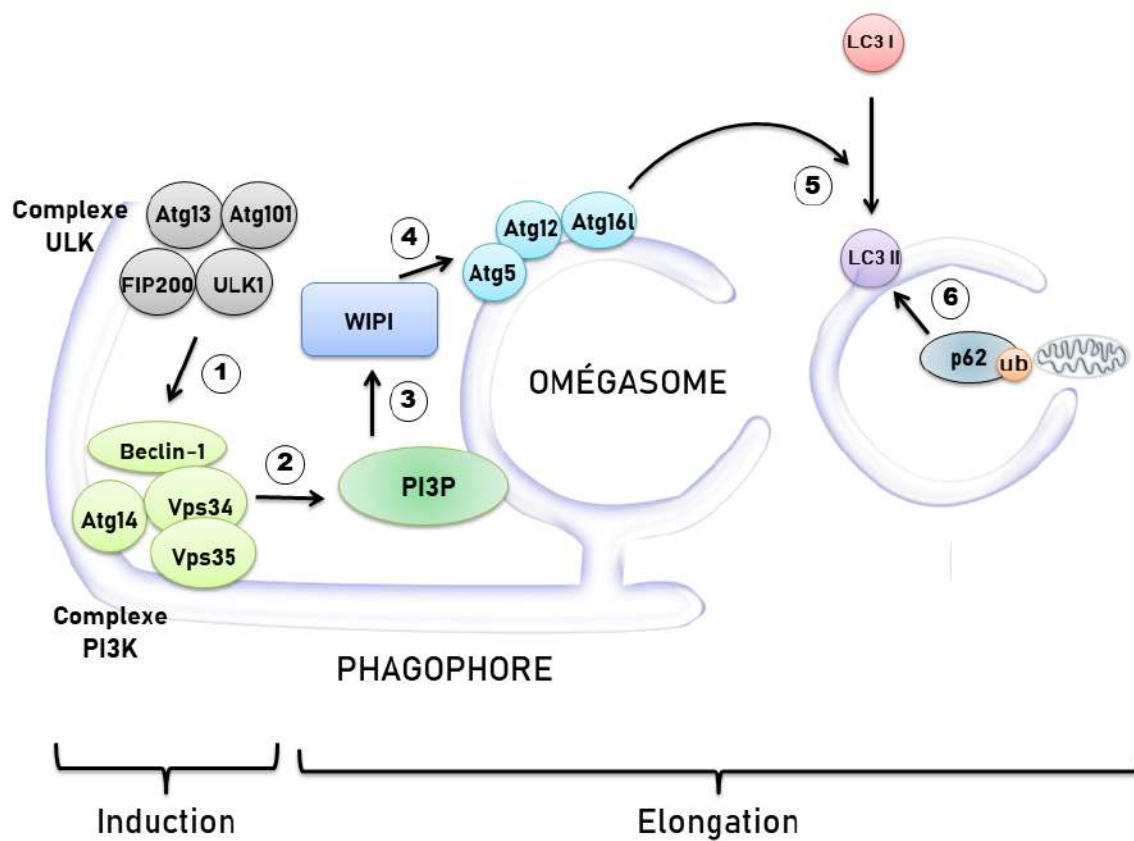


Figure 20: Représentation schématique des différentes étapes d'initiation, de nucléation et d'élongation des autophagosomes. FIP200, FAK (Focal adhesion kinase) family Interacting Protein of 200 kD; PI3K, phosphoinositide-3-kinase; p62, Sequestosome 1; PI3P, Phosphatidylinositol 3 phosphate; ub, ubiquitin; ULK1, UNC-51-like Ser/Thr kinase, Vps34, vacuolar protein sorting 34; Vps35, vacuolar protein sorting 35; WIPI, WD repeat domain phosphoinositide-interacting.

(Séquestosome 1) afin de permettre la séquestration et la dégradation de substrats associés (Figure20).

Les phases fusion et de terminaison

Une fois l'autophagosome formé, celui-ci va être redirigé vers le centre organisateur des microtubules, où se trouvent les lysosomes. L'étape de fusion des autophagosomes avec les lysosomes nécessite l'intervention de plusieurs protéines, notamment Rubicon (RUN domain and cystein-rich domain containing, Beclin-1-interacting protein), UVRAG (UV irradiation resistance-associated gene) et certaines protéines ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) et SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptor) impliquées dans la maturation et le trafic endolysosomal (Gurkan et al., 2007; Liang et al., 2008; Matsunaga et al., 2009; Rusten and Stenmark, 2009). La fusion entre les autophagosomes et les lysosomes requiert l'acidification de cette dernière qui est assurée par l'import de protons dans la lumière lysosomale grâce à une pompe à proton appelée V-type H⁺ ATPase Complex (Forgac, 2007). Enfin, après la formation de l'autolysosome, qui résulte de la fusion du lysosome et de l'autophagosome, les hydrolases acides vont dégrader la membrane interne de l'autolysosome ainsi que les différents constituants séquestrés.

Durant de nombreuses années, l'autophagie a été considérée comme un mécanisme de dégradation aléatoire des composants cytosoliques en condition de jeûne. Néanmoins, la découverte et la caractérisation de nombreux récepteurs autophagiques capables de reconnaître spécifiquement des organites ou macromolécules tels que les peroxysomes, le glycogène, les gouttelettes lipidiques ou encore les mitochondries ont permis d'accélérer notre compréhension de l'autophagie dite « sélective » (Stolz et al., 2014). Dans ce manuscrit nous nous intéresserons particulièrement à la dégradation spécifique des mitochondries appelée « mitophagie ».

C) La mitophagie ou la dégradation spécifique des mitochondries par autophagie :

La dégradation spécifique des mitochondries par autophagie a été démontrée pour la première fois chez la levure en 2004 (Kissová et al., 2004). Cette étude a mis en évidence, qu'en situation de carence nutritive, des levures dépourvues d'Uth1p (une protéine présente sur la membrane externe mitochondriale) étaient capables de faire de l'autophagie, mais en revanche, n'étaient plus capables de dégrader leurs mitochondries par autophagie. C'est en

2005 que Lemaster a proposé le terme de mitophagie pour désigner la dégradation spécifique des mitochondries par autophagie (Lemasters, 2005).

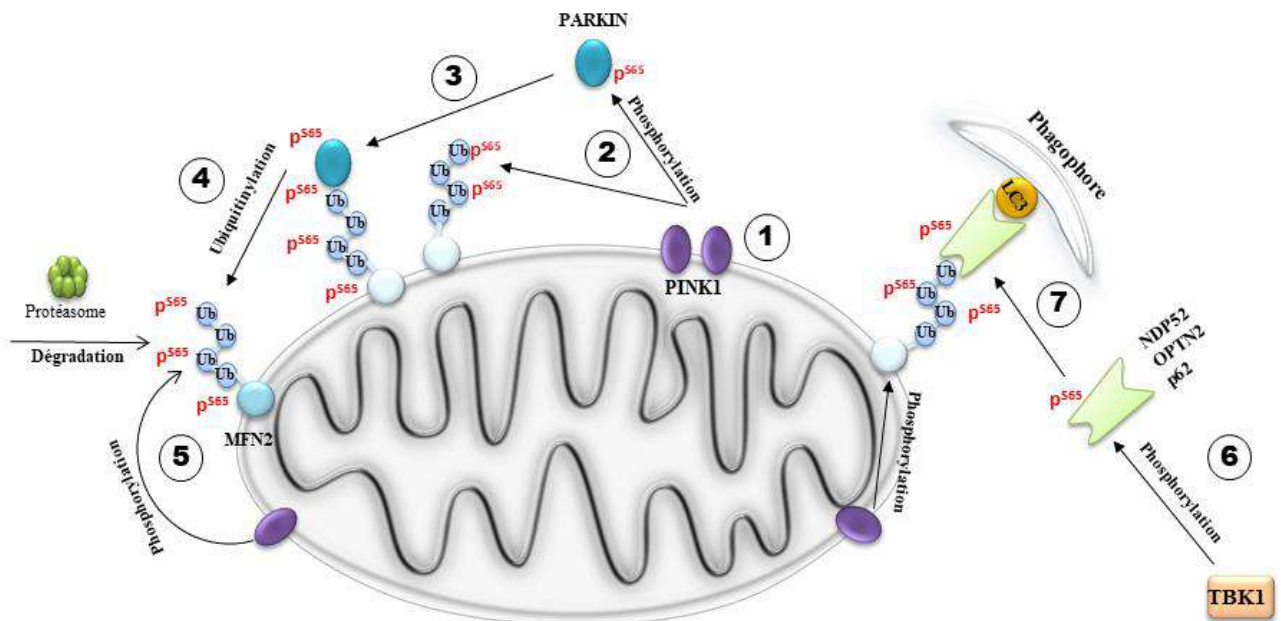
Ces dernières années, la mitophagie a fait l'objet de nombreuses études portant sur les mécanismes de son activation ainsi que sur son rôle cellulaire, physiologique et physiopathologique. La mitophagie permet de contrôler la qualité et la quantité des mitochondries, en éliminant les mitochondries endommagées et surnuméraires. Par exemple, dans les tissus adultes de souris, les cellules souches ont une faible activité métabolique et ont besoin de peu d'énergie. Elles utilisent préférentiellement la glycolyse afin de synthétiser de l'ATP. Elles contiennent donc peu de mitochondries, et afin de maintenir leur état de quiescence, elles répriment continuellement le métabolisme oxydatif et éliminent les mitochondries par mitophagie (Gustafsson and Dorn, 2018; Ho et al., 2017).

L'induction de la mitophagie repose sur une coordination spatio-temporelle de deux événements distincts. Premièrement, les mitochondries endommagées ou superflues sont identifiées et marquées afin d'être dégradées. Deuxièmement, les autophagosomes, qui sont nécessaires à la séquestration et au transport des mitochondries vers les lysosomes, sont synthétisées (Gustafsson and Dorn, 2018). La reconnaissance des mitochondries à dégrader peut s'effectuer au moins de deux manières distinctes. La première, dépendante du couple PINK1/PARKIN, repose sur l'ubiquitylation de certaines protéines de la membrane externe mitochondriale, qui seront ensuite reconnues par des récepteurs spécifiques de la mitophagie. Ces récepteurs se lient simultanément à la chaîne ubiquitine et à la protéine LC3, située au niveau du phagophore, et permettent ainsi le recrutement et la séquestration des mitochondries par l'autophagosome. La seconde, est indépendante du couple PINK1/PARKIN. En effet, LC3 est également capable de reconnaître directement certains récepteurs ancrés dans la membrane externe mitochondriale (Figure 21).

La Mitophagie dépendante du couple PINK1/PARKIN

De nombreuses recherches, se sont concentrées sur les différents acteurs moléculaires et étapes du processus de mitophagie via la voie PINK1/PARKIN. En condition basale, la protéine PINK1, qui est une sérine/thréonine kinase, est importée dans les mitochondries grâce à deux complexes protéiques TOM et TIM. Elle y subit un clivage protéolytique par la protéine matricielle MPP (matrix processing peptidase) et la protéine de la membrane mitochondriale interne PARL (protease PINK1/PGAM5- associated rhomboid-like protease) (Jin et al., 2010; Meissner et al., 2011; Pickles et al., 2018). Une fois clivée, PINK1 est alors redirigée vers le protéasome afin d'être dégradée (Yamano and Youle, 2013).

MITOPHAGIE DÉPENDANTE DE PINK1/PARKIN



MITOPHAGIE INDÉPENDANTE DE PINK1/PARKIN

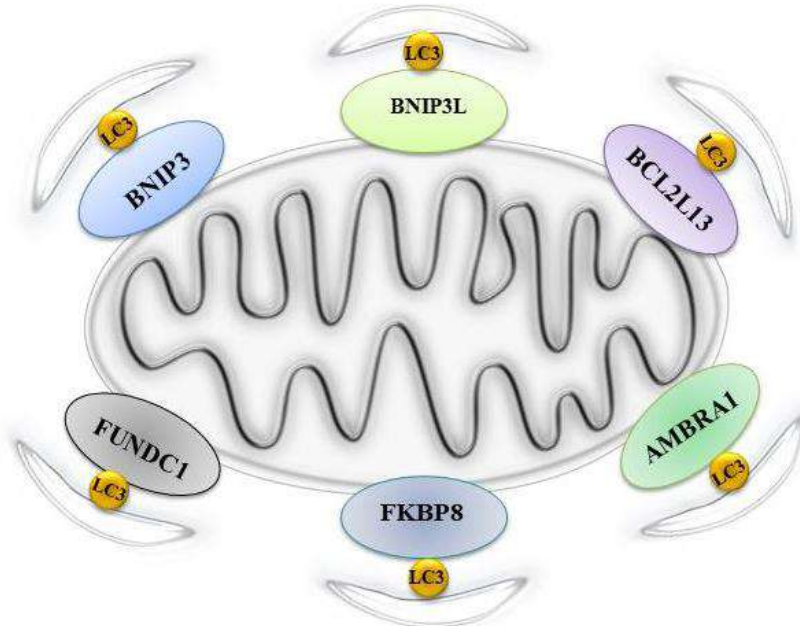


Figure 21: dégradation des mitochondries par mitophagie. La mitophagie dépendante de PINK1 et Parkin résulte de la phosphorylation et l'ubiquitinylation (étape 1 à 6) des protéines présentes sur la membrane externe mitochondriale qui seront par la suite soit dégradée par le protéasome (étape 6) soit reconnues par des protéines adaptatrice capables d'interagir avec la protéine LC3 fixées sur la membrane du phagophore (étape 7 à 8). En revanche la mitophagie indépendante de PINK1/PARKIN permet de recrutement des mitochondries par le phagophore directement grâce à des récepteurs présent sur la membrane externe mitochondriale

En revanche, en cas de stress ou de dommages mitochondriaux, tels que la perte du potentiel membranaire mitochondrial, l'importation de PINK1 dans les mitochondries est compromise. PINK1 ne peut plus être clivée, et est alors stabilisée sur la membrane externe mitochondriale (Figure 21 étape 1). Une fois stabilisée sur la membrane externe, PINK1 va pouvoir phosphoryler en sérine 65, les protéines polyubiquitylées préexistantes à la surface mitochondriale ainsi que la protéine E3 ubiquitin ligase, PARKIN (Figure 21, étape 2). Suite à cette phosphorylation, PARKIN subit un changement de conformation lui permettant de se lier aux protéines ubiquitylées sur la membrane mitochondriale et également d'être activée (Figure 21, étape 3). Une fois activée, PARKIN va permettre l'ubiquitylation de plusieurs substrats protéiques tels que MFN2, fournissant ainsi de nouveau substrat à PINK1 (Figure 21, étapes 4 et 5). Le rôle de PARKIN est donc d'amplifier le signal d'induction de la mitophagie (Pickles et al., 2018; Vigié and Camougrand, 2017). Par la suite, les protéines ubiquitylées seront soit directement dégradées par le protéasome (telles que mfn2) soit reconnues par des protéines ayant une affinité avec l'ubiquitine telles que OPTN (Optineurin), NDP52 (nuclear domain 10 protein 52) ou p62 (Heo et al., 2015; Husnjak et al., 2008; Tanaka et al., 2010). Ces protéines possèdent toutes un domaine LIR (LC3-interacting region) leur permettant ainsi d'adresser les mitochondries vers l'autophagosome afin qu'elles soient dégradées (Gustafsson and Dorn, 2018; Vigié and Camougrand, 2017).

Récemment il a été démontré que la mitophagie pouvait être induite uniquement grâce à PINK1 et la protéine kinase TBK1 (TANK-binding kinase 1) (Lazarou et al., 2015). En situation de dommage mitochondrial, TBK1 est activée par phosphorylation en sérine 172. Une fois activée, TBK1 va phosphoryler les protéines OPTN, NDP52 et p62, augmentant ainsi leur affinité avec les ubiquitines, et donc permettre une amplification du recrutement de ces récepteurs (Figure 21, étapes 6 et 7). Ainsi PARKIN et TBK1 initient deux boucles d'amplifications de la mitophagie (Figure 21).

Mitophagie indépendante de PINK1/PARKIN

Il existe également, des récepteurs indépendants de la voie PINK1/PARKIN ancrés dans la membrane externe mitochondriale. Ces récepteurs possèdent tous un domaine LIR leur permettant d'être reconnus directement par LC3 (Figure 21). Parmi ces récepteurs, les plus étudiés sont BNIP3 (BCL2 and adenovirus E1B 19-kDa interacting protein 3) et son homologue BNIP3-like (BNIP3L connue aussi sous le nom de NIX), FUNDC1 (FUN14 Domain Containing 1) et BCL2L13 (BCL2 like 13). BNIP3 et BNIP3L sont des protéines qui ont été initialement étudiées pour leur rôle dans l'apoptose. Toutefois, plus récemment, des

études ont démontré qu'elles étaient aussi impliquées dans la mitophagie en tant que récepteurs (Gustafsson and Dorn, 2018; Vigié and Camougrand, 2017; Yuan et al., 2017; Zhang and Ney, 2009). Suivant le degré du stress cellulaire, BNIP3 et BNIP3L vont soit induire la mitophagie soit induire l'apoptose. Si le stress est trop important et que leur capacité d'élimination des mitochondries est insuffisante, ces deux récepteurs vont induire l'apoptose.

FUNDC1 est un récepteur mitophagique, qui est régulé par phosphorylation. En situation basale, FUNDC1 est phosphorylé au niveau de sa tyrosine 18 et serine 13 par les kinases Src et CK2 (casein kinase 2) respectivement (Gustafsson and Dorn, 2018; Vigié and Camougrand, 2017). En revanche, en situation hypoxique ou lors d'une baisse du potentiel membranaire des mitochondries, PGAM5 permet de déphosphoryler FUNDC1, qui pourra alors interagir avec LC3 afin d'induire la mitophagie (Chen et al., 2014; Gustafsson and Dorn, 2018). FUNDC1 peut être aussi phosphorylé par ULK1 au niveau de sa serine 17 améliorant ainsi son interaction avec LC3 (Wu et al., 2014).

BCL2L13, comme BNIP3 et BNIP3L, est un récepteur mitophagique qui joue également un rôle dans l'apoptose. Lorsque BCL2L13 est surexprimé il permet l'activation des caspases 3 et le relargage des cytochromes nécessaires à l'apoptose.

Au cours de ces dernières années, plusieurs autres récepteurs mitophagiques ont été identifiés tels que AMBRA1 ou FKBP8. Le domaine de la mitophagie est en pleine expansion et les mécanismes d'action de ces récepteurs commencent à être élucidés et laissent apercevoir de nombreuses interactions complexes impliqués dans l'homéostasie mitochondriale (Gustafsson and Dorn, 2018).

Dans cette section 2.2, nous avons démontré que les mitochondries sont des organites extrêmement dynamiques qui sont capables de s'adapter à de nombreuses conditions environnementales grâce à divers mécanismes (biosynthèse, dégradation, fusion et fission). Ces adaptations sont primordiales pour maintenir l'homéostasie cellulaire. En effet, en plus de jouer un rôle clé dans la synthèse d'énergie pour les cellules, les mitochondries travaillent également en étroite collaboration avec divers systèmes cellulaires primordiaux. Maintenir leur intégrité est donc essentiel pour la survie cellulaire.

2.3 Les mitochondries et leurs implications dans différents systèmes cellulaires primordiaux

Chez les eucaryotes, les mitochondries sont souvent décrites comme le « moteur » de la cellule. Outre leurs rôles dans la production d'ATP, les mitochondries abritent également de nombreuses réactions biochimiques essentielles et ainsi se retrouvent à l'intersection de multiples systèmes cellulaires primordiaux, notamment le métabolisme intermédiaire, le statut oxydant, la dynamique du calcium et l'apoptose via son interaction avec le réticulum endoplasmique.

2.3.1 Les mitochondries et le métabolisme intermédiaire

Le cycle de Krebs est la dernière voie de l'oxydation commune des lipides, des glucides et des acides aminés. En effet, le catabolisme de ces différentes molécules permet d'alimenter le cycle de Krebs en Acétyl-CoA et *in fine* de fournir les substrats nécessaires à la chaîne respiratoire (cf. parties 2.1.2 et 2.1.3). Chez les organismes aérobies, le cycle de Krebs est aussi considéré comme une voie amphibolique, c'est-à-dire, qu'elle participe à la fois aux processus cataboliques (production d'Acétyl-CoA via la dégradation du glucose, des lipides et des acides aminés) mais aussi anaboliques. En effet, les produits formés au cours du cycle de Krebs peuvent aussi servir de substrats pour la néoglucogenèse, la lipogenèse et la synthèse de certains acides aminés tels que le glutamate et l'aspartate. Au cours de cette partie nous nous intéresserons particulièrement à l'interaction du cycle de Krebs avec le métabolisme glucidique et lipidique.

A) Le métabolisme glucidique

La glycolyse aussi appelée voie d'Embden Meyerhof, est la seule voie catabolique capable de dégrader le glucose chez tous les organismes. Il existe deux types de glycolyse, la glycolyse anaérobie qui permet de former deux molécules d'ATP et la glycolyse aérobie qui permet de former du pyruvate. Au cours de la glycolyse aérobie, le glucose est progressivement dégradé afin de former du pyruvate qui sera par la suite décarboxylé en Acétyl CoA, nécessaire au fonctionnement du cycle de Krebs. Cette voie métabolique, conservée au cours de l'évolution, se déroule en plusieurs étapes. Brièvement, lorsque le glucose entre dans la cellule via des transporteurs il est phosphorylé par une hexokinase (ou glucokinase (GK) dans le foie) et forme du glucose-6-phosphate (G6P). Celui-ci est ensuite

isomérisé en fructose-6-phosphate (F6P) grâce au phosphoglucisomérase (PGI) puis phosphorylé en fructose 1,6 biphosphate (F1,6BP) par le 6-phosphofructo-1-kinase (6PF1K). Par la suite, l'aldolase permet de catalyser le clivage de F1,6BP en glycéraldéhyde-3P (3PG) qui, par une succession de réactions enzymatiques, va donner du phosphoénolpyruvate (PEP). Le PEP sera à son tour transformé en pyruvate grâce à la pyruvate kinase. Ce pyruvate sera transféré dans les mitochondries afin que la pyruvate déshydrogénase, qui relie la glycolyse au cycle de Krebs, catalyse la décarboxylation et l'oxydation du pyruvate en Acétyl-CoA (Figure 22).

Le cycle de Krebs permet également de fournir des substrats à la néoglucogénèse. En effet, en situation de jeûne, la voie de la néoglucogénèse permet aux cellules de synthétiser du glucose à partir de précurseurs comme le pyruvate, le lactate, le glycérol ou la glutamine. Quatre enzymes clés sont impliquées dans la néoglucogénèse : la pyruvate carboxylase (PC), la phosphoénolpyruvate carboxylase (PCK), la fructose-1-6 biphosphatase (FBPase) et la glucose-6-phosphatase (G6Pase). La PCK, qui catalyse la première réaction de la néoglucogénèse, existe sous deux isoformes : PCK1 (cytosolique) et PCK2 (mitochondrial). L'activité de ces enzymes est régulée par le niveau d'ATP cellulaire. En situation de carence énergétique (diminution du rapport ATP/ADP), l'oxaloacétate sera préférentiellement dirigé vers le cycle de Krebs (Dashty, 2013). En revanche, dans la situation inverse, l'oxaloacétate intervient dans la néoglucogénèse par différents circuits. La formation de PEP à partir d'oxaloacétate dans les mitochondries via la PCK2 est la voie la plus directe (voie PCK-M). Une fois formé, le PEP est exporté directement dans le cytosol afin de former du glucose (Figure 22). Il existe également d'autres voies qui permettent de synthétiser de l'oxaloacétate à partir de PEP dans le cytosol. Cependant, étant donné que l'oxaloacétate n'a pas de transporteur, il doit être au préalable, soit transaminé en aspartate (voie PCK-C/ aspartate) soit réduit en malate (voie PCK-C/ malate) dans la mitochondrie (Figure 22). Le malate et l'aspartate ainsi formés, sont alors transférés dans le cytosol et retransformés en oxaloacétate. Enfin, la PCK1 permet de catalyser la formation de PEP à partir d'oxaloacétate. Ces deux voies nécessitent l'intervention de nombreuses enzymes et consomment davantage d'énergie par rapport à la voie PCK-M (Stark and Kibbey, 2014). Une fois le PEP formé il est catalysé en 3PG puis en F1,6BP et enfin en F6P grâce à la FBPase. Finalement, la G6Pase permet de catalyser la transformation du G6P en glucose (Figure 22).

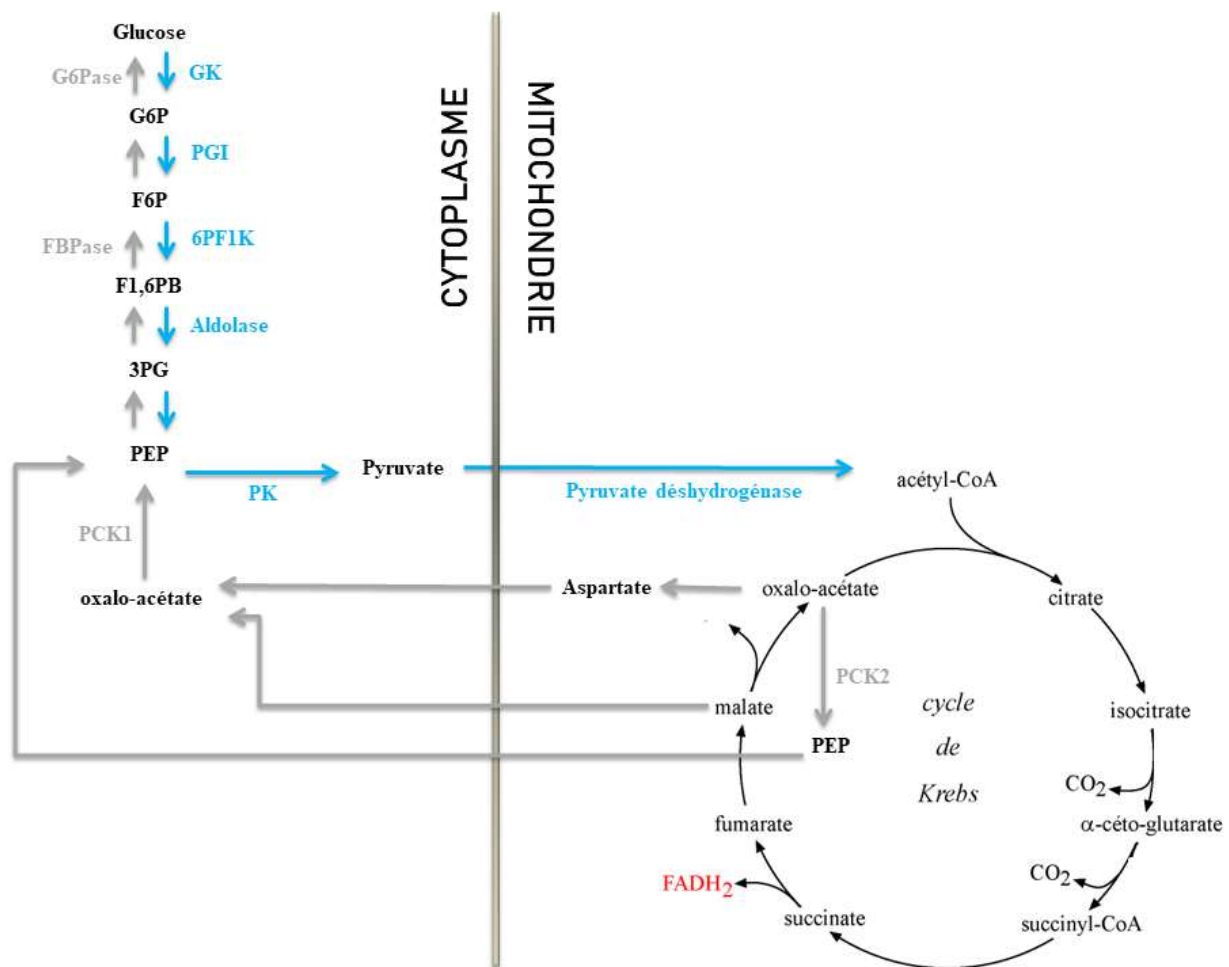


Figure 22: Représentation schématique de la relation entre les mitochondries et le métabolisme glucidique. Les flèches en bleu représentent les réactions qui ont lieu durant la glycolyse et les flèches grises représentent les réactions qui ont lieu durant la néoglucogénèse. 3-PG, glycéraldéhyde-3P; 6PF1K, 6-phosphofructo-1-kinase; F1,6BP, en fructose 1,6 biphosphate; F6P : fructose-6-phosphate; FBPase, fructose-1-6 biphosphate; G6P, glucose-6-phosphate; G6Pase, glucose-6-phosphatase; GK, glucokinase; PCK1, phosphoénolpyruvate carboxylase cytosolique; PCK2, phosphoénolpyruvate carboxylase mitochondrial; PEP, phosphoénolpyruvate; PGI, phosphoglucoisomérase; PK, pyruvate kinase

B) Le métabolisme lipidique

L'oxydation des acides gras, aussi connue sous le nom de β -oxydation des acides gras, permet, tout comme la glycolyse, la synthèse d'acétyl-CoA. Bien que la β -oxydation puisse avoir lieu dans les peroxysomes, elle se déroule principalement dans la matrice mitochondriale. Ce processus consiste en une succession de réactions enzymatiques durant lesquelles les acides gras sont catabolisés progressivement en molécules d'acétyl-CoA. Brièvement, la β -oxydation peut être divisée en trois principales étapes : (1) les acides gras libres à longue chaîne doivent tout d'abord être transformés en acyl-CoA afin d'être transportés dans les mitochondries, (2) les acyl-CoA sont ensuite catabolisés en acétyl-CoA et (3) l'acétyl-CoA formé est oxydé au cours du cycle de Krebs. Au cours de la première étape, se déroulant dans le cytoplasme à proximité de la membrane externe mitochondriale, l'acyl CoA synthase permet aux acides gras à longue chaîne de se lier aux coenzymes afin de former de l'acyl-CoA. Les acyl-CoA à chaîne courte et moyenne (de 1 à 12 carbones au maximum) peuvent traverser les membranes externes et internes mitochondriales par simple diffusion. En revanche les acyl-CoA à longue chaîne (>20 carbones) ont besoin d'un système de transport pour passer la membrane interne mitochondriale. Trois protéines sont indispensables à ce transport, la carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) localisée au niveau de la membrane externe, la carnitine/acylcarnitine translocase (CACT) et la carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2) toutes deux situées au niveau de la membrane interne. La CPT1 catalyse le transfert du groupement acyl des acyl CoA vers la carnitine, formant ainsi l'acylcarnitine. L'acylcarnitine est ensuite pris en charge par la CACT afin de passer la barrière de la membrane interne mitochondriale, puis, la CPT2 catalyse la reconversion des acylcarnitines en Acyl-CoA (Tonazzi et al., 2013; Violante et al., 2010) (Figure 23). Une fois à l'intérieur de la matrice, l'Acyl-CoA va subir quatre réactions enzymatiques cycliques qui vont aboutir à la formation d'acétyl-CoA. Quatre enzymes interviennent dans ce processus : l'acétyl-CoA déshydrogénase, l'enoyl-CoA hydratase, l'hydroxyacyl-CoA déshydrogénase, la β -cétoacyl-CoA thiolase. A chaque cycle d'oxydation, un acyl-CoA permet de former une molécule d'acétyl-CoA, une molécule de FADH_2 , et une molécule de NADH. Une fois que chaque acyl-CoA de la chaîne aliphatique est dégradé en molécule Acétyl-CoA, celui-ci peut être pris en charge par le cycle de Krebs (Figure 23).

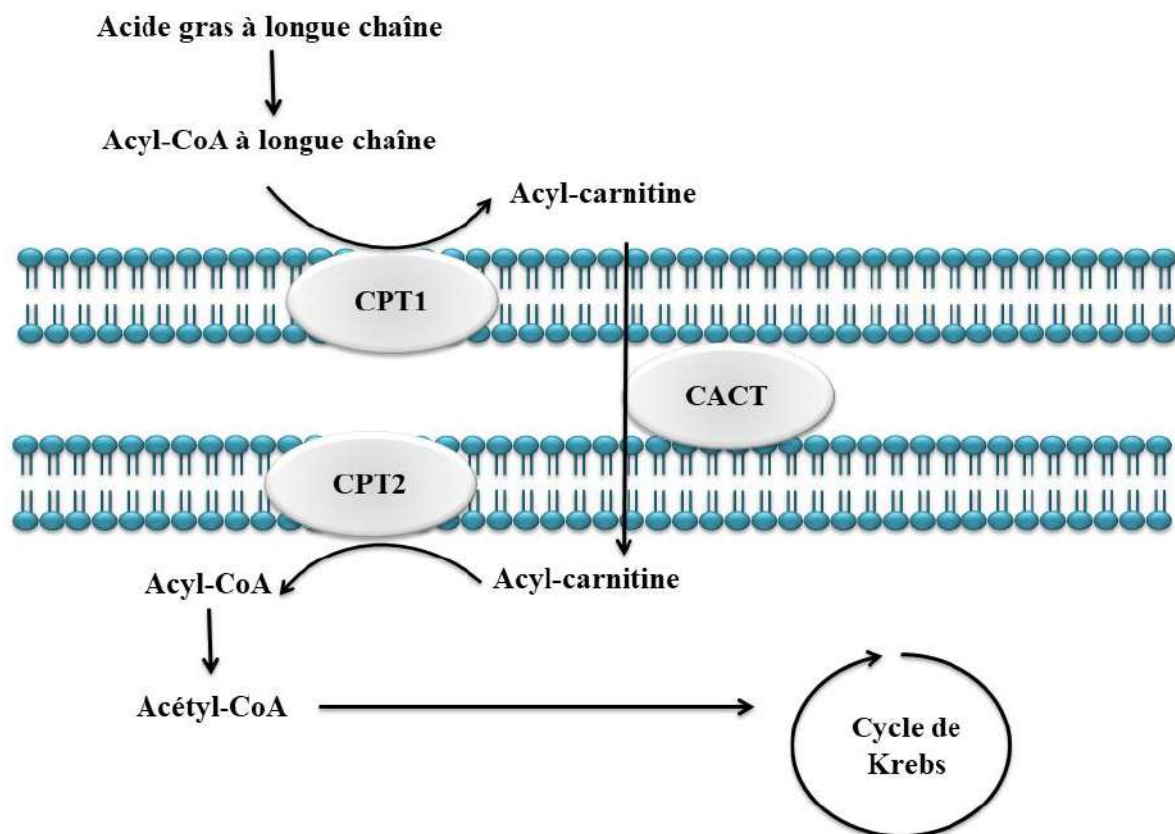


Figure 23: Relation entre la β -oxydation et cycle de krebs. CACT, carnitine/acylcarnitine translocase ; CPT1, carnitinepalmitoyltransferase 1; CPT2, carnitinepalmitoyltransferase 2

Au cours du cycle de Krebs, lorsque l'énergie cellulaire est en excès, le citrate formé (cf. 2.1.2) est exporté des mitochondries vers le cytoplasme afin d'être utilisé pour la lipogénèse (Ferramosca and Zara, 2014). L'exportation du citrate nécessite la présence du transporteur SLC25A1 localisé au niveau de la membrane interne mitochondriale. Ce transporteur catalyse la sortie du citrate/isocitrate des mitochondries en échange de l'entrée du malate cytosolique (Palmieri, 2004). Le citrate peut alors diffuser passivement à travers la membrane externe mitochondriale. Une fois dans le cytoplasme, le citrate est transformé en oxaloacétate et acétyl-CoA grâce à l'ATP citrate lyase (ACLY), puis en malonyl-CoA par la acétyl-CoA carboxylase (ACC) (Figure 24). La FAS (fatty acid synthase) est la principale enzyme de la lipogénèse qui permet la synthèse d'acide gras saturé à 16 carbones, le palmitate. Plus précisément, elle permet de condenser une molécule de malonyl-CoA avec de l'acétyl-CoA. Le produit formé va ensuite subir une succession de réactions (décarboxylation, réduction, déshydratation et réduction) pour former au final un acide gras à 4 carbones nommé butyryl. Elle permet également l'allongement de la chaîne hydrocarbonée par ajouts séquentiels de malonyl CoA.

C) Dysfonctionnement mitochondrial et métabolisme intermédiaire

Etant donné l'étroite collaboration entre le métabolisme intermédiaire et les mitochondries, il n'est pas surprenant qu'un dysfonctionnement mitochondrial puisse engendrer de fortes perturbations au niveau du métabolisme intermédiaire. En ce sens, de plus en plus d'études suggèrent que la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD, Nonalcoholic fatty liver disease), qui se caractérise par une accumulation de lipides dans le foie, pourrait être due à un dysfonctionnement des mitochondries hépatiques (Begrache et al., 2006; Caldwell et al., 1999; Ibdah et al., 2005; Pessayre, 2007; Pessayre and Fromenty, 2005; Sanyal et al., 2001; Sobaniec-Lotowska and Lebensztejn, 2003; Wei et al., 2008). Dans certains cas, la NAFLD proviendrait d'une mauvaise adaptation des mitochondries à la surcharge en substrats apportés par l'alimentation (Cusi, 2016; Koliaki et al., 2015; Patterson et al., 2016). En effet, les mitochondries, adaptent en permanence leur métabolisme afin de maintenir une homéostasie cellulaire adéquate (en diminuant leur activité ou en l'augmentant). Cependant dans certains cas d'obésité, l'adaptation des mitochondries à la surcharge nutritive ne serait pas suffisante pour éliminer l'ensemble de ces nutriments apportés par l'alimentation et conduirait à une NAFLD. Une étude récente suggère que la forte quantité de lipides consommés pourrait entraîner une augmentation de l'activité mitochondriale, qui en retour, pourrait favoriser une

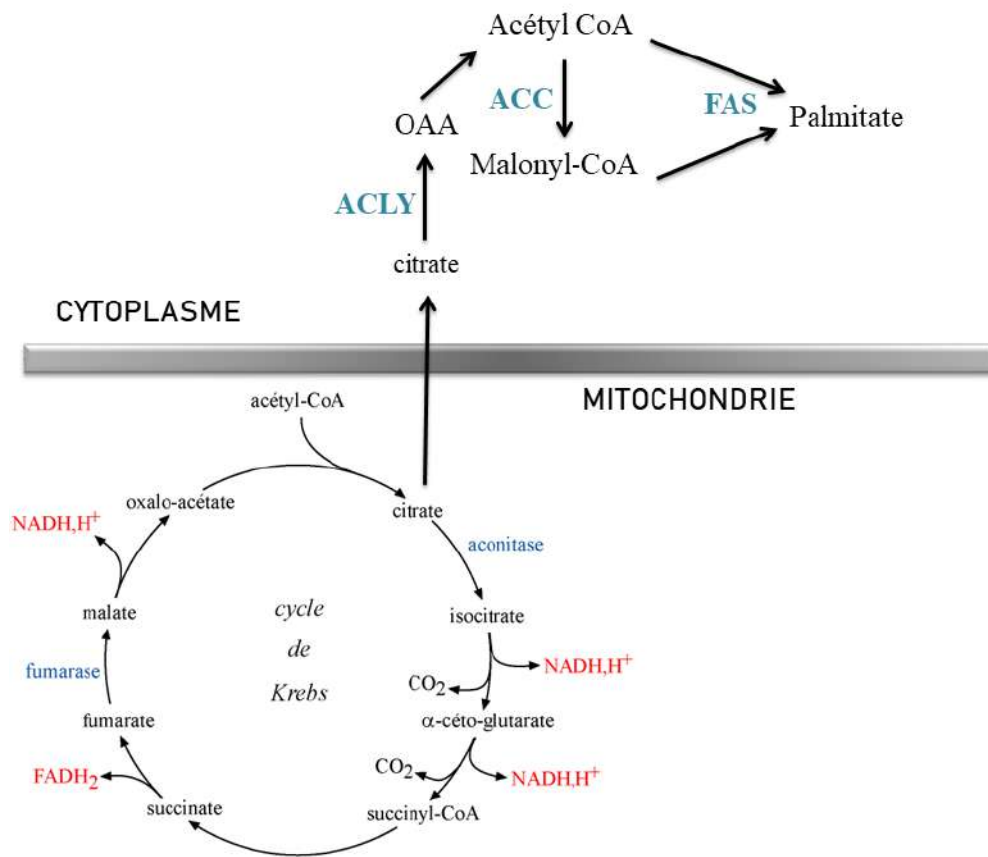


Figure 24 : Lipogénèse et cycle de Krebs. ACC, acétyl-CoA carboxylase ; ACLY, l'ATP citrate lyase ; FAS, Fatty acid synthase ; OAA, oxalo-acétate

augmentation de la production de ROS et des dommages oxydatifs, affectant ainsi l'ADNmt et les fonctions mitochondriales (Koliaki et al., 2015).

2.3.2 Les mitochondries et le statut oxydant

Les mitochondries jouent un rôle clé dans la production de ROS. On estime que 90% des ROS produits dans les cellules proviennent des mitochondries (Balaban et al., 2005). Cette production a lieu au cours de la phosphorylation oxydative. Les électrons dérivés du NADH et FADH₂ peuvent réagir directement avec l'oxygène ou d'autres accepteurs d'électrons et ainsi générer des ROS tels que l'anion superoxyde (O₂^{•-}). Une étude réalisée *in vitro* montre que 1 à 2% de la consommation quotidienne d'oxygène est consacrée à la production de ROS (Kausar et al., 2018). Cependant, les données obtenues *in vivo* suggèrent que cette consommation a été surestimée et qu'elle serait seulement de 0,4 à 0,8% (Hansford et al., 1997). Dans cette partie nous parlerons (1) des différents sites de production des ROS et (2) de la machinerie antioxydante présente dans les mitochondries.

A) Les différents sites de production des ROS

La capacité des mitochondries à produire des ROS dépend de plusieurs facteurs, dont la composition de la membrane mitochondriale et l'âge des organismes ou de l'espèce étudiée (Kausar et al., 2018). On dénombre pas moins de 8 sites mitochondriaux capables de produire des ROS (Kausar et al., 2018). Cependant, les principaux sites producteurs de ROS se situent à l'intérieur de la chaîne respiratoire au niveau des complexes I et III, et potentiellement du complexe II. Au cours du transfert des électrons, une fuite d'électrons peut entraîner une réduction partielle de l'oxygène et aboutir à la formation O₂^{•-}. Cette fuite peut être plus importante lorsque la concentration d'oxygène ou le flux d'électrons augmentent, et dépend également des substrats fournis aux mitochondries.

Production de ROS par le complexe I

Le complexe I produit essentiellement des ROS au niveau de la matrice. Cependant, les sites exacts où sont synthétisés les ROS n'ont pas été clairement définis. Ce complexe utiliserait deux mécanismes pour produire des ROS. Premièrement, un rapport élevé en NAD/NADH pourrait entraîner une réduction de la flavine mononucléotide (FMN) du complexe I qui pourrait alors transférer un électron à l'oxygène, permettant ainsi la synthèse de d'O₂^{•-} (forward electron transfer). Deuxièmement, une forte diminution du pool de CoQ (cf. section 2.1.3) associée à une force proton motrice élevée pourrait conduire à un transport

inverse des électrons du complexe II vers le complexe I (reverse electron transfer) et ces électrons seraient ensuite utilisés pour la production de ROS au niveau du complexe I (Kausar et al., 2018; Pryde and Hirst, 2011; Turrens, 2003).

Production de ROS par le complexe III

La production de ROS par le complexe III a fait l'objet de nombreuses recherches. Il a été démontré que de façon similaire au complexe I, le complexe III pouvait produire des ROS dans le sens direct des électrons (forward) ou inverse (reverse) (Kausar et al., 2018). En 1973, il a été proposé que le superoxyde était formé au niveau du centre d'oxydation de l'ubiquinol (Site Qo) du complexe III. Plus précisément, une semiquinone, servant d'intermédiaire à l'oxydation de l'ubiquinol, permettrait de réduire l'oxygène et serait donc responsable de la production de superoxyde dans la matrice et dans l'espace intermembranaire. Cependant de récentes études ont démontré que la production d' $O_2^{\cdot-}$ à partir du site Qo était stimulée par la présence d'ubiquinone oxydée, suggérant que l'électron pourrait être transféré sur l'oxygène via une réaction inverse des électrons (Bleier and Dröse, 2013; Borek et al., 2008; Dröse and Brandt, 2008; Sarewicz et al., 2010).

Production de ROS par le complexe II

Il a été longtemps admis que le complexe II ne produisait pas de ROS. Cependant, des études récentes semblent prouver le contraire. En effet, des études réalisées sur des mitochondries isolées ont démontré que dans des conditions spécifiques, et plus précisément lorsque la concentration en succinate dans le milieu est importante (5mM), le complexe II produit une quantité non négligeable de ROS (Kausar et al., 2018; Moreno-Sánchez et al., 2013; Quinlan et al., 2012). Cette production de ROS via le complexe II serait similaire voir supérieure à la production maximale des complexes I et III. Cela suggère que le complexe II pourrait jouer un rôle important dans la production de ROS (Lenaz, 2001). Cependant, il est important de noter que ces études ont été réalisées *in vitro* sur des isolations de mitochondries dans des conditions bien spécifiques (forte concentration de succinate) et peuvent ne pas être représentatives de la réalité physiologique.

Une surproduction de ROS par les mitochondries peut être extrêmement nocive pour les organismes en causant de profonds dommages oxydatifs, voir en conduisant à l'apoptose. Les ROS peuvent ainsi contribuer au développement de nombreuses maladies comme le diabète ou certaines maladies cardiaques et neurodégénératives, mais également au

vieillesse. En effet, un certain nombre d'études ont démontré que l'intégrité mitochondriale diminuait au cours du vieillissement, notamment à cause de l'oxydation des protéines et lipides mitochondriaux et de l'ADNmt. Il a été suggéré que ces dommages causés aux mitochondries contribueraient à un « cercle vicieux », au cours duquel une altération initiale des mitochondries induites par les ROS, entraîne une augmentation de la production de ROS qui entraîne des dommages mitochondriaux (Balaban et al., 2005).

B) La machinerie mitochondriale pour éliminer les ROS

Etant donné que les mitochondries sont les organites cellulaires qui produisent le plus de ROS, il n'est pas surprenant qu'elles possèdent également une machinerie antioxydante efficace afin de réguler la concentration des ROS à un niveau non délétère. Le maintien de la balance redox cellulaire par les mitochondries dépend à la fois de systèmes enzymatiques mais également non enzymatiques.

La régulation de la concentration des ROS est tout d'abord contrôlée au niveau de leur production. Des protéines de découplages (UCPs) sont ainsi capables d'abaisser le potentiel membranaire des mitochondries, et permettent ainsi aux électrons de circuler à travers la chaîne respiratoire avec moins de résistances. Ceci aurait pour conséquence de diminuer la probabilité d'une réduction de l'oxygène en superoxyde (Echtay et al., 2002). Cependant, une fois que les ROS sont produits il est nécessaire de les éliminer. C'est à ce moment là qu'interviennent les enzymes antioxydantes mitochondriales.

Parmi les différentes enzymes antioxydantes des mitochondries, on retrouve notamment la superoxyde dismutase (SOD). Dans les cellules, il existe deux formes de SOD: la SOD2 (ou MnSOD), qui se situe dans la matrice mitochondriale et qui est dépendante du manganèse, et la SOD1, qui contient du cuivre et se trouve dans le cytosol des cellules (Balaban et al., 2005). Ces deux enzymes codées par le génome nucléaire sont connues pour transformer l' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 qui sera à son tour désactivé par d'autres enzymes antioxydantes telles que le glutathion peroxydase GSH-Px, (présentée dans la partie 1.2.2), la peroxiredoxine (Prx) et la catalase (Dai et al., 2017). Ces différentes enzymes sont capables de transformer l' H_2O_2 en H_2O et O_2 dans le cytoplasme mais également dans les mitochondries.

Les GSH-Px catalysent la réduction de l' H_2O_2 et de divers hydroperoxydes en utilisant le glutathion comme donneur d'électrons. Au total, il existe 4 isoformes de GSH-Px chez les mammifères. GSH-Px1, qui est la principale isoforme et qui se trouve majoritairement dans le cytosol, peut également se trouver en petite proportion dans la matrice mitochondriale (~10%)

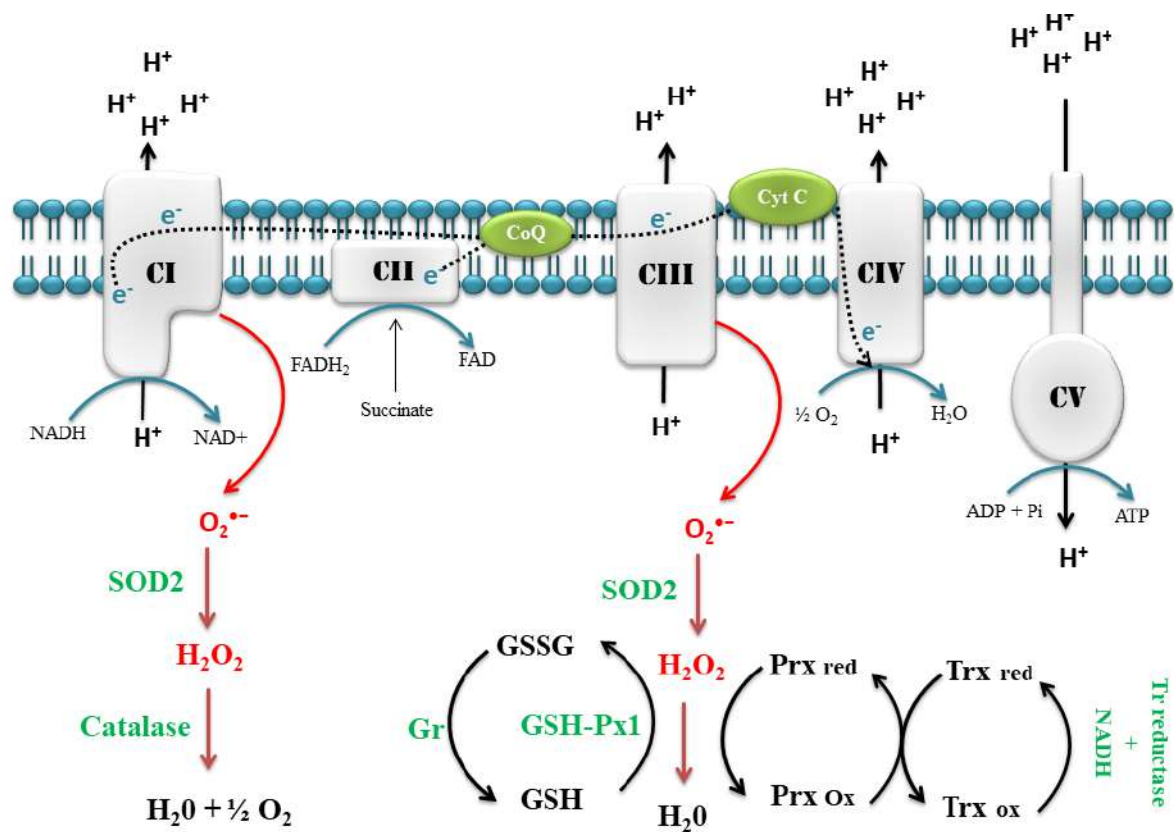


Figure 25 : système antioxydant mitochondrial. GSH, glutathion réduit ; GSH-Px1, glutathion peroxydase 1 ; GSSG, glutathion oxydé ; Gr, glutathion réductase ; Prx red, peroxyrédoxine réduit ; Prx ox, peroxyrédoxine oxydé SOD2, superoxyde dismutase 2 ; Trx ox, thioredoxine oxydé ; Trx red, thioredoxine réduit

(Chang et al., 2004; Esworthy et al., 1997; Legault et al., 2000). La détoxification de l' H_2O_2 par les GSH-Px nécessite à la fois la présence de glutathion dans la matrice mitochondriale mais également de GR afin de transformer le GSSG en GSH (Figure 25).

Parmi les Prx capables de dégrader l' H_2O_2 , il y a la Prx III, codée par le génome nucléaire et qui est transférée aux mitochondries ou elle subit un clivage afin d'être activée (Chang et al., 2004). Au cours de la réaction avec l' H_2O_2 , le résidu Cys présent sur l'homodimère Prx est oxydé. Les Prx oxydées sont par la suite réduites spécifiquement par la thioredoxine qui sert de donneur d'électrons. La forme réduite de la thioredoxine est ensuite régénérée par la thioredoxine-réductase au détriment de la NADPH qui sera le donneur ultime d'électrons (Chang et al., 2004) dans la matrice mitochondriale (Figure 25).

La présence de la catalase dans les mitochondries a été longtemps contestée. C'est Radi et al., en 1991, qui ont démontré, pour la première fois, que dans le cœur des rats, la catalase n'était pas seulement présente dans le cytoplasme mais également dans les mitochondries. Quelques années plus tard, Salvi et al., (2007) ont démontré que la catalase mitochondriale était également présente dans le foie des rats. Un des avantages de la catalase par rapport aux GSH-Px et Prx est qu'elle n'a pas besoin de la présence de donneurs d'électrons afin de dégrader l' H_2O_2 (Dai et al., 2017). La catalase, qui est une dismutase, réduit directement un H_2O_2 en H_2O et oxyde un second H_2O_2 en O_2 (Figure 25).

Enfin, il existe également des agents antioxydants non enzymatiques tels que la vitamine E, présente au niveau de la membrane interne et externe, qui est capable de capter directement divers ROS et d'éviter la peroxydation des lipides (Lauridsen and Jensen, 2012).

2.3.3 Les mitochondries et le réticulum endoplasmique

Le Réticulum Endoplasmique (RE) est un organe cellulaire, présent uniquement dans les cellules eucaryotes. Il joue de nombreux rôles dans la cellule, notamment dans la synthèse, la maturation et le repliement des protéines et leur modification post-traductionnelle. Le RE est également un site de stockage intracellulaire du calcium et contient la plupart des enzymes impliquées dans la synthèse des lipides cellulaires (Rowland and Voeltz, 2012). La microscopie électronique a permis de mettre en évidence que le RE était en contact avec de nombreux organites cellulaires et notamment les mitochondries. Les zones où le RE est en contact avec les mitochondries sont appelées les MAMs (pour Mitochondrial associated ER membranes). L'interaction entre le RE et les mitochondries représente environ 20 % du réseau mitochondrial total mais peut varier en fonction des conditions (Theurey and Rieusset, 2017). Les MAMs n'impliquent pas la fusion du RE et des mitochondries, ces deux organites gardent

leur propre identité. Cependant, ce contact est assez fort pour que ces deux organites puissent se déplacer de façon coordonnée le long des microtubules. Cela suggère que le maintien de ce contact est important (Rowland and Voeltz, 2012). Dans cette partie nous nous intéresserons particulièrement aux MAMs, puis nous discuterons du lien qui existe entre les mitochondries et le stress du réticulum endoplasmique.

A) Les MAMs

Il est clairement défini que les MAMs permettent de mettre en synergie plusieurs fonctions des mitochondries et du RE grâce à un trafic bidirectionnel de plusieurs facteurs. Les principales fonctions de la MAM, qui ont fait l'objet de nombreuses recherches, portent sur la synthèse et le transport des lipides et l'échange de Ca^{2+} qui contrôle entre autres la dynamique des mitochondries ou encore l'apoptose via les mitochondries.

MAMs et synthèse lipidique

A travers les MAMs, le RE et les mitochondries travaillent en étroite collaboration afin de synthétiser et d'échanger des lipides. En effet, la majorité des lipides présents dans les membranes mitochondriales est synthétisé dans le RE et transportée vers les mitochondries (Tatsuta et al., 2014). Cependant les mitochondries jouent également un rôle dans la synthèse de certains lipides. En effet, bien qu'une grande partie des enzymes impliquées dans la lipogenèse se situent dans la membrane du RE certaines se trouvent également dans la membrane mitochondriale. Ainsi la synthèse de certaines classes de phospholipides nécessite la collaboration d'enzymes se situant dans le RE et dans les mitochondries. C'est le cas par exemple de la synthèse de phosphatidylcholine ou de phosphatidyléthanolamine (Rowland and Voeltz, 2012; Vance and Tasseva, 2013). De plus, certaines enzymes se trouvent au sein même de la MAM, telles que la phosphatidylsérine synthase (Stone and Vance, 2000; Vance, 1990) ou encore certaines enzymes impliquées dans la synthèse du cholestérol (Szymański et al., 2017).

Transfert de Ca^{2+} via les MAMs: rôle dans la dynamique mitochondriale

Le transfert du Ca^{2+} du RE aux mitochondries joue un rôle important sur les fonctions mitochondriales, la dynamique des mitochondries (fission) et l'apoptose. Le transfert du Ca^{2+} du RE aux mitochondries est possible grâce à trois canaux reliant physiquement les deux organites : IP₃R (inositol-1,4,5-trisphosphate) et VDAC (Voltage Dependent Anion Channel),

situés respectivement au niveau du RE et des mitochondries et GRP75 (glucose-regulated protein 75) qui permet de faire la transition entre les deux (Honrath et al., 2017).

Ce transfert de calcium est essentiel pour le fonctionnement du cycle de Krebs. En effet, la pyruvate déshydrogénase, l' α -ketoglutarate déshydrogénase ainsi que l'isocitrate déshydrogénase dépendent toutes du Ca^{2+} pour fonctionner (Vance, 2014). De plus, le calcium joue un rôle dans la dynamique fusion/fission des mitochondries. Des études ont démontré qu'une concentration élevée en calcium dans les mitochondries active la protéine DRP1 impliquée dans la fission (cf.2.2.2, B) et régule ainsi la morphologie mitochondriale en maintenant un équilibre entre la fission mitochondriale et la fusion (Saotome et al., 2008; Vance, 2014).

Le flux de Ca^{2+} joue également un rôle essentiel dans l'apoptose. Brièvement, le flux de Ca^{2+} stimule l'apoptose en permettant l'ouverture de pores dans la membrane interne mitochondriale. Ce phénomène est appelé transition de perméabilité mitochondriale (TPM). La TPM est associée à des changements au niveau de la morphologie des mitochondries ainsi que dans l'activité des fonctions mitochondriales (Hunter and Haworth, 1979). L'ouverture des pores mitochondriaux entraîne une cascade de réactions commençant par un gonflement osmotique des mitochondries, suivi par la rupture de la membrane mitochondriale, et du relargage de cytochrome c dans le cytosol (Orrenius et al., 2015). Une fois que le cytochrome c est relargué dans le cytoplasme, il va se lier à Apaf-1 (apoptosis-protease activating factor 1) et former un apoptosome. Cet apoptosome va par la suite activer la procaspase-9 initiateur (caspase-9), qui à son tour va permettre l'activation des procaspase-3 et 7 (caspase-3 et 7) effectrices, par clivage. Ceux-ci, vont alors, à leur tour, activer ou inhiber des molécules effectrices tel que PARP (Poly ADP-ribose Polymérase) (Ooi and Ma, 2013). PARP est une protéine nucléaire qui est impliquée dans la réparation de l'ADN endommagé (Purohit et al., 2016). Au cours de l'apoptose, le clivage de PARP via les caspases effectrices -3 et -7 conduit à son inhibition et donc à l'altération de la réparation de l'ADN endommagé.

Ainsi, les MAMs jouent de nombreux rôles dans la cellule. Une rupture de cette communication entre le RE et les mitochondries pourrait entraîner de fortes perturbations au niveau du fonctionnement mitochondrial mais également au niveau du métabolisme qui pourrait aboutir *in fine* à la mort cellulaire.

B) Le stress du réticulum endoplasmique et les mitochondries

Il est aujourd'hui admis qu'un stress cellulaire peut altérer la glycosylation ou le repliement des protéines. Ces protéines dysfonctionnelles vont alors s'accumuler dans le RE et induire un stress du RE (Iurlaro and Muñoz-Pinedo, 2016; Senft and Ronai, 2015). Afin de répondre à ce stress, la cellule a développé plusieurs systèmes de signalisation lui permettant, soit de restaurer la fonction du RE et l'homéostasie cellulaire, soit d'induire l'apoptose. Plusieurs mécanismes peuvent ainsi être induits et collaborer en situation de stress du RE, notamment la réponse UPR (unfolded protein response), la voie ERAD (ER-associated degradation), l'autophagie, la biogénèse mitochondriale ou encore l'apoptose (Senft and Ronai, 2015).

Stress du RE : les voies de signalisation de l'UPR

L'UPR a fait l'objet de nombreuses recherches et joue un rôle primordial dans la restauration de l'homéostasie cellulaire en situation de stress du RE. L'UPR permet de ralentir la synthèse protéique, tout en augmentant la synthèse de certaines protéines spécifiques afin de stimuler le processus de repliement des protéines altérées et la survie cellulaire. Elle va également activer plusieurs systèmes de dégradation des protéines tels que l'autophagie ou la voie ERAD (dégradation des protéines via le protéasome). Si le stress du RE persiste et que les réponses aux stress ne permettent pas de restaurer l'homéostasie cellulaire, l'UPR peut aussi activer l'apoptose (Foufelle and Ferré, 2007). L'UPR est médiée par l'activation de trois récepteurs présents sur la membrane du réticulum endoplasmique : PERK (pancreatic ER kinase (PKR)-like ER kinase), ATF6 (activating transcription factor 6) et IRE1 (inositol-requiring enzyme 1) (Figure 26). En situation basale, ces trois récepteurs sont maintenus dans un état inactif grâce à leur liaison avec GRP78 (glucose-regulated protein 78kDa), aussi connu sous le nom de Bip. En revanche, lorsque les protéines mal repliées s'accumulent dans la lumière du RE, GRP78 va se lier à ces protéines et les trois récepteurs seront ainsi libérés de leur liaison avec GRP78 et pourront être activés (Foufelle and Ferré, 2007; Pfaffenbach and Lee, 2011) (Figure 26).

Une fois l'UPR activé, PERK va se dimeriser et s'autophosphoryler permettant ainsi la phosphorylation d'eIF2 α , qui est connu pour inhiber la traduction générale, tout en permettant la traduction de certains facteurs de transcription liés au stress tels qu'ATF4 (Cf. section 1.1.3 et Figure 26). ATF4 est impliqué dans l'induction de l'expression de plusieurs gènes de l'autophagie mais également de l'apoptose comme *chop* (Senft and Ronai, 2015; Szegezdi et al., 2006).

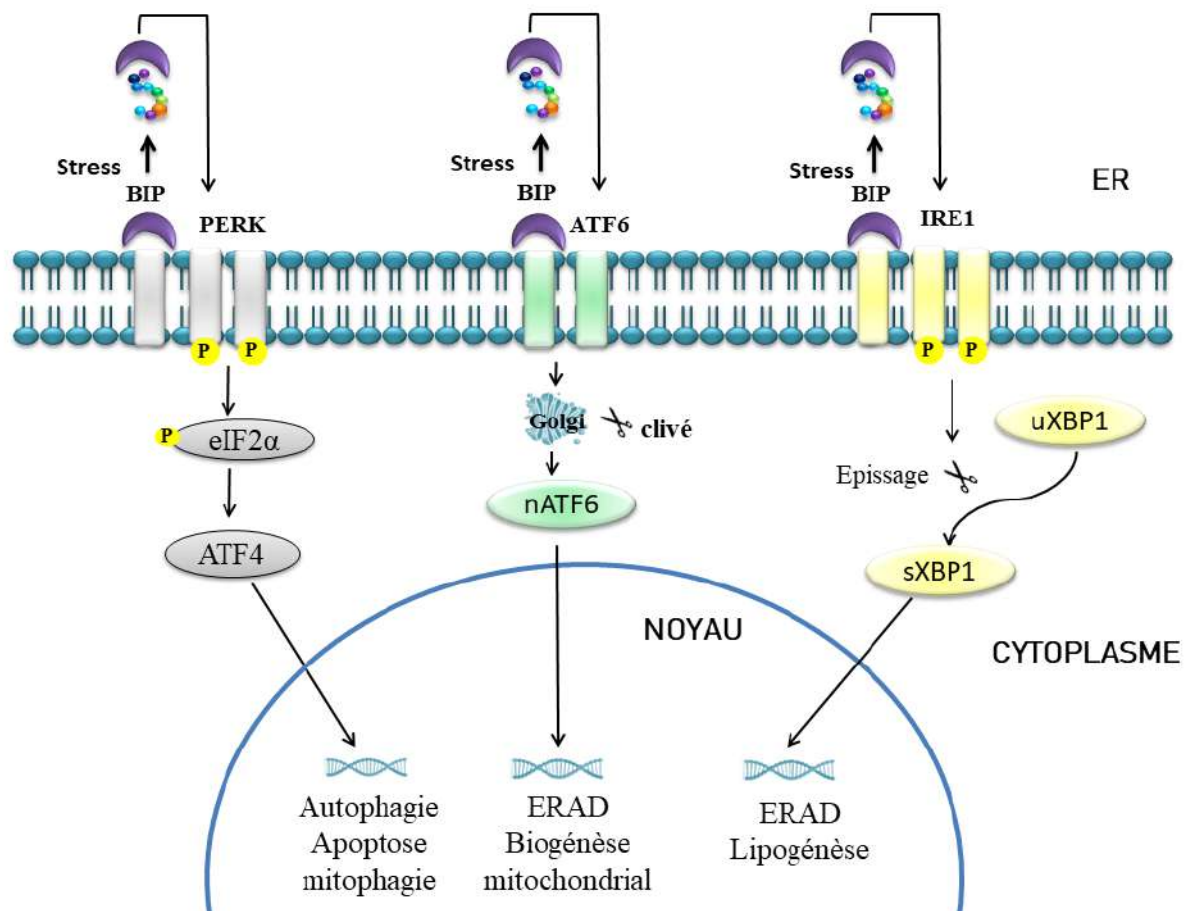


Figure 26: Les différentes voies de signalisation impliquées dans le stress du RE. ATF4, Activating transcription factor 4 ; ATF6, activating transcription factor 6 ; BIP, glucose-regulated protein 78kDa (Grp78) ; eIF2α, eukaryotic translation initiation factor 2 alpha ; IRE1, inositol-requiring enzyme 1 ; PERK, pancreatic ER kinase (PKR)-like ER kinase

Au cours de l'UPR, ATF6 est transféré vers l'appareil de Golgi, où il sera clivé par S1P (Site-1 protease) et S2P (Site-2 protease) afin de produire un facteur de transcription. Celui-ci induit alors l'expression de plusieurs gènes tels que *xbp1* (qui relie les voies ATF6 et IRE1 de l'UPR), *chop* (impliqué dans l'apoptose), mais aussi plusieurs autres gènes impliqués dans le système ERAD et la biogénèse mitochondriale (Senft and Ronai, 2015; Szegezdi et al., 2006) (Figure 26).

Le dernier récepteur IRE1 est activé par oligomérisation et autophosphorylation. Une fois activé, IRE1 va permettre l'épissage de *xbp1*(U) en *xbp1*(S) qui est ensuite transféré dans le noyau et permet la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la réponse au stress (par exemple *edem1*) ou le métabolisme intermédiaire (Figure 26).

L'UPR permet ainsi d'augmenter l'expression de nombreux gènes impliqués dans différents mécanismes cellulaires afin de permettre à la cellule de s'adapter à des situations de stress. Etant donnée l'étroite relation qui existe entre les mitochondries et le RE (notamment via la MAM), il n'est pas surprenant qu'un stress impactant un de ces deux organites puisse se répercuter sur l'autre. En ce sens, plusieurs facteurs de transcription induits au cours du stress du RE sont capables de moduler l'expression de plusieurs gènes impliqués dans différentes fonction mitochondriales et notamment la mitophagie.

ER stress et mitophagie

De nombreuses études ont mis en évidence qu'un stress du RE pouvait conduire à l'induction de la mitophagie (Bouman et al., 2011; Guo et al., 2018; Pires Da Silva et al., 2018; Zhang et al., 2014). Bouman et al., (2011) ont notamment observé que la voie PERK jouait un rôle clé dans l'induction de la mitophagie via ATF4. En effet, dans cette étude ils ont démontré que le facteur de transcription ATF4 permettait d'augmenter l'expression du gène *parkin* qui est impliqué dans la mitophagie (cf. 2.2.3, C). Cette augmentation de la quantité d'ARNm du gène *parkin*, en situation de stress du RE est accompagnée par une augmentation de son recrutement au niveau de la membrane mitochondriale externe (Zhang et al., 2014) permettant ainsi la mitophagie (cf. 2.2.3, C). Le rôle de la mitophagie en situation de stress du RE est de lutter contre l'induction de l'apoptose via les mitochondries (Kim et al., 2006; Maiuri et al., 2007; Pires Da Silva et al., 2018). Il est intéressant de noter, que Parkin peut également, à son tour, activer la voie IRE-1 de l'UPR (Duplan et al., 2013). Ainsi il semble évident qu'un stress impactant un de ces deux organites (RE ou mitochondrie) peut se répercuter sur l'autre.

Globalement, ces données mettent en évidence l'étroite collaboration du RE et des mitochondries et mettent également en lumière la complexité des mécanismes qui dépendent des stress environnementaux et de leur intensité. Ainsi les mitochondries et les RE se trouvent au cœur d'un système qui balance entre la survie et la mort cellulaire.

OBJECTIFS DE LA THESE

OBJECTIFS DE LA THESE

PARTIE 1: CONSEQUENCES A COURT ET LONG TERMES D'UNE DEFICIENCE EN METHIONINE SUR LES MITOCHONDRIES DANS LE FOIE DE TRUITE ARC-EN-CIEL

Un des challenges pour le développement de l'aquaculture durable est le remplacement des aliments à base de farines de poissons par des aliments à base de farines végétales. Cependant, les farines végétales sont connues pour être carencées en plusieurs nutriments essentiels tels que la méthionine. Dans ce contexte, il a été démontré que la supplémentation des aliments à base de farine végétale avec de la méthionine permettait d'optimiser la valeur nutritionnelle de ces aliments. Ainsi, mieux comprendre le rôle de la méthionine chez les poissons est indispensable afin de développer des aliments qui permettront une croissance optimale des poissons tout en répondant aux contraintes environnementales et économiques de la filière. Dans ce contexte, l'objectif général de ma thèse était de mieux comprendre les conséquences d'une déficience en méthionine dans l'aliment sur le métabolisme intermédiaire de la truite arc-en-ciel.

La méthionine joue évidemment le rôle d'élément constitutif des protéines, mais pas seulement, elle intervient également dans le contrôle de plusieurs voies de signalisation, du statut oxydant et est un donneur de groupement méthyl. Ces fonctions peuvent influencer directement le métabolisme. Il a notamment été démontré qu'une carence en méthionine alimentaire impactait directement la croissance, le métabolisme intermédiaire et le statut oxydant chez les poissons. De plus la fonction de donneur de groupement méthyl de la méthionine peut potentiellement jouer un rôle déterminant dans la programmation nutritionnelle. En effet, il a été observé qu'une carence alimentaire en méthionine chez des

géniteurs de truite arc-en-ciel affectait la croissance, le statut oxydant et le métabolisme intermédiaire des descendants.

De façon surprenante, alors que les mitochondries jouent un rôle clé dans la croissance, le métabolisme intermédiaire et le statut oxydant, aucune étude chez les poissons ne s'est intéressée aux conséquences d'une déficience en méthionine sur les mitochondries. **Ainsi les principaux objectifs de cette thèse étaient de déterminer (1) si une déficience en méthionine peut impacter l'intégrité des mitochondries dans le foie de truite arc-en-ciel (articles 1 et 2) et (2) si une déficience en méthionine appliquée lors des tous premiers stades de l'alimentation des alevins peut induire une programmation nutritionnelle du métabolisme mitochondrial dans le foie de truite arc-en-ciel (article 2).**

PARTIE 2: EFFET D'UNE INHIBITION DE L'AUTOPHAGIE AVEC DE LA BAFILOMYCINE A1 SUR L'EXPRESSION DES GENES DU METABOLISME INTERMEDIAIRE DANS DES HEPATOCYTES DE TRUITE ARC-EN-CIEL

Dans une seconde partie qui se détache de la thématique principale de la thèse, nous nous sommes concentrés sur une fonction particulière de l'autophagie : la régulation de l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire. Il est aujourd'hui admis que l'autophagie joue un rôle déterminant dans la dégradation des réserves énergétiques ainsi que dans le renouvellement des organites intracellulaires dont les peroxysomes, le RE ou encore les mitochondries (Cf. section 2.2.3 de l'étude bibliographique). Toutefois, de récentes données suggèrent qu'en plus de ces différents rôles, l'autophagie pourrait également exercer une fonction majeure dans la régulation de l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire (Yang et al., 2010 ; Seiliez et al., 2016 ; Wang et al., 2015 ; Wang et al., 2018). Il s'agirait là d'une fonction encore inconnue pour l'autophagie. Cependant, des résultats contradictoires demeurent encore entre études quant à l'effet spécifique de l'inhibition de l'autophagie sur l'expression de ces gènes. Cela nous empêche ainsi d'avoir une idée précise du rôle de l'autophagie dans ce processus. **Dans ce contexte, et afin de parfaire nos connaissances des interactions existantes entre l'autophagie, le métabolisme et l'homéostasie du RE, nous avons cherché dans cette seconde partie à préciser les données de la littérature et déterminer les conséquences de l'inhibition de cette fonction cellulaire sur l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans métabolisme intermédiaire et le stress du RE dans des hépatocytes de truites en culture (article n°3).**

RESULTATS

RESULTATS

PARTIE 1	Une déficience en méthionine impacte le statut oxydant, l'intégrité mitochondriale et la mitophagie dans le foie de truite arc-ciel.....	82
PARTIE 2	Alimentation précoce de la truite arc-en-ciel avec un régime déficient en méthionine pendant deux semaines : conséquences sur les mitochondries dans le foie des juvéniles.....	97
PARTIE 3	L'inhibition de l'autophagie avec la bafilomycine A1 affecte l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire	136

RESULTATS

Au cours de cette thèse, les résultats obtenus ont donné lieu à deux publications acceptées et une troisième soumise. Les résultats seront présentés sous forme de trois parties correspondant aux trois sujets abordés dans ces différents articles.

PUBLICATION N°1:

Sarah Séité, Arnaud Mourier, Nadine Camougrand, Bénédicte Salin, A. Cláudia Figueiredo-Silva, Stéphanie Fontagné-Dicharry, Stéphane Panserat & Iban Seiliez (2018). Dietary methionine deficiency affects oxidative status, mitochondrial integrity and mitophagy in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Scientific Reports*, 8, 10151.

PUBLICATION N°2:

Sarah Séité, Karthik Masagounder, Cécile Herault, Lucie Marandel, Stéphane Panserat & Iban Seiliez. Early feeding of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with methionine deficient diet during two weeks: consequences on mitochondria in liver of juveniles. *Submitted in Journal of Experimental Biology*.

PUBLICATION N°3:

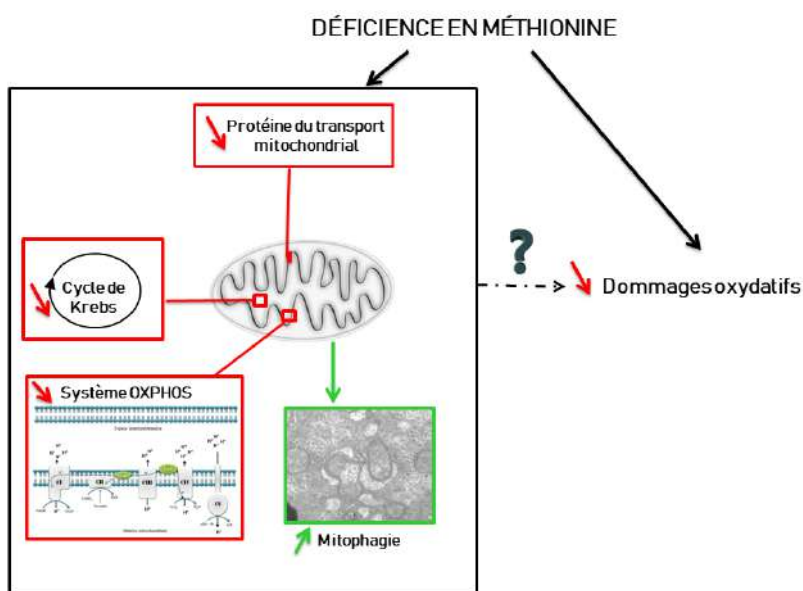
Sarah Séité, Tracy Pioche, Nicolas Ory, Elisabeth Plagnes-Juan, Stéphane Panserat, Iban Seiliez (2019). The autophagic flux inhibitor bafilomycin a1 affects the expression of intermediary metabolism-related genes in trout hepatocytes. Accepted in *Frontiers in Physiology*.

PUBLICATION N°1: Une déficience en méthionine impacte le statut oxydant, l'intégrité mitochondriale et la mitophagie dans le foie de truite arc-en-ciel

Objectifs

Les objectifs de cette étude étaient (1) de clarifier si une déficience en méthionine alimentaire peut impacter le statut oxydant dans le foie de truite et (2) de déterminer si cela peut être lié à un dysfonctionnement mitochondrial.

Principaux résultats et conclusions



- Une restriction alimentaire en méthionine diminue les dommages oxydatifs sans augmenter les défenses antioxydantes.
- Une carence en méthionine alimentaire diminue plusieurs marqueurs mitochondriaux liés au transport, au système OXPHOS et au cycle de Krebs indiquant une baisse générale de l'intégrité mitochondriale.
- La baisse de l'intégrité mitochondrial est associée à une augmentation de plusieurs marqueurs liés à la mitophagie ainsi qu'à l'induction de la voie PINK1/PARKIN.

Nous avons ainsi démontré qu'une déficience en méthionine conduit à une baisse générale de l'intégrité des mitochondries associée à une augmentation de la mitophagie et à une baisse du statut oxydant dans le foie de truite. Les relations épistatiques entre ces différentes observations restent à déterminer.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Dietary methionine deficiency affects oxidative status, mitochondrial integrity and mitophagy in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Sarah Séité^{1,2,3}, Arnaud Mourier^{4,5}, Nadine Camougrand^{4,5}, Bénédicte Salin^{4,5,6}, A. Cláudia Figueiredo-Silva³, Stéphanie Fontagné-Dicharry¹, Stéphane Panserat¹ & Iban Seilliez¹

The low levels of methionine in vegetable raw materials represent a limit to their use in aquafeed. Methionine is considered as an important factor in the control of oxidative status. However, restriction of dietary methionine has been shown to reduce generation of mitochondrial oxygen radicals and thus oxidative damage in liver. Here, we aim to evaluate the effect of dietary methionine deficiency in hepatic oxidative status in rainbow trout and identify the underlying mechanisms. Fish were fed for 6 weeks diets containing two different methionine concentrations: deficient (MD, Methionine Deficient diet) or adequate (CTL, control diet). At the end of the experiment, fish fed the MD diet showed a significantly lower body weight and feed efficiency compared to fish fed the CTL diet. Growth reduction of the MD group was associated to a general mitochondrial defect and a concomitant decrease of the oxidative status in the liver. The obtained results also revealed a sharp increase of mitochondrial degradation through mitophagy in these conditions and emphasized the involvement of the PINK1/PARKIN axis in this event. Collectively, these results provide a broader understanding of the mechanisms at play in the reduction of oxidant status upon dietary methionine deficiency.

Fisheries and aquaculture remain an essential resource for hundreds of millions of people worldwide. In 2014, the world fish supply reached 20 kg per capita, largely due to the strong development of aquaculture, which now provides 50% of the fish consumed¹. Aquaculture is therefore an important player to consider in addressing one of the greatest challenges of our time: Feeding more than 9 billion people by 2050. However, the sustainability of this industry, which requires large amounts of wild fish for aquafeed, still remains a challenge². Thus, the replacement of fishmeal and fish oil by proteins and oil of alternative origin is a major objective for sustainable aquaculture^{3–6}. However, replacement of fish meal by plant proteins in aquafeed is often limited by the low level of methionine in those alternatives, in particular in plant protein sources. In this context, supplementation of agricultural crop sources with an appropriate level of synthetic methionine has been shown to optimize the nutritional value of those diets containing alternative proteins. A better understanding of the role of methionine in fish is therefore essential to develop diets that are in tune with fish growth and metabolism as well as environmental and economic constraints.

Besides its essential role as a building block for protein synthesis and growth of animals, methionine is proven a key factor in the control of oxidative status^{7,8}. Indeed, methionine residues in proteins react readily with a variety of reactive oxygen species (ROS) to form methionine sulfoxide (MetO), and MetO reductases

¹INRA, Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, UMR 1419, Nutrition, Métabolisme, Aquaculture, Saint Pée sur Nivelle, F-64310, France. ²Evonik Rexim, 80400, Ham, France. ³Evonik Nutrition and Care GmbH, 63457, Hanau, Germany. ⁴CNRS, IBGC, UMR5095, 1 rue Camille Saint-Saëns, F-33000, Bordeaux, France. ⁵Université de Bordeaux, IBGC, UMR5095, 1 rue Camille Saint-Saëns, F-33000, Bordeaux, France. ⁶Université de Bordeaux, Service Commun de Microscopie, 146 Rue Léo Saignat, F-33000, Bordeaux, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to I.S. (email: iban.seilliez@inra.fr)

catalyze a thioredoxin-dependent reduction of MetO back to methionine *in vivo*. This cyclic interconversion of methionine residues of proteins between oxidized and reduced forms may therefore be considered as an efficient ROS-scavenging mechanism^{9,10}. In addition, methionine feeds the transsulfuration pathway that leads synthesis of other sulfur amino acids, notably cysteine^{11,12}. Cysteine is required for the synthesis of glutathione (GSH) and taurine, two components which have the capacity to affect cellular redox status and thus they are essential for host defense against oxidative stress^{13–16}. Thus, methionine plays a primordial role in the defense against oxidative stress.

However, dietary methionine restriction has also been shown to decrease the rate of mitochondrial ROS production and thus oxidative damages. Indeed, rats maintained on an isocaloric 40% methionine restricted diet for 7 weeks have been shown to exhibit a decrease of heart mitochondrial ROS generation, particularly from complex I, as well as of damage to mitochondrial DNA, proteins, and lipids¹⁷. Similar results were obtained in liver, brain, and kidney mitochondria of animals fed 40% methionine restricted diet^{18–21}. Likewise, decreases of mitochondrial ROS generation and oxidative stress were observed at 80% methionine restriction in both heart and liver^{18,21}. However, the involved mechanisms remained far from being resolved. It has been hypothesized that reduction of mitochondrial ROS production observed in methionine restricted conditions is a direct result of a decrease of mitochondrial complex I levels^{17–19,21,22}. Other possible explanatory mechanisms are decreased mitochondrial JO_2 , a mild electron transport chain uncoupling, or the substitution of mitochondrial membrane unsaturated fatty acids (20:4 n-6 and 22:6 n-3) by less unsaturated fatty acids (18:2 n-3, 18:1 n-9 and 18:0)²³, suggesting that methionine restriction induces a more general mitochondrial dysfunction.

The present study was conducted to clarify the effect of dietary methionine deficiency in the control of hepatic oxidative status and identify the underlying mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Materials and Methods

The experiments were conducted in compliance with the legal frameworks of France and the EU. They respect the directive 2010/63/EU relating to the protection of animals used for scientific purposes as well as the decree No 2013-118, 1 February 2013 of the French legislation governing the ethical treatment of animals. The protocol was approved by the French National Consultative Ethics Committee under the reference number APAFIS8222-2017041016141425-v4.

Feeding trial and rearing. Sexually immature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) having a mean initial weight of 60 g were reared in the INRA experimental facilities at Donzacq (Landes, France) at a constant water temperature (17 °C) under natural photoperiod during the months of July to August. The fish were distributed into 6 circular tanks (150 litres, 3 tanks per diet; 12 fishes/tank). Triplicate groups of trout were fed for 6 weeks with one of two iso-nitrogenous (40% crude protein) and isoenergetic (20 kJ/g dry matter, DM) extruded diets, manufactured at INRA experimental facilities of Donzacq (Table 1). Diets were formulated to meet nutrient requirements of rainbow trout (NRC 2011, AMINOSalmonid®) and thus be similar in their nutrient composition, except for methionine content that was intended to be adequate (0.93%) in the control diet (Control, CTL) or restricted by 56% (methionine deficient, MD) compared to the CTL diet. The cysteine (Cys) level was kept constant at 0.43 g Cys per 100 g diet. The diets were distributed *ad libitum* twice a day. Fish were counted and weighed at the beginning and end of the feeding trial to follow the growth and feed utilisation.

Individual body mass, daily growth index, daily feed intake and feed efficiency were calculated as described before²⁴.

At the end of the 6 weeks feeding trial, blood and liver were collected from 3 fish per tank, anesthetised with benzocaine (30 mg/L) and euthanized by a sharp blow to the head. Blood samples were collected 16 h after the last meal from the caudal vein into heparinized syringes and centrifuged (3000 g, 5 min); the recovered plasma was immediately frozen and kept at –20 °C. Livers were collected at 2 h, 4 h and 16 h after the last meal, dissected, weighted and immediately frozen in liquid nitrogen and kept at –80 °C.

Chemical composition of the diets. DM, crude fat and gross energy content of the diets were determined following the procedures previously outlined²⁴. Crude protein content was measured as $\text{N} \times 6.25$ by the Kjeldahl method after acid digestion (ISO 937:1978) and using Leco FP-2000 (Leco Corp., St. Joseph, MI) analyser. Starch content was measured by an enzymatic method (InVivo Labs). Dietary amino acid concentrations were performed by wet chemistry at Evonik-Degussa Laboratory (Hanau, Germany) by ion-exchange chromatography with postcolumn derivatization with ninhydrin. Amino acids were oxidized with performic acid, which was neutralized with sodium metabisulfite²⁵; Commission Directive 1998). Amino acids were liberated from the protein by hydrolysis with 6 N HCl for 24 h at 110 °C and quantified with the internal standard method by measuring the absorption of reaction products with ninhydrin at 570 nm.

Level of methionine in plasma. Free methionine concentrations in blood plasma were determined by ion exchange chromatography using a Biochrom 20 amino acid analyser Lithium column and lithium buffers^{26,27}.

Western blot analyses. Livers sampled 2 and 16 h after the last meal were homogenized and analysed according to the previously detailed protocol²⁴ and using the following antibodies: anti-phospho-ribosomal protein S6 kinase 1 (P-RPS6K1, Thr389, #9205, Cell Signaling Technology); anti-RPS6K1 (#9202, Cell Signaling Technology); phospho-EIF4EBP1, eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 (P-EIF4EBP1, Thr37/Thr46, #9459, Cell Signaling Technology); anti-EIF4EBP1 (#9452, Cell Signaling Technology); anti-phospho eIF2 α (Ser51, #9721, Cell Signaling Technology); anti-carboxyl terminal eIF2 α (#9722, Cell Signaling Technology); anti-phospho AMP-activated protein kinase (P-AMPK, Thr172, #2532, Cell Signaling Technology); anti-AMPK (#2532, Cell Signaling Technology); anti- β -tubulin (TUBB)(#2146, Cell Signaling Technology).

	CTL	MD
Ingredient (% dry weight)		
Fish protein concentrate ^a	5	5
Faba bean protein concentrate ^b	17.5	17.5
Soy protein concentrate ^c	17.5	17.5
White lupin meal ^d	12	12
Dehulled pea meal ^e	6	6
Fish oil ^f	15	15
Gelatinised starch ^g	10	10
CaHPO ₄ ·2H ₂ O (18%P)	3	3
Min. premix. INR1 ^h	2	2
Vit. premix. INRA ⁱ	2	2
Free amino acid	10*	10**
Analysed composition (%)		
Dry matter, DM	95.43	94.02
Carbohydrate (%DM)	14.58	14.62
Crude protein (% as fed)	42.15	41.92
Total lipid (%DM)	15.01	15.23
Gross energy (%DM)	22.78	22.83
Amino acid (% as fed)		
Cysteine	0.43	0.43
Histidine	1.26	1.24
Isoleucine	1.94	1.89
Leucine	3.61	3.54
Lysine	2.75	2.74
Methionine	0.93	0.41
Phenylalanine	2.15	2.12
Threonine	1.98	1.97
Valine	2.22	2.16
Alanine	2.52	2.59
Aspartic acid	3.77	3.77
Glutamic acid	5.40	5.41
Glycine	2.87	2.95
Proline	2.03	2.11
Serine	1.98	2.03

Table 1. Ingredient and analytical composition of the diets. ^aCPSP-G (Sopropêche); ^bFabaqua 55 (Sotexpro); ^cEstrilvo; CP 70 (Sopropêche); ^dFarilup500 (Terrena); ^eAquatex (sotexpro); ^fSouthern hemisphere (Sopropêche); ^gRoquette; ^hMineral premix (g or mg kg^{−1} diet): calcium carbonate (40% Ca), 4.3 g; magnesium oxide (60% Mg), 2.48 g; ferric citrate (21% Fe), 0.4 g; potassium iodide (76% I), 0.8 mg; zinc sulfate (36% Zn), 0.08 g; copper sulfate (25% Cu), 0.6 g; manganese sulfate (33% Mn), 0.06 g; dibasic calcium phosphate (23% Ca, 18%P), 10 g; cobalt sulfate, 0.4 mg; sodium selenite (46% Se), 0.6 mg; KCl, 1.8 g; NaCl, 0.8 g; ⁱVitamin premix (IU or mg kg^{−1} diet): DL- α -tocopherol acetate, 120 IU; sodium menadione bisulphate, 10 mg; retinyl acetate, 30,000 IU; DL-cholecalciferol, 6,000 IU; thiamine, 30 mg; riboflavin, 60 mg; pyridoxine, 30 mg; B12, 0.1 mg; nicotinic acid, 350 mg; folic acid, 1 g; inositol, 2 g; biotin, 5 mg; calcium pantothenate, 0.1 g; choline chloride, 4 g; *Free amino acid (% of the diet): Arginine, 0.07%; Cysteine, 0%; Histidine, 0.42%; Isoleucine, 0.30%; Leucine, 0.77%; Lysine, 1.36%; DL-methionine 0.55%; Phenylalanine, 0.5%; Threonine, 0.81%; Tryptophan, 0.07%; Tyrosine, 0.45%; Valine, 0.54%; Alanine, 0.97%; Aspartic acid, 0.51%; Glutamic acid, 0.45%; Glycine, 1.20%; Proline, 0.52%; Serine, 0.5% (Evonik); **Free amino acid (% of the diet): Arginine, 0.07%; Cysteine, 0%; Histidine, 0.42%; Isoleucine, 0.30%; Leucine, 0.77%; Lysine, 1.36%; DL-methionine 0.0%; Phenylalanine, 0.5%; Threonine, 0.81%; Tryptophan, 0.07%; Tyrosine, 0.45%; Valine, 0.54%; Alanine, 1.10%; Aspartic acid, 0.58%; Glutamic acid, 0.51%; Glycine, 1.35%; Proline, 0.58%; Serine, 0.57%.

Technology); anti-LC3B (#2775, Cell Signaling Technology). All these antibodies have already been validated in rainbow trout^{24,28}.

To assess the levels of mitochondria-related proteins (TIMM23, mitofusin2, PARKIN, phospho-Ubiquitin (Ser65) and total Ubiquitin), tissues were homogenized by ultrasonic disruption in 9 vol of ice-cold buffer containing 50 mM Tris (pH 7.4), 5 mM EDTA, 2 mM 1,4-dithiothreitol, and a protease inhibitor cocktail (Sigma, St. Louis, MO; P-2714). Then, the homogenate was centrifuged, and the supernatant was used immediately for western blot analysis as described above and using the appropriate antibodies: anti-TIMM23 (#611222, BD Transduction LaboratoriesTM), anti-mitofusin2 (Mfn2) (#ab56889, abcam), anti-PARKIN (#ab15954, abcam), anti-phospho-Ubiquitin (Ser65) (Ser65, #ABS1513-I, EMD Millipore) and anti-total Ubiquitin (#MAB1510,

Genes	Forward primer	Reverse primer
GCN2-eif2α target genes		
<i>Asns</i>	CTGCACACGGTCTGGAGCTG	GGATCTCGTCTGGGATCAGGTT
<i>Ddit3</i>	CTGCACACGGTCTGGAGCTG	GGATCTCGTCTGGGATCAGGT
Antioxidant defence		
<i>sod1</i>	TGGTCCTGTGAAGCTGATTG	TTGTCAGCTCCTGCAGTCAC
<i>sod2</i>	TCCCTGACCTGACCTACGAC	GGCCTCCTCCATTAAACCTC
<i>gstπ</i>	TCGCTGACTGGACGAAAGGA	CGAAGGTCTCAACGCCATC
<i>gsr</i>	CTAAGCGCAGCGTCATAGTG	ACACCCCTGTCTGACGACAT
Mitochondrial synthesis		
<i>Pgc1α</i>	CCCCAGAGTCTCCAAATGAC	GGTGTGACACTGGGGTTC
Reference gene		
<i>eef1a1</i>	TCCTCTTGGTCGTTTCGCT	ACCCGAGGGACATCCTGTG

Table 2. Sequences of the primer pairs used in the quantitative real-time RT-PCR assays.

EMD Millipore). Before the use of each antibody, the amino acid sequence of the targeted protein was monitored in the SIGENAE database (<http://www.siginae.org>) to check for the conservation of the antigen sequence with the corresponding sequence from mammals, ensuring a good specificity of the mammalian antibody used in the analysis of the samples.

Enzyme activity. Livers collected 16 h after the meal were homogenised with a potter at 4 °C, in a buffer containing 0.1 M of triethanolamine, pH 7.3. The homogenate was then used for enzymatic assays. Protein concentration was measured using the Lowry's method.

Proteins (50–1500 μ g) were diluted in triethanolamine (0.1 M triethanolamine, pH 7.3) followed by spectrophotometric analysis of enzymatic activities at 37 °C using a spectrophotometer. Citrate synthase activity was measured at 412 nm ($\epsilon = 13,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) after the addition of 0.1 mM acetyl-CoA, 0.1 mM oxaloacetate, and 0.1 mM 5, 5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB). Succinate dehydrogenase (SDH or Complex II) activity was measured at 600 nm ($\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) after the addition of 0.1 mM phenazine methosulphate (PMS), 40 mM succinate, 0.1 mM dichlorophenolindophenol (DCPIP) and 40 mM malonate. The specific Complex II activity was defined as the flux difference before and after the addition of 40 mM malonate (Complex II inhibitor). NADH ubiquinone oxydo-reductase (Complex I) activity was measured at 340 nm ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) after the addition of 0.5 mM decylubiquinone, 4.05 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bovine serum albumin (BSA), 0.5 mM antimycin, 0.5 mM NADH and 12.5 μM rotenone. The specific Complex I activity was defined as the flux difference before and after the addition of rotenone (inhibitor of Complex I). Cytochrome *c* oxydase (Complex IV) was determined at 550 nm ($\epsilon = 18,500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) after the addition of 1 μM antimycin, and 100 μM cytochrome *c*. The specific Complex IV activity was defined as the flux difference before and after the addition of 1 mM KCN (inhibitor of Complex IV). Aconitase activity was measured using the Aconitase Enzyme Activity Assay kit (ab109712; Abcam; Cambridge, MA) according to manufacturer's instructions.

Catalase activity was assessed using an Oroboros oxygraph. Catalase activity of homogenized tissues was followed by recording the oxygen production in the presence of 0.01% H_2O_2 and 1 μM antimycin to prevent the interfering mitochondrial oxygen consumption. All enzyme activities are expressed as percentage of control condition, apart from Catalase which was expressed as O_2 flux $\text{pmol/s}\cdot\text{ml}\cdot\text{mg}$.

Quantitative RT-PCR analyses. Quantitative RT-PCR analyses were performed on liver of fish sampled at 2 and 16 h after the last meal. The protocol conditions for sample preparation and quantitative RT-PCR have been previously published^{28,29}. The primers used for real-time RT-PCR assays are listed in Table 2. Primers of *peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α* (*pgc1 α*), were newly designed using Primer3 software. For the expression analysis, relative quantification of target gene expression was done using the ΔCT method described by³⁰. The relative gene expression value of *eukaryotic translation elongation factor 1 α 1* (*eef1a1*) was used for the normalization of the measured expression values of the target mRNA, and it was found to not change significantly over sampling time or among dietary treatments (data not shown).

Determination of oxidative status. Protein carbonyls and glutathione levels were measured in fish liver sampled 16 h after the last meal ($N = 6/\text{diet}$). Samples were prepared and analyzed for protein carbonyls according to the manufacturer's protocol (Millipore; Oxyblot Protein Oxidation Detection Kit S 7150). Protein quantification was carried out with the Odyssey software expressing the ratio of DNPH-derivatized proteins/ β -tubulin (TUBB) of the liver.

Oxidized glutathione (GSSG) and reduced glutathione (GSH) were measured in fish liver homogenates using Cayman glutathione assay kit (Bertin Pharma) according to the manufacturer's instructions.

Determination of mitochondrial DNA. DNA isolation was performed on fish liver sampled 16 h after the last meal ($N = 6/\text{diet}$) following the procedures previously outlined in Liu *et al.*³¹. mtDNA copy number was determined using quantitative PCR. Gene abundance was detected as described above in quantitative RT-PCR section. mtDNA copy number (mitochondrially encoded tRNA leucine 1^{UUA/G}: Forward primer: AAAACAGACAAGGGGGCACA, Reverse primer: AGGGTGAGGAAAGCAACTGC) was normalized to

	CTL		MD	
	Mean	SEM	Mean	SEM
Initial body weight(g)	63.97	1.53	61.14	1.26
Final body weight (g)	137.33 ^a	3.77	99.97 ^b	3.49
Daily growth index (%/d)	3.63 ^a	0.29	2.13 ^b	0.11
Feed intake (%body weight/d)	1.86	0.02	1.93	0.09
Feed efficiency	1.19 ^a	0.07	0.75 ^b	0.01
HSI	0.94 ^a	0.02	1.75 ^b	0.01
Plasma methionine level (mg/ml)	2.31 ^a	0.65	0.06 ^b	0.01

Table 3. Effect of methionine restriction in rainbow trout on weight (g), feed intake (% body weight/d), feed efficiency, hepatosomatic index (HSI) and 16 h postprandial plasma methionine level. CTL, control diet; MD, methionine deficient diet. Daily growth index = $100 \times (\text{mean final body mass}^{1/3} - \text{mean initial body mass}^{1/3})/\text{day}$. Feed intake = $100 \times \text{the total amount of ingested feed (kg) divided by the mean biomass over the experimental period ((initial biomass + final biomass)/2)}$, expressed as kg wet mass and the number of days. Feed efficiency = $\text{Gain in total biomass [(final biomass - initial biomass) (kg wet mass)] divided by the amount of ingested dry matter (kg DM)}$. HSI = $(\text{liver weight/total body weight}) \times 100$. ^{a,b}Mean values with unlike superscript letters were significantly different among the two dietary groups ($P < 0.05$; t-test).

Beta-2-macroglobulin genomic DNA in the sample (Forward primer: TCATCGCTGCAGGTGTGTAT, Reverse primer: TAAATATCGCCAGCCAAAC). Primers of the MT-TL1 and beta 2 M genes were newly designed using Primer3 software and the obtained amplicons were purified and sequenced (Beckman-Coulter Genomics, Takeley, UK).

Electron microscopy. For electron microscopy, fresh liver blocks, sampled 4 h after the last meal (1 mm³) ($N = 3/\text{diet}$) were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), and post-fixed in 1% osmium tetroxide in phosphate buffer. Conditions of both the treatments of ultrathin sections and observations were already described in Seiliez *et al.*²⁸.

Statistical analyses. Data are expressed as means $\pm$ SEM. Normality was assessed using the Shapiro–test, while the equality of variances was determined using Levene’s test. When the normality and/or equal variances of data were respected, Student’s t-test was used for comparison of data between fish fed CTL diet and fish fed MD diet. In contrast, when data did not meet the assumptions of normality and/or equal variances, Wilcoxon test was used to compare data from the two groups. Statistical analyses of the mRNA levels of the genes *Asns* and *ddit3* were carried out using two-way ANOVA. Statistical analyses were performed using R software. For all statistical analyses, the level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Growth performance. At the end of the feeding trial, the final body weight and feed efficiency (but not the feed intake) were significantly lower in fish fed the MD diet than in those fed the CTL diet (Table 3). Hepatosomatic index (HSI), *i.e.* the liver to body weight ratio, used as a marker of methionine deficiency stress, significantly increased in methionine deficiency group. Moreover, as expected, plasma levels of methionine were significantly lower in trout fed the MD compared to the CTL diet (2.31 vs 0.06).

Effect of methionine deficiency on key factors of the nutrient sensing pathways mTOR and GCN2/eIF2 α . As shown in Fig. 1 (panels A and B), the phosphorylation of the two mTOR effectors RPS6K1 and EIF4EBP1 were not different among the two dietary groups. In contrast, the phosphorylation of eIF2 α as well as the mRNA levels of its two target genes *asns* and *ddit3* (analysed 2 h and 16 h after the last meal), were significantly increased in fish fed the MD diet compared to the control group (Fig. 1C–E). These results indicated that the methionine deficiency was efficiently sensed at the cellular level in fish fed the MD diet.

Methionine deficiency decreases the hepatic oxidative status. Considering that methionine is involved in the antioxidant defence system, we measured several oxidative stress markers. A drop in Aconitase activity has been described in abnormal situations, such as increased oxidative stress. Here, the activity of Aconitase was not significantly impacted by the methionine level in the diet (Fig. 2A). However, interestingly, hepatic glutathione levels of both reduced (GSH) and oxidized (GSSG) forms were significantly lower in fish fed the MD compared to the CTL diet (Fig. 2B). The content of GSH and GSSG were decreased respectively by 1.2 and 1.7 folds, which resulted in a higher GSH/GSSG ratio in MD than CTL groups (Fig. 2C), supporting a decrease of the oxidative status in fish fed the MD diet. In agreement with these results, the level of protein carbonyls, which is a marker of protein oxidation, was significantly lower in the liver of fish fed the MD diet compared to the control fish (Fig. 2D).

Methionine deficiency has no impact on antioxidant defence. In order to investigate if the observed decrease of oxidative status in fish fed the MD diet was due to an increase of antioxidant defence, we assessed the mRNA levels of four genes involved in antioxidant defence: mitochondrial *superoxide dismutase 2* (*sod2*); cytosolic *superoxide dismutase 1* (*sod1*), *glutathione-disulfide reductase* (*gsr*) and *glutathione-S-transferase* π (*gst\pi*). As

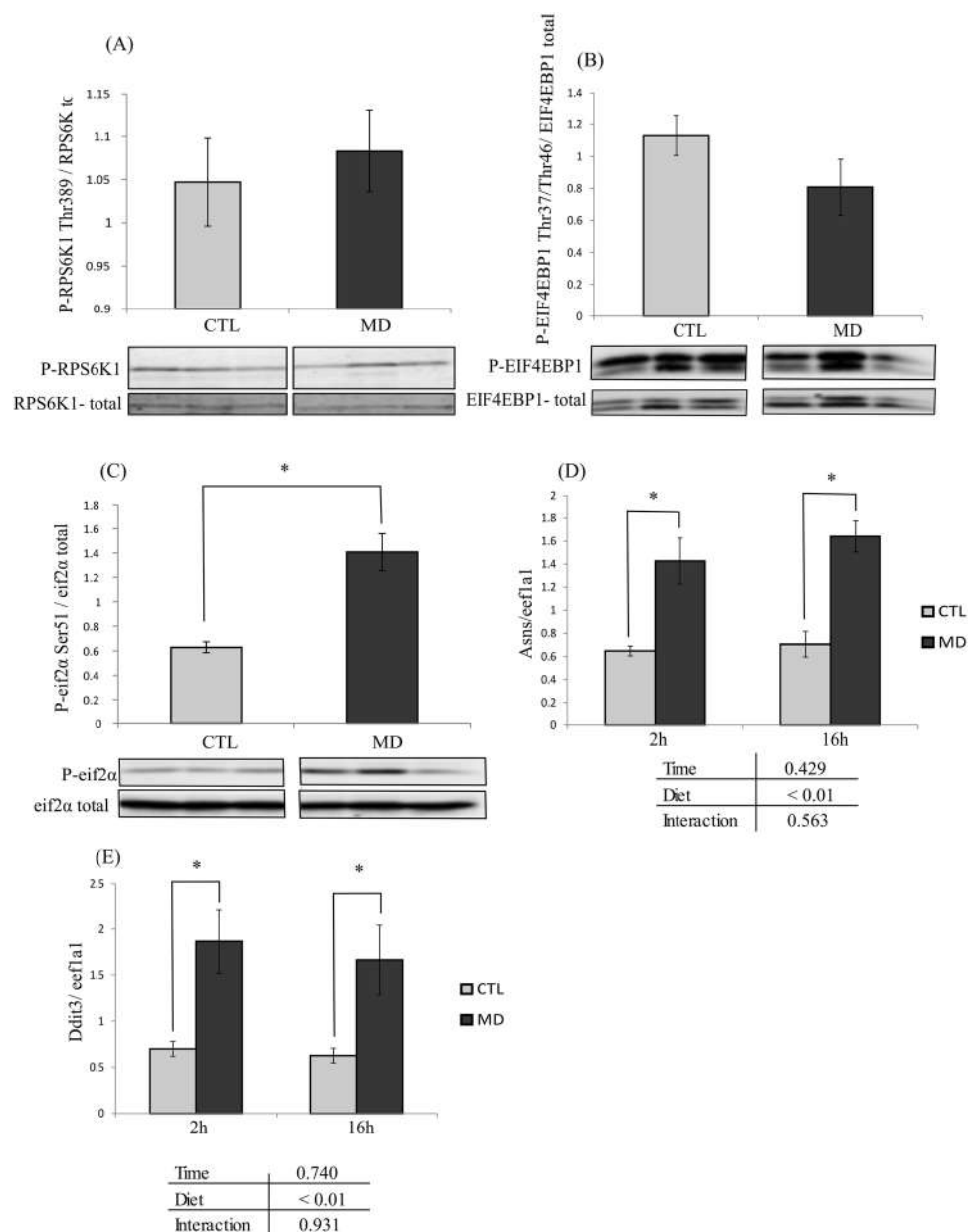


Figure 1. Effect of methionine deficiency on key factors of the mTOR and GCN2/eIF2 α signaling pathways. Phosphorylation of (A), ribosomal protein S6 kinase 1 (RPS6K1) (B) eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 (EIF4EBP1) and (C) eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α) proteins in liver of trout fed the control diet (CTL) or the methionine deficient diet (MD) and sampled 2 h after the last meal. Western blot analysis was carried out on six individual samples per treatment, and a representative blot is shown (Source data for each blot are available in Supplementary Fig. 1). Graphs show the ratio of the amount of the phosphorylated protein: the total amount of the targeted protein. The mRNA levels of (D) *asparagine synthetase* (*asns*) and (E) *DNA-damage inducible transcript 3* (*ddit3*) were measured using quantitative real-time RT-qPCR assays in liver 2 and 16 h after the last meal. Expression values are normalized with the *eukaryotic translation elongation factor 1 α 1* (*eef1a1*) mRNA. Values are means (n = 6), with standard error of the mean represented by vertical bars. * was used to indicate significant difference between treatment among the two dietary group (P < 0.05; one-way ANOVA followed by the student-Newman-Keuls multiple-comparison test).

shown in Fig. 3, the levels of *sod1*, *sod2*, *gst π* and *gst α* transcripts were not different among the two dietary groups. Moreover, we measured the activity of the anti-oxidant enzyme Catalase and observed no significant differences among the two dietary groups. All these results suggested that methionine deficiency do not impact the antioxidant defence system.

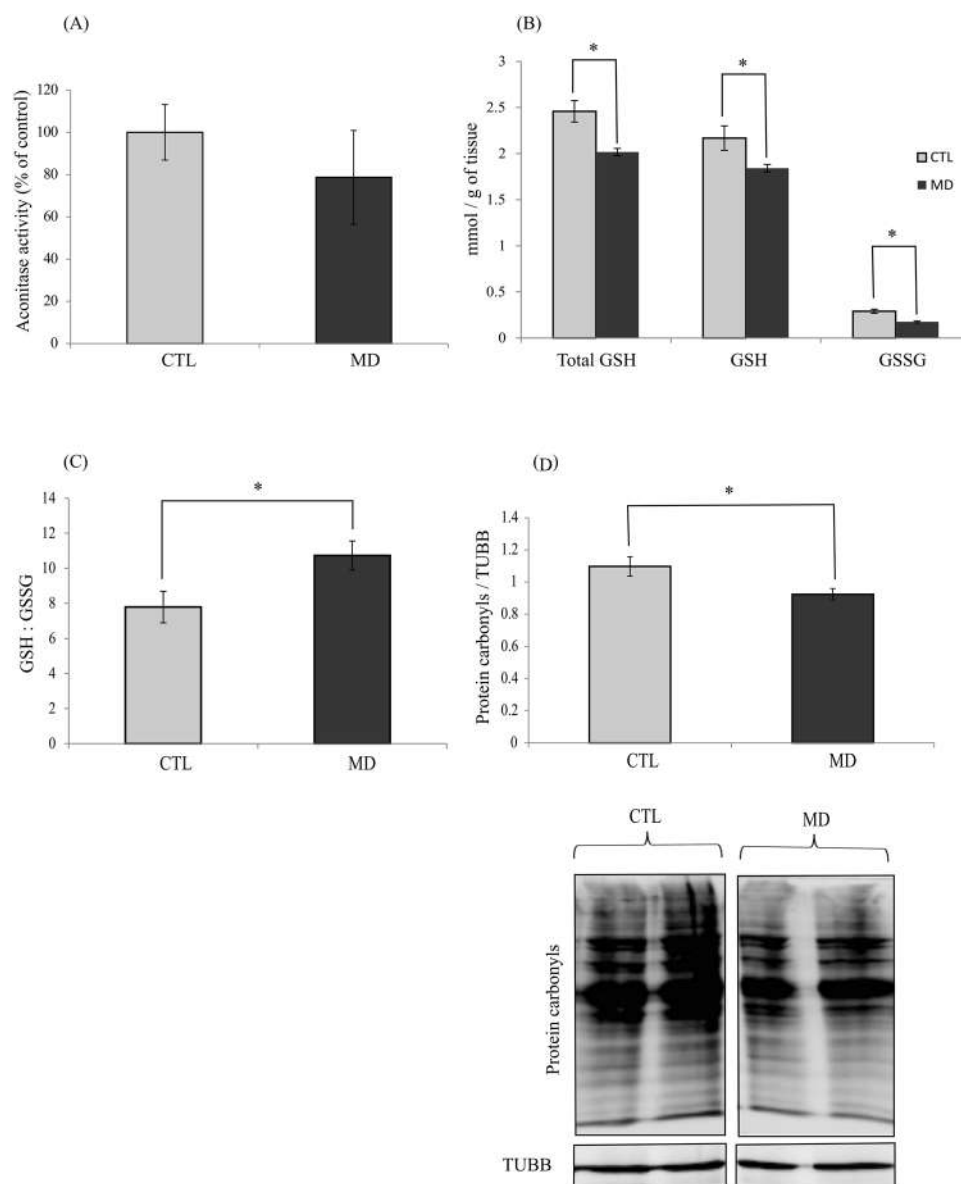


Figure 2. Methionine deficiency decreases the oxidative status. (A) Aconitase activity, (B) quantity of total glutathione (total GSH), reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG), (C) ratio GSH/GSSG, (D) levels of protein carbonyls in liver of trout fed control diet (CTL) or deficient diet (MD) and sampled 16 h after the last meal. Levels of protein carbonyls were measured by Oxyblot. DNP-derivatized liver tissue lysates were analysed by Western blot for the presence of oxidized protein. Western blot analysis was carried out on six individual samples per treatment, and a representative blot is shown (Source data are available in Supplementary Fig. 2). Graphs show the ratio of the amount of the oxidized protein: β -tubulin (TUBB) used as a loading control. Values are means ($n = 6$), with standard error of the mean represented by vertical bars. *was used to indicate significant difference between treatment among the two dietary group ($P < 0.05$; t-test).

Methionine deficiency has an impact on oxidative phosphorylation and induce energetic stress. Mitochondria are commonly described as an important source of ROS generation through electron leakage from their respiratory chain. Therefore, we assessed activities of different complexes of the respiratory chain (I, II and IV). As shown in Fig. 4A activity of Complex II was not impacted by methionine deficiency. In contrast, activities of both the Complex I and IV decreased in fish fed the MD diet compared to those of fish fed the CTL diet. Moreover, we observed an increase of the phosphorylation of the energy sensing factor AMPK in the liver of fish fed the MD diet supporting a fall in the energy status in this condition (Fig. 4B).

Methionine deficiency and mitochondrial mass. In order to determine whether the observed fall of the activity of the OXPHOS complexes I and IV as well as of the phosphorylation of AMPK were due to a decrease in mitochondrial mass, we measured four mitochondrial markers: the relative mitochondrial DNA copy number, the levels of TIMM23 (a protein located in mitochondrial inner membrane), the activity of citrate synthase

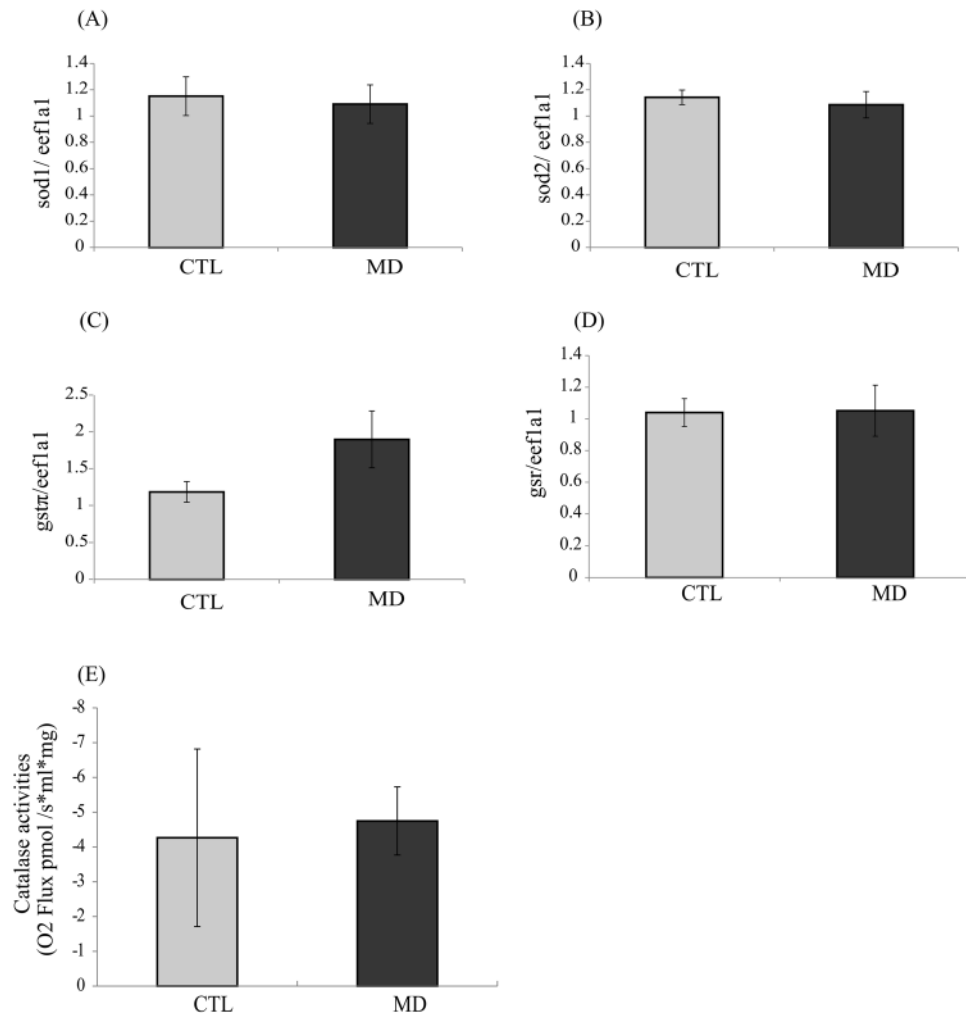


Figure 3. Methionine deficiency has no impact on antioxidant defence. The mRNA levels of (A) *superoxide dismutase 1 (sod1)*, (B) *superoxide dismutase 2 (sod2)*, (C) *glutathione-S-transferase π (gst π)* and (D) *glutathione-disulfide reductase (gsr)* were measured using quantitative real-time RT-qPCR assays in liver of trout fed control (CTL) or methionine deficient diet (MD) and sampled 16 h after the last meal. Expression values were normalized with the *eukaryotic translation elongation factor 1 α 1 (eef1a1)* mRNA. Catalase activity (E) was measured by oxygraph 16 h after the last meal. Values are means ($n = 6$), with standard error of the mean represented by vertical bars. *was used to indicate significant difference between treatment among the two dietary group ($P < 0.05$; t-test).

(involved in the citric acid cycle and localized in the mitochondrial matrix) and the mRNA levels of the *peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (pgc1 α)* which is considered to be a major regulator of mitochondrial biogenesis. The obtained results show that the relative mitochondrial DNA copy number was not different among the two dietary groups (Fig. 5A). In contrast, fish fed the MD diet exhibited a significant decrease of TIMM23, citrate synthase activity and *pgc1 α* mRNA levels (Fig. 5B–D). Together, these data support a disturbance in the mitochondrial function rather than a fall of the mitochondrial mass in liver of fish fed the MD diet.

Methionine deficiency lead to induction of mitophagy. Transmission electron microscopy on liver samples revealed a sharp increase of mitochondria engulfed and/or being engulfed inside autophagosome-related vacuoles (a process called mitophagy) in fish fed the MD diet (Fig. 6B–E). Moreover, we also found that the total number of autophagosome-related vacuoles (with and without mitochondria) was most abundant in the liver of fish fed the MD diet (Fig. 6F). Accordingly, the autophagosomal marker LC3-II exhibited significantly higher levels in trout fed the MD diet (Fig. 6G). Overall, these results suggested that methionine deficient diet lead to increase mitochondrial degradation via mitophagy.

Effect of methionine deficiency on the PINK1/PARKIN axis. PINK1 (PTEN induced putative kinase 1)/PARKIN (parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase) axis is considered as a major pathway of mitophagy regulation³². Induction of this pathway has been shown to correlate with an increase of ubiquitin phosphorylation at Ser65 (p-S65-Ub) and a decrease of the level of the PARKIN-target protein Mfn2³³. As shown in Fig. 7A–C, there

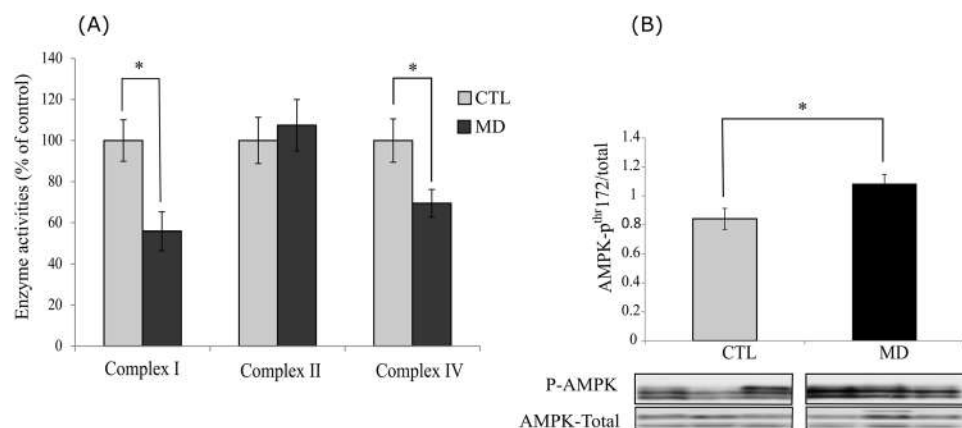


Figure 4. Methionine deficiency affects oxidative phosphorylation and induces energetic stress **(A)**. Activities of Complex I, Complex II and Complex IV of OXPHOS system in the liver of trout fed the control diet (CTL) or the methionine deficient diet (MD) and sampled 16 h after the last meal. Analysis was carried out on six individual samples per treatment. **(B)** Phosphorylation of AMPK in the liver of trout fed the control diet (CTL) or the methionine deficient diet (MD) and sampled 16 h after the last meal. Western blot analysis was carried out on six individual samples per treatment, and a representative blot is shown (Source data are available in Supplementary Fig. 3). Graph show the ratio of the amount of the phosphorylated protein: the total amount of the targeted protein. Values are means (n = 6), with standard error of the mean represented by vertical bars. *was used to indicate significant difference between treatment among the two dietary group ($P < 0.05$; t-test).

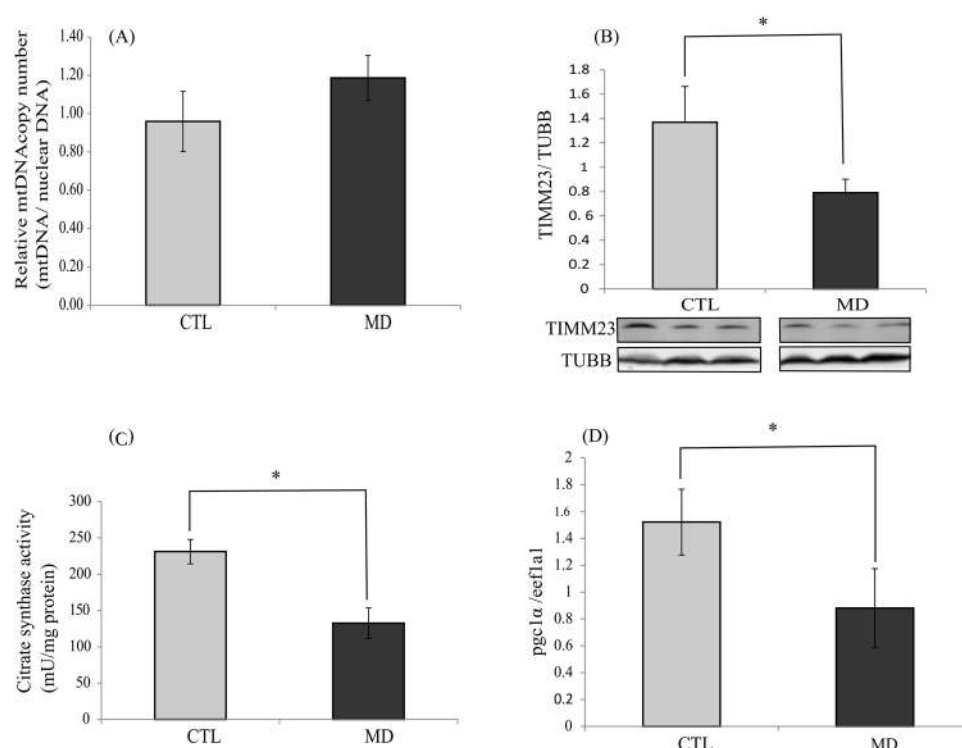


Figure 5. Methionine deficiency and mitochondrial mass. **(A)** Relative mtDNA copy number in the liver of trout fed the control diet (CTL) or the methionine deficient diet (MD) and sampled 16 h after the last meal. **(B)** TIMM23 levels in the liver of trout fed the control diet (CTL) or the methionine deficient diet (MD) and sampled 16 h after the last meal. Western blot analysis was carried out on six individual samples per treatment, and a representative blot is shown (Source data are available in Supplementary Fig. 4). Graphs show the ratio of the amount of TIMM23: β -tubulin (TUBB) used as a loading control. **(C)** Citrate synthase activity in the liver of trout fed the control diet (CTL) or the methionine deficient diet (MD) and sampled 16 h after the last meal. Analysis was carried out on six individual samples per treatment. **(D)** mRNA level of *pgc1α* in the liver of trout fed the control diet (CTL) or the methionine deficient diet (MD) and sampled 16 h after the last meal. Expression values are normalized with the *eukaryotic translation elongation factor 1 α 1* (*efl1α*) mRNA. Values are means (n = 6), with standard error of the mean represented by vertical bars. *was used to indicate significant difference between treatment among the two dietary group ($P < 0.05$; t-test or Wilcoxon test).

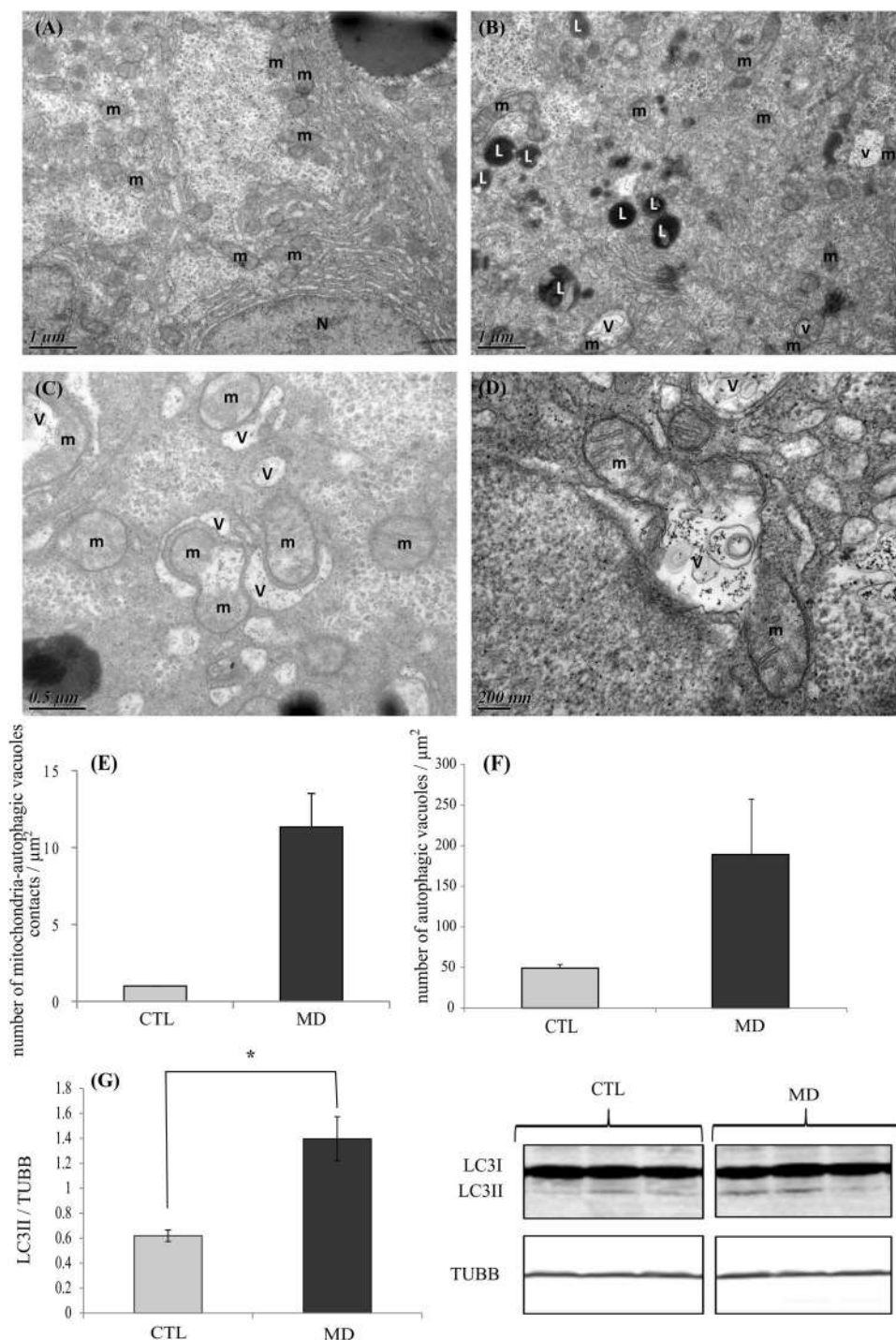


Figure 6. Methionine deficiency lead to induction of mitophagy. Electron microscopy (EM) analysis of liver section of trout fed the control diet (CTL) or the methionine deficient diet (MD). Picture (A) represents liver sections of trout fed MD diet and picture (B–D) liver section of trout fed deficient diet. N, nucleus; m, mitochondria; v, autophagic vacuoles and L, lysosome. Mitophagy is demonstrated by the presence of mitochondria engulfed and/or being engulfed inside autophagosome-related vacuoles. The graph (E) represents the quantity of mitochondria-autophagic vacuoles in contact and (F) the quantity of autophagic vacuoles per μm^2 in the EM images ($n = 3$ samples with 8 to 10 micrographs per sample). (G) LC3II protein in liver of trout fed CTL diet or MD diet and sampled 4 h after the last meal. Western blot analysis was carried out on six individual samples per treatment, and a representative blot is shown (Source data are available in Supplementary Fig. 5). Graphs show the ratio of the amount of LC3II: β -tubulin (TUBB) used as a loading control. Values are means ($n = 6$), with standard error of the mean represented by vertical bars. * was used to indicate significant difference between treatment among the two dietary group ($P < 0.05$; t-test or Wilcoxon test).

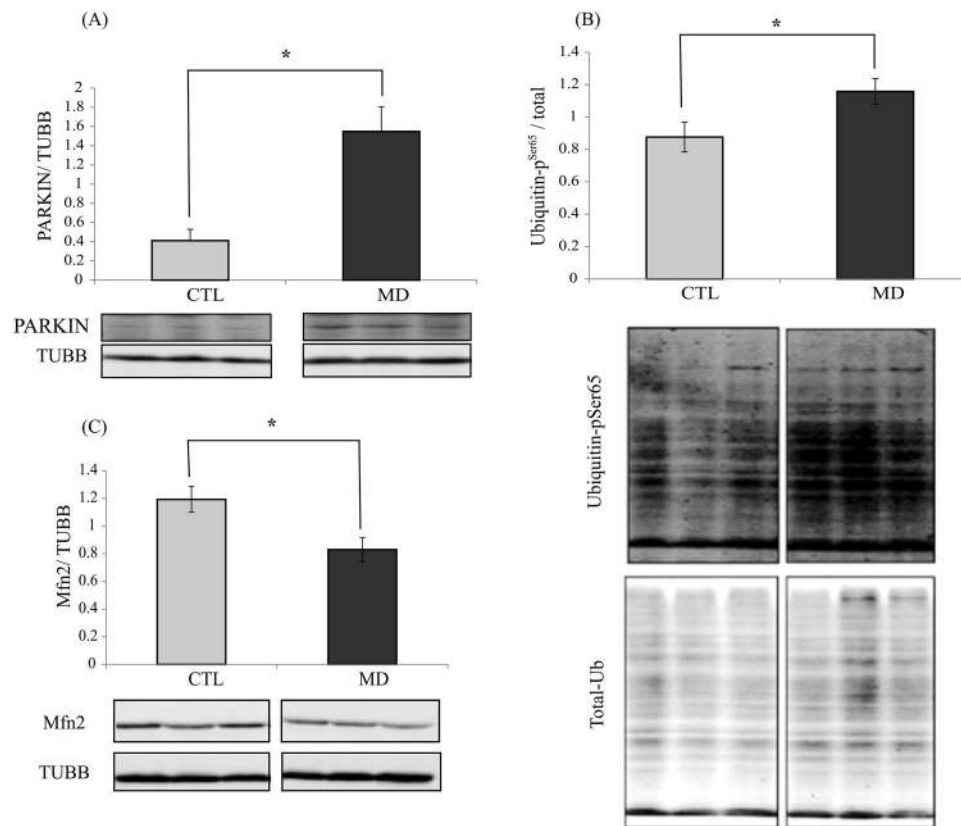


Figure 7. Methionine deficiency leads to induction of the PINK1/PARKIN axis. Western blot analysis of (A) PARKIN, (B) Ubiquitin-p^{Ser65} and (C) Mfn2 in the liver of trout fed the control diet (CTL) or methionine-deficient diet (MD) and sampled 16 h after feeding the last meal. Western blot analysis was carried out on six individual samples per treatment, and a representative blot is shown (Source data for each blot are available in Supplementary Figs 6 and 7). Graphs show the ratio of the targeted protein: β -tubulin (TUBB) or the total amount of the targeted protein used as a loading control. Values are means ($n = 6$), with standard error of the mean represented by vertical bars. *was used to indicate significant difference between treatment among the two dietary group ($P < 0.05$; t-test).

were large and significant increases of both PARKIN and p-S65-Ub levels, and a concomitant decrease of Mfn2 in the liver of fish fed the MD diet at 16 h post-feeding. Thus, these results identified the PINK1/PARKIN axis as a possible mechanism involved in the observed induction of mitophagy by methionine deficiency.

Discussion

The precise determination of the role of methionine in farmed fish represents an essential objective for aquaculture industry. In this context, the aim of the present study was to clarify and expand our knowledge on the impact of methionine deficiency on the hepatic oxidative status in rainbow trout and identify the underlying mechanisms.

We found that rainbow trout fed the MD diet did not increase their feed intake (compared with the CTL group) to offset the insufficient amount of methionine provided 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 MD diet than in those fed the CTL diet. These results are in accordance with the previously described effects of methionine availability on growth and feed utilisation in fish^{24,34–36}. Also, and as expected, fish fed the MD diet exhibited a significant decrease of plasma methionine levels and a concomitant activation of the GCN2-eIF2 α pathway in the liver (revealed by the increase of both the phosphorylation of eIF2 α and the mRNA levels of the two target genes *Asns* and *ddit3*), indicating that the methionine deficiency was sensed at both tissue and cellular levels, in line to previous findings obtained in rainbow trout^{24,37}. In contrast, the phosphorylation of the two mTOR effectors RPS6K1 and EIF4EBP1 were not different among the two dietary groups, in agreement with previous results showing that a dietary methionine deficiency of 32% was not able to lower the activation of the mTOR signaling pathway in trout³⁷. Overall, these results confirm the previously described effect of methionine availability and provide a relevant material for studying the effect of methionine deficiency on oxidative status in liver.

Here, we observed that dietary methionine deficiency impacted the levels of important markers of the oxidative status (increase of GSH/GSSG ratio associated to a decrease of protein carbonyls) in the liver of trout, without affecting the expression and/or activity of the major antioxidant factors. These results are in line with previous findings demonstrating that methionine restriction decreases mitochondrial ROS production in the liver of rat

and pig^{21,38}. According to these authors, dietary methionine restriction decreases mitochondrial ROS generation by inhibiting the activity of the respiratory Complex I. In our case, the dietary methionine deficiency induced a more general mitochondrial defect, as shown by the decrease of the level and/or activity of several mitochondrial factors (OXPHOS Complexes I and IV, TIMM23, citrate synthase) in the liver. This is further supported by the increase of the phosphorylation of the energy sensing factor AMPK in the liver of fish fed the MD diet, that indicate a fall in the energy status. However, the relative mitochondrial DNA copy number was not different among the two dietary groups, indicating that the mitochondrial mass was not yet impacted at the monitored time and/or the tested methionine deficiency. Together, these results show that dietary methionine deficiency induced a general mitochondrial defect in the liver of rainbow trout. At first sight, these results might seem surprising in the light of the numerous previous studies having demonstrated the antioxidant properties of methionine in several species including rainbow trout^{39–44}. However, we cannot rule out the possibility of an increase of ROS production in methionine deficient condition earlier in the feeding trial that would induce the observed mitochondrial defects and the associated decrease of the oxidative status at 6 weeks.

The accumulation of damaged mitochondria could affect the cell. To maintain cellular homeostasis, eukaryotes have developed a mechanism to eliminate damaged or undesirable mitochondria through macroautophagy of the mitochondria, known as mitophagy³³. Macroautophagy is an evolutionarily conserved process in eukaryotes by which cytoplasmic cargo sequestered inside double-membrane vesicles or autophagosome are delivered to the lysosome for degradation⁴⁵. Two types of macroautophagy have been identified: non-selective autophagy and selective autophagy which consist in specifically degrading a type of organelle such as mitochondria⁴⁶. Here, we observed by transmission electron microscopy an increase of the number of mitochondria engulfed and/or being engulfed inside autophagosome-related vacuoles in the liver of fish fed the MD diet, supporting a rise of mitophagy in this condition. In order to strengthen these data and precise the underlined mechanisms, we monitored the levels of several factors involved in the PINK1/PARKIN axis which is considered as a major pathway of mitophagy regulation⁴⁷. Briefly, under mitochondrial damage, PINK1 accumulates on mitochondrial outer membrane to further recruit PARKIN and promotes phosphorylation of both S65 on PARKIN's Ubiquitin-like domain and the conserved S65 residue on ubiquitin itself³³. PARKIN mediated ubiquitination of mitochondrial outer membrane proteins would recruit autophagosomal membrane to recognize and surround these marked mitochondria for mitophagosome formation⁴⁸. Several PARKIN substrates have been identified, including Mfn2 involved in mitochondrial fusion^{33,49}. After the ubiquitination of Mfn2 by PARKIN, this protein is degraded by the proteasome to arrest mitochondrial fusion⁴⁹. Here, we observed a significant increase of both PARKIN and p-S65-Ub levels, and a concomitant decrease of Mfn2 in the liver of fish fed the MD diet. Overall, the obtained results identified mitophagy as well as the PINK1/PARKIN axis as possible underlying mechanism at play to remove affected mitochondria in the liver of fish fed the methionine deficient diet.

In conclusion, the obtained results showed that feeding rainbow trout with a diet deficient in methionine for 6 weeks results in a drop of growth performances associated to both a general mitochondrial defect and a decrease of the oxidative status in the liver. The obtained results also revealed a sharp increase of mitophagy in these conditions and emphasized the involvement of the PINK1/PARKIN axis in this event. To our knowledge, little if no attention has been paid before to the nutritional regulation of mitophagy and the related mechanisms remain far from being understood and are worth investigating. From a practical aquaculture point of view, we demonstrated that methionine availability in the diet is essential for mitochondrial integrity and can be a trail for understand the decrease of growth in fish fed the MD diet. In the future, another important issue will be to understand how methionine deficiency impact mitochondrial integrity.

References

1. *Contributing to food security and nutrition for all*. (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016).
2. Naylor, R. L. *et al.* Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 15103–15110 (2009).
3. Carter, C. G. & Hauler, R. C. Fish meal replacement by plant meals in extruded feeds for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture* **185**, 299–311 (2000).
4. Gatlin, D. M. *et al.* Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquac. Res.* **38**, 551–579 (2007).
5. Gomes, E. F., Rema, P. & Kaushik, S. J. Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): digestibility and growth performance. *Aquaculture* **130**, 177–186 (1995).
6. Kaushik, S., Hemre, G. & Lie, Ø. Plant proteins as alternative sources for fish feed and farmed fish quality. *Improv. Farmed Fish Qual. Saf.* 300–327 (2008).
7. Elmada, Cz. *et al.* The effect of dietary methionine on growth, antioxidant capacity, innate immune response and disease resistance of juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquac. Nutr.* **22**, 1163–1173 (2016).
8. Tesseraud, S., Métayer Coustard, S., Collin, A. & Seiliez, I. Role of sulfur amino acids in controlling nutrient metabolism and cell functions: implications for nutrition. *Br. J. Nutr.* **101**, 1132–1139 (2009).
9. Levine, R. L., Berlett, B. S., Moskovitz, J., Mosoni, L. & Stadtman, E. R. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech. Ageing Dev.* **107**, 323–332 (1999).
10. Wu, P.-F. *et al.* Protection of l-methionine against H₂O₂-induced oxidative damage in mitochondria. *Food Chem. Toxicol.* **50**, 2729–2735 (2012).
11. Brosnan, J. T. & Brosnan, M. E. The Sulfur-Containing Amino Acids: An Overview. *J. Nutr.* **136**, 1636S–1640S (2006).
12. Council, N. R. *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. (The National Academies Press, 2011).
13. Jong, C. J., Azuma, J. & Schaffer, S. Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: prevention of mitochondrial oxidant production. *Amino Acids* **42**, 2223–2232 (2012).
14. Métayer, S. *et al.* Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status. *J. Nutr. Biochem.* **19**, 207–215 (2008).
15. Obled, C., Papet, I. & Breuille, D. Sulfur-containing amino acids and glutathione in diseases. *Metab. Ther. Asp. Amino Acids Clin. Nutr. CRC* 667–687 (2004).
16. Reid, M. & Jahoor, F. Glutathione in disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **4**, 65–71 (2001).
17. Sanchez-Roman, I. *et al.* Forty percent methionine restriction lowers DNA methylation, complex I ROS generation, and oxidative damage to mtDNA and mitochondrial proteins in rat heart. *J. Bioenerg. Biomembr.* **43**, 699–708 (2011).

18. Caro, P. *et al.* Forty percent and eighty percent methionine restriction decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology* **9**, 183–196 (2008).
19. Caro, P. *et al.* Forty Percent Methionine Restriction Decreases Mitochondrial Oxygen Radical Production and Leak at Complex I During Forward Electron Flow and Lowers Oxidative Damage to Proteins and Mitochondrial DNA in Rat Kidney and Brain Mitochondria. *Rejuvenation Res.* **12**, 421–434 (2009).
20. Naudí, A. *et al.* Methionine restriction decreases endogenous oxidative molecular damage and increases mitochondrial biogenesis and uncoupling protein 4 in rat brain. *Rejuvenation Res.* **10**, 473–484 (2007).
21. Sanz, A. *et al.* Methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical generation and leak as well as oxidative damage to mitochondrial DNA and proteins. *FASEB J.* **20**, 1064–1073 (2006).
22. Sanchez-Roman, I. & Barja, G. Regulation of longevity and oxidative stress by nutritional interventions: role of methionine restriction. *Exp. Gerontol.* **48**, 1030–1042 (2013).
23. Perrone, C. E., Malloy, V. L., Orentreich, D. S. & Orentreich, N. Metabolic adaptations to methionine restriction that benefit health and lifespan in rodents. *Exp. Gerontol.* **48**, 654–660 (2013).
24. Belghit, I. *et al.* Dietary methionine availability affects the main factors involved in muscle protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nutr.* **112**, 493–503 (2014).
25. Llames, C. R. & Fontaine, J. Determination of amino acids in feeds: collaborative study. *J. AOAC Int.* **77**, 1362–1402 (1994).
26. Chemists, A. A. Official methods of analysis. *Vol 15th Ed AOAC Arlengt.* VA (1990).
27. European Commission. 2009/150/EC Commission regulation laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. *J Eur Union* **L54**, 1–130 (2009).
28. Seiliez, I. *et al.* Looking at the metabolic consequences of the colchicine-based *in vivo* autophagic flux assay. *Autophagy* **12**, 343–356 (2016).
29. Fontagné-Dicharry, S. *et al.* Influence of the forms and levels of dietary selenium on antioxidant status and oxidative stress-related parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Br. J. Nutr.* **113**, 1876–1887 (2015).
30. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & Dempfle, L. 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 (2002).
31. Liu, J. *et al.* Long-term programming effect of embryonic hypoxia exposure and high-carbohydrate diet at first feeding on glucose metabolism in juvenile rainbow trout. *J. Exp. Biol.* **220**, 3686–3694 (2017).
32. Kubli, D. A. & Gustafsson, Å. B. Mitochondria and Mitophagy: The Yin and Yang of Cell Death Control. *Circ. Res.* **111**, 1208–1221 (2012).
33. Youle, R. J. & Narendra, D. P. Mechanisms of mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 9–14 (2011).
34. Cowey, C. B. & Sivak, J. G. Methionine intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), relationship to cataract formation and the metabolism of methionine. *J. Nutr.* **122**, 1154 (1992).
35. Mambrini, M., Roem, A. J., Carvèdi, J. P., Lallès, J. P. & Kaushik, S. J. 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 (1999).
36. Rumsey, G. L., Page, J. W. & Scott, M. L. Methionine and Cystine Requirements of Rainbow Trout. *Progress. Fish-Cult.* **45**, 139–143 (1983).
37. Skiba-Cassy, S., Geurden, I., Panserat, S. & Seiliez, I. Dietary methionine imbalance alters the transcriptional regulation of genes involved in glucose, lipid and amino acid metabolism in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **454**, 56–65 (2016).
38. Ying, Y. *et al.* Dietary l-methionine restriction decreases oxidative stress in porcine liver mitochondria. *Exp. Gerontol.* **65**, 35–41 (2015).
39. Błaszczuk, I., Birkner, E. & Kasprczyk, S. Influence of methionine on toxicity of fluoride in the liver of rats. *Biol. Trace Elem. Res.* **139**, 325–331 (2011).
40. Castellano, R. *et al.* A methionine deficient diet enhances adipose tissue lipid metabolism and alters anti-oxidant pathways in young growing pigs. *PloS One* **10**, e0130514 (2015).
41. Fontagné-Dicharry, S., Alami-Durante, H., Aragão, C., Kaushik, S. J. & Geurden, I. Parental and early-feeding effects of dietary methionine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **469**, 16–27 (2017).
42. Richie, J. P. *et al.* Tissue glutathione and cysteine levels in methionine-restricted rats. *Nutrition* **20**, 800–805 (2004).
43. Ronchi, V. P. *et al.* Oxidative stress in mouse liver caused by dietary amino acid deprivation: protective effect of methionine. *J. Physiol. Biochem.* **66**, 93–103 (2010).
44. Tsai, C.-W. *et al.* Methionine restriction up-regulates the expression of the pi class of glutathione S-transferase partially via the extracellular signal-regulated kinase-activator protein-1 signaling pathway initiated by glutathione depletion. *Mol. Nutr. Food Res.* **54**, 841–850 (2010).
45. Klionsky, D. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **8**, 445–544 (2012).
46. Lemasters, J. J. Selective Mitochondrial Autophagy, or Mitophagy, as a Targeted Defense Against Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. *Rejuvenation Res.* **8**, 3–5 (2005).
47. Chan, N. C. *et al.* Broad activation of the ubiquitin–proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 1726–1737 (2011).
48. Wu, H., Wei, H., Sehgal, S. A., Liu, L. & Chen, Q. Mitophagy receptors sense stress signals and couple mitochondrial dynamic machinery for mitochondrial quality control. *Free Radic. Biol. Med.* **100**, 199–209 (2016).
49. Gegg, M. E. *et al.* Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 4861–4870 (2010).

Acknowledgements

The authors acknowledge EVONIK Industries and institutional funds from INRA for funding the present study and Agence National de la Recherche et de la Technologie (ANRT; France) for the scholarship to S. S. (CIFRE PhD Research Grant). Special thanks are due to all members of the Club d'Autophagie Bordelais (CAB) for discussions and helpful suggestions, Karine Dias, V. Véron, A. Surget and A. Hermann (INRA St Pée-sur-Nivelle) for technical assistance and the technical staff at the fish farm (F. Vallée, F. Terrier, A. Lanuque, F. Sandres).

Author Contributions

S.S., A.C.F.-S., S.P. and I.S. designed the research. S.S. conducted the analyses. The Electron microscopy analysis was done by B.S. in the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, member of the national infrastructure France BioImaging. All the mitochondrial associated enzymes activities were analysed by S.S. at the Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires (IBGC, CNRS, Bordeaux, France) under the supervision of A.M., S.S., B.S., N.C., A.M., S.P. and I.S. analysed the data. S.S. wrote the paper. I.S., S.P., S.F.-D. and A.C.F.-S. contributed to the manuscript correction. I.S. has primary responsibility for final content. All authors have read and approved the final manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28559-8>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

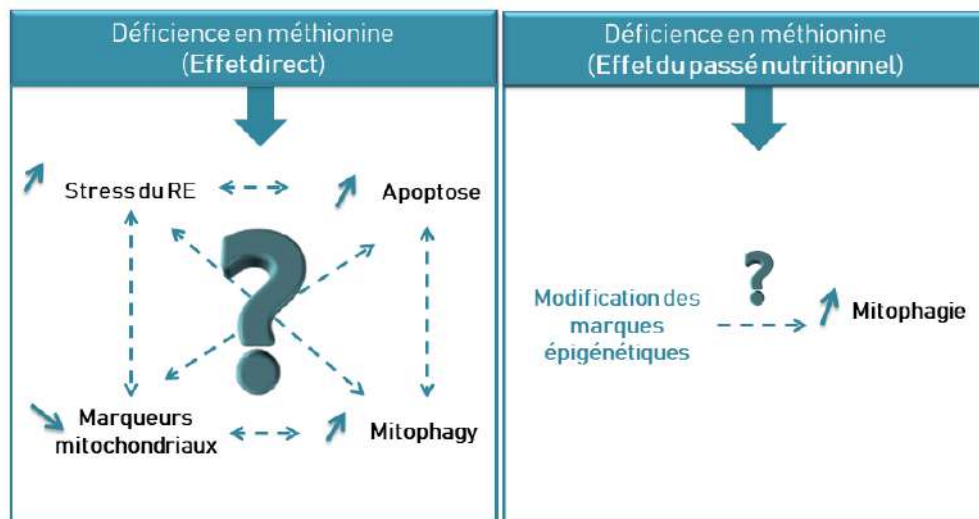
© The Author(s) 2018

PUBLICATION N°2: Alimentation précoce de la truite arc-en-ciel avec un régime déficient en méthionine pendant deux semaines : conséquences sur les mitochondries dans le foie des juvéniles

Objectifs

Cet article avait deux objectifs. Premièrement, confirmer qu'une déficience en méthionine peut impacter l'intégrité des mitochondries dans le foie des truites et déterminer les mécanismes mis en place. Deuxièmement, déterminer les conséquences à long terme de deux semaines de carence en méthionine au premier repas sur les mitochondries dans le foie des truites juvéniles.

Principaux résultats et conclusions



- Une déficience en méthionine induit à court terme dans le foie une baisse de plusieurs marqueurs mitochondriaux associée à une augmentation de la mitophagie ainsi qu'une induction d'un stress du RE et de l'apoptose.
- Deux semaines de déficience en méthionine au premier repas entraînent une programmation à long terme de la mitophagie qui est accompagnée d'une augmentation de la méthylation des histones H3K4me3 et H3K36me3 dans le foie des juvéniles.

Pour conclure, nous avons confirmé les précédents résultats obtenus sur l'effet d'une carence en méthionine sur l'intégrité mitochondriale et la mitophagie. En outre, ces données mettent en évidence, un lien étroit entre la mitophagie, le stress du RE et l'apoptose qui reste à préciser. Enfin, nous avons démontré pour la première fois qu'une déficience précoce en méthionine pouvait induire une programmation à long terme de la mitophagie, suggérant ainsi que la méthionine puisse être un important levier pour la programmation nutritionnelle.

**EARLY FEEDING OF RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) WITH
METHIONINE DEFICIENT DIET DURING TWO WEEKS: CONSEQUENCES ON
MITOCHONDRIA IN LIVER OF JUVENILES**

Sarah Séité^{1, 2, 3}, Karthik Masagounder³, Cécile Heraud¹, Lucie Marandel¹, Stéphane
Panserat¹, Iban Seilliez^{1*}

¹ INRA, Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, UMR 1419, Nutrition, Métabolisme,
Aquaculture, Saint Pée sur Nivelle, F-64310, France.

² Evonik Rexim, 80400 Ham, France.

³ Evonik Nutrition and Care GmbH, 63457 Hanau, Germany.

Number of figures: 7 - Number of tables: 4

***Corresponding author:**

Iban Seilliez

INRA, Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, UMR 1419, Nutrition, Métabolisme,
Aquaculture, Saint Pée sur Nivelle, F-64310, France

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

e-mail : iban.seilliez@inra.fr

Keywords: Fish; mitophagy; mitochondria; ER stress; DNA and histone methylation;
nutritional programming

23 **ABBREVIATIONS**

24 asns, asparagine synthetase ; C, control diet ; CII, Succinate dehydrogenase ; CIV,
25 cytochrome c oxidase ; ddit3, DNA-damage inducible transcript 3; eef1 α 1, eukaryotic
26 translation elongation factor 1 α 1; eif2 α , eukaryotic translation initiation factor 2 α ; ER,
27 endoplasmic reticulum ; GCN2, general control non-depressible 2 ; HSI, hepatosomatic index;
28 MD, methionine deficient diet; MFN2, Mitofusin2; mTOR, mechanistic target of rapamycin
29 (serine/threonine kinase); PARKIN, parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase; PARP, poly
30 (ADP-ribose) polymerase; p-S65-Ub, Phospho-Ubiquitin (Ser65); S6, ribosomal protein S6;
31 SAH, S-adenosyl-L-homocysteine; SAM, S-adenosylmethionine; SD, standard diet; TIM23,
32 translocase of inner mitochondrial membrane 23; TUBB, β -tubulin; UPR, unfolded protein
33 response; xbp1, x-box binding protein 1

34

ABSTRACT

Methionine is a key factor in modulating the cellular availability of the main biological methyl donor S-adenosylmethionine (SAM), needed for all biological methylation reactions including DNA and histone methylation. As such, it represents a potential critical factor in nutritional programming. Here, we investigated whether early methionine restriction at first feeding could have long-term programmed metabolic consequences in rainbow trout. For this purpose, trout fry were fed with either a control diet (C) or a methionine deficient diet (MD) for 2 weeks from the first exogenous feeding. Afterwards, fish were subjected to a 5-month growth trial with a standard diet followed by a 2-week challenge (with the MD diet or C diet) to test the programming effect of the early methionine restriction. The obtained results showed that, whatever the dietary treatment of fry, the 2-week challenge with the MD diet led to a general mitochondrial defect associated with an increase of ER stress, mitophagy and apoptosis, highlighting the existence of complex crosstalk between these different functions. Moreover, for the first time, we also observed that fish fed the MD diet at the first meal exhibited later on an increase in several critical factors of mitophagy, hinting that the early nutritional stimulus with methionine deficiency resulted in long-term programming of this cell function. Together, these data extend our understanding of the role of dietary methionine and emphasize the potential of this amino acid to apply new feeding strategies, such as nutritional programming, to optimize the nutrition and health of farmed fish.

INTRODUCTION

Since more than 20 years, it is widely accepted that nutritional stimuli (quantity or quality of nutrients) experienced at critical periods of an organism's life can result in permanent changes in postnatal growth potential, health and metabolic status in animals (Burdge and Lillycrop, 2010; Lucas, 1991, 1998) referred as nutritional programming. This concept of nutritional programming is being increasingly studied in aquaculture given that it opens a new field of research and opportunities towards the optimization of nutrition and health of farmed animals with obvious economic implications (Panserat et al., 2019). Thus, although still limited, some first knowledge stem from pioneering studies dealing with the possibility of altering the functioning of long-chain fatty acid desaturation in European seabass (Vagner et al., 2009) or the use of dietary carbohydrates in rainbow trout (Geurden et al., 2007, 2014) or zebrafish (Fang et al., 2014). In the same trend, we reported the positive impact of the early-feeding by plant-based diet on its future acceptance and utilisation in rainbow trout (Balasubramanian et al., 2016; Geurden et al., 2013), raising the interesting possibility of directing specific metabolic pathways or functions in juvenile fish to improve the use of substitutes to fish meal and oil, and hence to promote sustainability in aquaculture.

One possible biological process for imprinting the nutritional programming event until adulthood is the epigenetic regulation of gene expression, which had received considerable attention these last years (Block and El-Osta, 2017; Lillycrop and Burdge, 2012). Epigenetics is defined as heritable changes in gene expression (transmitted from cell to cell or from generation to generation) that are not caused by alterations in the DNA sequence. Molecular mechanisms that mediate epigenetic regulation include DNA and histone methylations. These covalent modifications of DNA or histones can influence the structure of chromatin and, therefore, gene expression from the early stages of development and throughout life.

Interestingly, dietary methionine emerged as a key factor in modulating the cellular availability of the main biological methyl donor S-adenosylmethionine (SAM) needed for all biological methylation reactions including DNA and histone methylation (Anderson et al., 2012; Niculescu and Zeisel, 2002; Waterland, 2006). As such, methionine represents a potential critical factor in nutritional programming. In this regards, we recently reported that feeding a methionine-deficient diet to rainbow trout broodstock for 6 months affected the activation and/or expression of several key metabolic factors in offspring through DNA

methylation (Veron et al., 2018), confirming the possibility of nutritional programming in fish through parental methionine nutrition (Fontagné-Dicharry et al., 2017; Seiliez et al., 2017).

In order to deepen our knowledge of the nutritional programming potential of methionine, we investigated in the present study whether early methionine restriction at first feeding could have programmed metabolic consequences in rainbow trout. For this purpose, first feeding fry were fed with either a control diet or a methionine deficient diet for 2 weeks from the first exogenous feeding. Afterwards, fish were subjected to an 18-weeks growth trial with a commercial diet followed by a 2-week challenge test (with the methionine deficient diet as the challenge diet compared to the control diet). Recently, we showed that a dietary methionine deficiency caused a general hepatic mitochondrial defect, associated to an induction of mitochondrial degradation through mitophagy (Séité et al., 2018). Here, we therefore focused on hepatic mitochondria integrity, function and degradation through mitophagy and investigated the associated mechanisms.

MATERIALS AND METHODS

Ethics

The experiments were conducted in compliance with the legal frameworks of France and the EU. They respect the directive 2010/63/EU relating to the protection of animals used for scientific purposes as well as the decree No 2013-118, 1 February 2013 of the French legislation governing the ethical treatment of animals. The protocol was approved by the French National Consultative Ethics Committee under the reference number APAFIS8222-2017041016141425-v4.

Feeding trial and rearing

Swim-up fry of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) having a mean initial weight of 0.1g were reared in the INRA experimental facilities (Donzacq, France) at a constant water temperature (~17°C) under natural photoperiod (June to December). The fish were randomly distributed into 6 tanks (17 liters; 220 fishes/ tank). The first feeding fry were fed for two weeks with one of the two iso-nitrogenous (41% crude protein) and isoenergetic (23kJ/g dry matter, DM) extruded diets (n= 3 tanks per diets) manufactured at INRA experimental facilities of Donzacq (Table 1). The two experimental diets were formulated to meet nutrient requirements of rainbow trout (NRC 2011, AMINOSalmonid®), except for methionine content that was intended to be adequate (0.91% diet, dry matter basis) in the control diet (Control, C) or restricted by 57% (methionine deficient, MD) compared to the C diet (Table 1). The cysteine (Cys) level was kept constant at 0.43±0.1 % diet. On day 14, 16 h after the last meal, 15 fish/tank were euthanized by terminal anesthetization by bathing in benzocaine (30 mg/l water), and snap-frozen in liquid nitrogen and then stored at – 80 °C until further mRNA analyses.

Remaining fish (n= 205/tank) were subjected to an 18-week growth trial with a common standard diet (SD, Table 2) manufactured at INRA experimental facilities of Donzacq. Subsequently, rainbow trout from each of the two groups were randomly distributed into 6 tanks (130L, 45 fish/ tank) and subjected to a 2-week-challenge test with the MD diet or the C diet (Fig. 1). At the end of the final challenge and 16h after the last meal, blood and liver were collected from 3 fish per tank. Fish were anesthetised with benzocaine (30 mg/L) and euthanized by a sharp blow to the head. Blood samples from the caudal vein (3 fishes per tank) were collected into heparinized syringes and centrifuged at 3000 g for 5 min; the

recovered plasma was immediately frozen and kept at -20°C . Livers were collected, dissected, weighted and immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C . Fish were counted and weighed at the beginning and end of the feeding trial to follow the growth and feed utilisation. Individual body mass, daily growth index, daily feed intake and feed efficiency were calculated as described before (Belghit et al., 2014).

Mitochondria isolation

At the end of the final challenge, 3 fish per tank were euthanized directly by sharp blow to the head and livers were quickly collected, minced and homogenized with Potter in 5 ml of ice-cold mitochondria isolation buffer (MIB, 275mM sucrose, 20mM Tris-HCl and 1 mM EGTA, 1mg/ml BSA, pH 7.2). Mitochondria were purified by differential centrifugation (1,000g for 10 min at 4°C) and supernatants were then centrifuged at 10,000g for 10 min at 4°C . Finally, the crude mitochondrial pellet was resuspended in an appropriate volume of MIB. The mitochondrial protein concentrations were determined using the Bradford reagent method.

Chemical composition of the diets

DM, crude fat and gross energy content of the diets were determined following the procedures previously outlined (Belghit et al., 2014). Crude protein content was measured as $\text{N} \times 6.25$ by the Kjeldahl method after acid digestion (ISO 937:1978) and using Leco FP-2000 (Leco Corp., St. Joseph, MI) analyser. Starch content was measured by an enzymatic method (InVivo Labs). Dietary amino acid concentrations were performed by wet chemistry at Evonik-Degussa Laboratory (Hanau, Germany) by ion-exchange chromatography with postcolumn derivatization with ninhydrin. Amino acids were oxidized with performic acid, and neutralized with sodium metabisulfite (Llames and Fontaine, 1994); Commission Directive 1998). Amino acids were liberated from the protein by hydrolysis with 6 N HCl for 24 h at 110°C and quantified with the internal standard method by measuring the absorption of reaction products with ninhydrin at 570 nm.

Western blot analysis

At the end of the final challenge, livers sampled 16h after the last meal ($\text{N}=6/\text{condition}$) were homogenized and analysed according to the previously detailed protocol (Belghit et al., 2014) and using the following antibodies: anti-phospho ribosomal protein S6 (S6 Ser235/Ser236, #4856; Cell Signaling Technologies); anti-carboxyl terminal S6 (#2217; Cell Signaling

Technologies); anti-phospho eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α Ser51, #9721, Cell Signaling Technology); anti-carboxyl terminal eIF2 α (#9722, Cell Signaling Technology); anti- β -tubulin (TUBB, #2146, Cell Signaling Technology); anti-translocase of inner mitochondrial membrane 23 (TIM23, # 611222, BD Transduction LaboratoriesTM), anti-mitofusin2 (MFN2, # ab56889, abcam); anti-parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase (PARKIN, # ab15954, abcam); anti-phospho-Ubiquitin (Ser65) (Ser65, # ABS1513-I, EMD Millipore); anti-total Ubiquitin (# MAB1510, EMD Millipore) and anti-cleaved poly (ADP-ribose) polymerase (PARP, # 95425, Cell Signaling Technology). All these antibodies (except anti-cleaved PARP) have already been validated in rainbow trout (Belghit et al., 2014; Seiliez et al., 2016; Séité et al., 2018). For cleaved PARP, the amino 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 of the mammalian antibody used in the analysis of our samples. In order to measure the global levels of selected histone modification (H3K4me3, H3K9me3 and H3K36me3), histones of liver were extracted according to the previously detailed protocol (Liu et al., 2017). Histone isolation was used for western blot analysis as described above and using the appropriate antibodies: Anti-H3K4me3 (# C15410003, Diagenode); anti-H3K9me3 (#C15410056, Diagenode), anti-H3K36me3 (#15410192, Diagenode) and anti-H3 (#ab1791, abcam).

Enzyme activities

Mitochondrial proteins (10-30 μ g) were diluted in phosphate buffer (KH₂PO₄ 50mM, pH 7.5), and then subjected to spectrophotometric analysis to measure enzymatic activities of succinate dehydrogenase (Complex II) and Cytochrome c oxydase (Complex IV) at 37°C. Complex II activity was measured at 600 nm (ϵ = 21 mM⁻¹cm⁻¹) after the addition of 0.1 mM phenazine methosulphate (PMS), 40 mM succinate, 0.1 mM dichlorophenolindophenol (DCPIP) and 40 mM malonate. Complex IV was determined at 550 nm (ϵ = 18,500 M⁻¹cm⁻¹) after the addition of 12.5 μ g/ml antimycin, and 100 μ M cytochrome c. The specific Complex IV activity was defined as the flux difference before and after the addition of 1 mM KCN (inhibitor of Complex IV).

Quantitative RT-PCR analyses

Quantitative RT-PCR analyses were performed on whole fry sampled 16h after the last meal during the first sampling (N=6/diet) and on liver of fish sampled 16h after the feeding trial

(N=6/condition) The protocol conditions for sample preparation and quantitative RT-PCR have been previously described (Fontagné-Dicharry et al., 2015; Seiliez et al., 2016). The primers used for real-time RT-PCR assays are listed in Table 3. Primers of *x-box binding protein 1 (xbp1)* were newly designed using Primer3 software. The primers that amplify the genes *asparagine synthetase (asns)* and *DNA-damage inducible transcript 3 (ddit3)* have already been described in previous studies (Seiliez et al., 2016; Séité et al., 2018). For the expression analysis, relative quantification of target gene expression was done using the Δ CT method described by (Pfaffl et al., 2002). The relative gene expression value of *eukaryotic translation elongation factor 1 α 1 (eef1a1)* was used for the normalization of the measured expression values of the target mRNA, and it was found to not change significantly among dietary treatments (data not shown).

Determination of mitochondrial DNA (mtDNA) copy number

DNA isolation was performed on fish liver sampled 16h after the last meal (N=6/condition) following the previously detailed protocol in Liu et al. (2017). mtDNA copy number was measured using quantitative PCR gene abundance as described above (RT-PCR section). mtDNA copy number (mitochondrially encoded tRNA leucine 1UUA/G: Forward primer: AAAACAGACAAGGGGGGCACA, Reverse primer: AGGGTGAGGAAAGCAACTGC) was normalized to β -actin genomic DNA in the sample (Forward primer: GATGGGCCAGAAAGACAGCTA, Reverse primer : TCGTCCCAGTTGGTGACGAT).

Methionine and related metabolites in liver

At the end of the final challenge, livers sampled 16h after the last meal (N=6/condition) were homogenized in 10 volumes of phosphate buffer (20mM, EDTA 1mM, pH 6.5) using an ULTRA-TURRAX homogeniser (IMLAB sarl). Homogenates were centrifuged at 4°C for 15min at 10,000g. Part of the supernatant was used for protein quantification using the Lowry's method. Another part of supernatant was deproteinized with an equal volume of Meta-phosphoric acid (MPA 2.5%) and centrifuged 5min at 2,000g. The supernatant was collected for HPLC analysis. Hepatic methionine was analysed according to the previously detailed (Cohen and Michaud, 1993). Liver aliquot was derivatized using Waters® AccQ·Fluor™ reagent kit (Waters®, Massachusetts, USA) according to manufacturer procedure and separated using a Waters® AccQ·Tag™ column (3.9 mm $\times$ 150 mm i.d. 4 μ m). The column was operated at 37 °C. The injection volume was 20 μ l and the flow rate was set at 1 ml/min. The eluate was monitored with fluorescence detection (excitation at 250 nm,

emission at 395 nm) for 45min using manufacturer recommended elution gradient. The standard used L-Methionine was purchased from Waters[®] (Massachusetts, USA).

SAM and S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) in the liver were analysed according to the modified protocol (Cook et al., 1989). Chromatographic separation was achieved on Waters[®] Resolve C18 column (3.9 mm × 150 mm i.d. 5 µm). The column was operated at 40 °C. The injection volume was 50 µl and the flow rate was set at 0.7 ml/min. The eluate was monitored with absorbance detection at 258nm. A binary solvent system was used, consisting of (A) phosphate buffer 20mM pH 7.2 (TFA) with OSA 8mM, (B) methanol. The following gradient elution was employed: 0-10min: 95% A, 5% B; 20min: 30% A, 70% B; 35-40min (column equilibration): 95% A, 5% B. The standards SAM, SAH used as standard were purchased from Sigma-Aldrich[®] (Germany).

Global DNA methylation

DNA isolation was performed on fish liver sampled 16h after the last meal (N=6/condition) using DNA and RNA kit (# 80204, QIAGEN). DNA was quantified by Qubit (#k32854, ThermoFisher) and the quality (integrity of DNA) was verified on 1% agarose gel. Global DNA methylation was performed at Epigenomics core facility at the university of Paris Diderot by LUMinometric Methylation Assay (LUMA) previously described by Karimi et al. (2006).

Statistics

Data are expressed as means ± SD. Normality was assessed using the Shapiro–test, while the equality of variances was determined using Levene’s test. When the normality and/or equal variances of data were respected, t-test or two-way ANOVA was used to detect significant differences. When the normality and/or equal variances of data were not respected PERMANOVA was used. Following two-way ANOVA or PERMANOVA analysis, the Tukey test was used for post hoc analysis. For all statistical analyses, the level of significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Expression of genes related to methionine deficiency in fry

We first aimed to verify whether the fry sensed the two-weeks dietary methionine deficiency at the first meal. For this purpose, we measured the mRNA levels of two genes, *asns* and *ddit3*, known to be overexpressed upon amino acid deficiency. As shown in Fig. 2A, fry fed the MD diet exhibited significantly higher *asns* and *ddit3* mRNA levels. Interestingly, this effect was accompanied by an increase of the size of the liver of MD fed fry (Fig. 2B). Overall these data indicated that methionine deficiency was sensed at the cellular level in fry.

Direct and programmed effects of dietary methionine deficiency on survival and growth parameters

We then sought to determine the effect of these two-weeks of dietary methionine deficiency on the survival and growth performances at both short (direct effect) and long term (programming effect). Early methionine deficiency did not show any effects on survival and growth parameters neither in fry, nor in juveniles fed the SD diet for 18 weeks (Table 4). In contrast, after the 2-week final challenge, although the survival of fish was not impacted, fish fed the MD diet at the first meal (MD-C and MD-MD) presented significantly higher weight than those fed the C diet at the first meal (C-C and C-MD) (Table 4). We also measured the hepatosomatic index (HSI), *i.e.* the liver to body weight ratio, as a marker of methionine deficiency stress (Table 4). The obtained results indicated that, whatever the first feeding of the fry, the 2 weeks final challenge with the MD diet affected the HSI of the fish. However, for the MD fed fish (C-MD and MD-MD), those stimulated with the MD diet at first feeding (MD-MD) exhibited a significantly higher HSI than their control counterparts (C-MD). Together, these results clearly showed that a short (2 weeks) early nutritional stimulus may have physiological consequences in the long-term.

Direct and programmed signaling sensing of dietary methionine deficiency

In order to clarify and grasp the mechanisms behind the observed direct and programmed physiological effects of dietary methionine deficiency, we first analyzed the levels of methionine and some related metabolites in the liver of sampled fish at the end of the feeding challenge. The obtained results showed that whatever the first feeding, the levels of methionine and SAM as well as the SAM/SAH ratio were lower in fish fed the MD diet during the final challenge compared to their respective controls (Fig. 3A, B). However, the

level of SAH appeared to be significantly impacted by methionine deficiency at the last meal only in fish from methionine deprived fry (Fig. 3B).

Interestingly, these effects were accompanied by significant changes in the phosphorylation of two key factors of the critical nutrient sensing pathways GCN2/eIF2 α and mTORC1. Indeed, as shown in Fig. 3C, D, whatever the first feeding of the fry, the 2-weeks challenge of juveniles with the MD diet increased the phosphorylation of eIF2 α and decreased that of S6 in the liver. However, we also observed that fish from MD diet treated fry exhibited higher phosphorylation of eIF2 α and lower phosphorylation of S6 compared to fish from control fry (Fig. 3C, D). Collectively, these data demonstrated that dietary methionine deficiency has been sensed at both short- (direct effect of the diet) and long- (programming effect) term.

Methionine deficiency has direct effects on mitochondrial function

In order to determine whether mitochondria were affected in these nutritional conditions, we then measured several mitochondrial markers in the liver of trout sampled at the end of the dietary challenge: the relative mtDNA copy number (reflecting the mitochondrial mass), the level of TIM23 (a protein located in mitochondrial inner membrane) and the activities of complex II and IV (involved in OXPHOS system). The obtained results showed no direct effect of methionine deficiency on both the relative mtDNA copy number and the activity of the complex IV (Fig. 4A, C). In contrast, they revealed that fish fed the MD diet at the last dietary challenge (C-MD and MD-MD) exhibited lower levels of TIM23 and to a lesser extend of the activity of the complex II compared to the control groups (C-C and MD-C) (Fig. 4B, C). Together, these data support a direct (but not programmed) effect of methionine deficiency on liver mitochondrial function while not impairing mitochondrial mass.

Methionine deficiency has a direct and programmed effect on mitophagy

Considering that dietary methionine deficiency impacted directly the mitochondrial function, we measured the level of some markers related to autophagy-dependent mitochondria degradation (termed mitophagy) in our samples. Pink1 (PTEN induced putative kinase 1) / Parkin (parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase) axis is considered as a major pathway of mitophagy regulation. Induction of this pathway has been shown to correlate with an increase of ubiquitin phosphorylation at Ser65 (p-S65-Ub) and a decrease of the level of the Parkin-target protein MFN2. Here, we showed that methionine deficiency at the last dietary challenge increased the levels of PARKIN (regardless of first meal of fry) as well as those of p-S65-Ub (at least in fish from fry fed the control diet (Fig. 5A, B). Furthermore, we also observed that

fish fed the MD diet at the first meal (MD-C and MD-MD) exhibited an increase of PARKIN and p-S65-Ub as well as a decrease of MFN2 in comparison with fish from fry fed the C diet (C-C and C-MD) (Fig. 5A, B, C). Thus, these results demonstrated that dietary methionine deficiency induced direct defects of mitochondria were accompanied by induction of mitophagy. Moreover, although mitochondrial integrity does not appear to be affected by the first meal of the fry, we also observed an increase of markers of mitophagy in the liver of fish fed the MD diet at the first meal, suggesting other mechanisms at play in this programmed effect.

Underlying mechanisms involved in the observed direct effect of methionine deficiency on mitophagy: Possible role of endoplasmic reticulum (ER) stress

Several studies demonstrated that mitophagy is induced upon severe ER stress, by the unfolded protein response (UPR), in order to clear stress-damaged mitochondria and protect cells from apoptosis (Eisenberg-Lerner et al., 2009; Maiuri et al., 2007; Zhang et al., 2014). We therefore measured in our samples the mRNA levels of three main target genes of the UPR (namely *asns*, *ddit3* and *xbp1*), as well as those of cleaved PARP, the prominent marker of apoptosis. Whatever the nutritional past of fry, the 2-weeks challenge of juveniles with the MD diet increased mRNA levels of *asns*, *ddit3* and *xbp1*, supporting induction of ER stress response in the liver of these fish (Fig. 6A). However, surprisingly, the levels of cleaved PARP also increased in those fish, revealing apoptosis induction (Fig. 6B). Overall these results associated the short-term (direct) dietary methionine deficiency-mediated induction of mitophagy to ER stress, but also suggested that this induction of mitophagy does not prevent cells turning on apoptosis.

Underlying mechanisms involved in the programmed effect of methionine deficiency on mitophagy: Possible role of histone methylation

One of the critical mechanisms involved in nutritional programming, and therefore, that may explain the observed programmed effect of methionine deficiency on mitophagy is epigenetics. Here, we therefore assessed whether methionine deficiency at the first meal affected global epigenome modifications by targeting DNA methylation and histone marks previously reported to be affected in mitochondrial stress conditions (permissive H3K4me3 and H3K36me3, and repressive H3K9me3). The obtained results showed that the global DNA methylation and the level of H3K9me3 were not different among the four dietary groups (Fig. 7A, B). In contrast, fish fed the MD diet at the first meal (MD-C and MD-MD) exhibited

367 higher H3K36me3 in comparison to fish fed the C diet at the first meal (C-C and C-MD) (Fig.
368 7C). Moreover, we also observed that the levels of H3K4me3 significantly increased in fish
369 fed the MD diet at the first meal and during the final challenge (MD-MD) compared to fish
370 fed the C diet at the first meal (C-C and C-MD) (Fig. 7D). Overall these data demonstrated
371 that methionine deficiency at the first feeding affected the hepatic epigenetic landscape of fish
372 at later juvenile stages, making possible a role of epigenetic events in the observed nutritional
373 programming effect of methionine deficiency on mitophagy.

DISCUSSION

In addition to its role as building block for protein synthesis, methionine emerged these last years as a key factor in modulating several cell signaling pathways (Belghit et al., 2014; Séité et al., 2018; Skiba-Cassy et al., 2016), the antioxidant defense system (Andersen et al., 2016; Fontagné-Dicharry et al., 2015; Séité et al., 2018; Tesseraud et al., 2009) as well as the epigenetic processes of histone and DNA methylation (Veron et al., 2018; Waterland, 2006), and represents a potential critical factor in both direct and programmed nutritional control of cell homeostasis and metabolism. In this regard, we recently reported that feeding trout with a methionine deficient diet for 6 weeks lead to general mitochondrial defects associated with a sharp increase of mitochondria degradation through mitophagy in the liver (Séité et al., 2018). However, the underlying mechanisms are still unclear, and given the role of methionine (as a methyl-group donor) in epigenetic processes, whether an early methionine restriction could have programming consequences on mitochondria remained worth investigating.

Here, we reported that fish from fry fed a methionine deficient diet at first feeding exhibited significantly higher weight than those from fry fed a control diet when they were subjected to a two-week feeding challenge 18 weeks later. These results could be due either to an increase of growth performance or to important metabolic disorders resulting in overweight. Several studies have previously shown that dietary methionine deficiency lead to a direct weight reduction in fish (Belghit et al., 2014; Gao et al., 2019; Mambrini et al., 1999; Séité et al., 2018), but to our knowledge no data are available on the programming impact of a methionine deficiency on body weight. Interestingly, we observed that whatever the first feeding of fry, the two-week challenge of juveniles with the MD diet increased the HSI, and that this effect was even stronger in fish from fry fed MD diet at the first meal. Such an effect of a dietary methionine deficiency on liver weight has already been reported and attributed to severe metabolic perturbations (Caballero et al., 2010; Craig and Moon, 2013). In this regards, the two studied key nutrient sensing pathways GCN2/eIF2 α and mTORC1 were significantly affected in fish fed the MD diet at the last feeding challenge, and even more in fish from methionine restricted fry. Overall, these data indicated that dietary methionine deficiency impacts both directly and at long term the hepatic metabolism of trout, and provided a relevant material for studying the mechanisms behind the direct effect of this diet on mitochondria function, as well as assessing the programming consequences of early methionine restriction on these key metabolic organelles.

As regard the direct effect, the obtained results showed that feeding trout a diet deficient in methionine for two weeks reduced the levels of mitochondrial protein TIM23 as well as the activity of the OXPHOS complex II in the liver, and concurrently induced two critical markers of mitophagy (PARKIN and p-S65-Ub). Such a direct effect of dietary methionine deficiency on both mitochondrial function and mitophagy has recently been reported in rainbow trout, but the underlying mechanisms were not investigated (Séité et al., 2018). Here, we report that fish fed the MD diet in the last two-week feeding challenge exhibited also an increase of ER stress (as revealed by the mRNA levels of *ddit3*, *xbp1* and *asns*), and propose that this dietary methionine deficiency-induced ER stress likely plays an important role in the observed induction of mitophagy. Indeed, mitochondria and ER form structural and functional networks essential to maintain cellular homeostasis and to determine cell fate under various physiological conditions (Marchi et al., 2014; Szymański et al., 2017). ER stress can be transmitted to mitochondria through alterations in the transfer of metabolites such as Ca^{2+} or through stress-sensitive signaling pathways that directly control mitochondria integrity and mitophagy (Bouman et al., 2011; Guo et al., 2018; Kim et al., 2006; Marycz et al., 2018; Rainbolt et al., 2014; Senft and Ronai, 2015). In this regard, it is now well recognized that mitophagy is induced by the UPR during ER stress, in order to eliminate stress-damaged mitochondria and protect cells from apoptosis (Kim et al., 2006; Maiuri et al., 2007). For example, the transcription factor of PERK pathway ATF4 is known to control the expression of Parkin (Bouman et al., 2011). However, and surprisingly, we also noticed an increase in cleaved PARP levels in fish fed the MD diet during the last two-week feeding trial, indicating that under methionine deficiency conditions tested, the observed induction of mitophagy did not prevent the cells from initiating apoptosis. Collectively, the data obtained in the present study confirmed our previous findings on the direct effect of dietary methionine deficiency on both mitochondrial function and mitophagy, and suggested that it probably results from complex cross-talks between ER, mitochondria and autophagy, which ultimately determine the cellular response (survival or death) to this nutritional challenge.

However, our results also evidenced that early methionine deficiency resulted in a long-term programming of mitophagy in rainbow trout, without impacting mitochondrial function, ER or apoptosis. These results suggested that other mechanisms were at play in the observed programmed effects of methionine deficiency. Methionine emerged as a key factor in modulating the cellular availability of SAM needed for all biological methylation (including DNA and histone methylation), and represents a potential critical actor in nutritional programming. In that way, several studies demonstrated that early imbalanced

442 dietary methionine led to modulate DNA and histone methylation later on life through the
443 control of the one carbon metabolism (Rees, 2002; Waterland, 2006; Waterland and Jirtle,
444 2004). Recently, we also reported that both broodstock and early fry methionine nutrition
445 affected the methylation of several CpG sites and the mRNA levels of *bnip3a* (bcl-2/E1B-
446 19 K interacting protein 3) and *bnip3lb1* (also known as *nix*) genes involved in mitochondrial
447 mediated apoptosis and/or mitophagy (Veron et al., 2018). In the present study, we did not
448 observe any modulation of global DNA methylation in the liver of fish from fry fed the
449 methionine deficient diet compared to their control counterparts. However, the levels of
450 H3K4me3 as well as those of H3K36me3 were significantly affected by early methionine
451 deficiency, supporting major epigenetic changes in MD diet fed fish. Interestingly,
452 mitochondrial stress adaptation in worm has recently been associated to heritable changes of
453 H3K4me3 over the promoters of several mitochondrial stress response genes (Ma et al.,
454 2019). This new finding thus raises the possibility that the H3K4me3 enrichment observed in
455 methionine-deficient fish may play a critical role in the induced programmed mitophagy.

457 **Wrapping-up**

458 In conclusion, here we confirmed a previously reported direct effect of dietary methionine
459 deficiency on both mitochondria and mitophagy in the liver of trout, and propose that ER
460 stress could play an important role in this effect, highlighting the involvement of complex
461 cross-talks between ER, mitochondria and autophagy in the maintenance of cellular
462 homeostasis. Moreover, we show for the first time that early nutritional stimulus during two
463 weeks with a methionine deficient diet resulted in a long term programming of mitophagy,
464 without impacting mitochondrial function, ER or apoptosis. Although the underlying
465 mechanisms are not yet clear, the obtained results demonstrated significant changes of both
466 H3K4me3- and H3K36me3-levels in fish from fry fed the MD diet, making possible the
467 involvement of epigenetic processes in the observed effects. Further studies need to evaluate
468 this long-term persistent effect of methionine deficiency on mitophagy and to elucidate the
469 mechanisms, whether epigenetic or not.

REFERENCES

- Andersen, S.M., Waagbø, R., and Espe, M. (2016). Functional amino acids in fish health and welfare. *Frontiers in Bioscience, Elite 8*, 143–169.
- Anderson, O.S., Sant, K.E., and Dolinoy, D.C. (2012). Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 23, 853–859.
- Balasubramanian, M.N., Panserat, S., Dupont-Nivet, M., Quillet, E., Montfort, J., Le Cam, A., Medale, F., Kaushik, S.J., and Geurden, I. (2016). Molecular pathways associated with the nutritional programming of plant-based diet acceptance in rainbow trout following an early feeding exposure. *BMC Genomics* 17, 449.
- Belghit, I., Skiba-Cassy, S., Geurden, I., Dias, K., Surget, A., Kaushik, S., Panserat, S., and Seilliez, I. (2014). Dietary methionine availability affects the main factors involved in muscle protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nutr.* 112, 493–503.
- Block, T., and El-Osta, A. (2017). Epigenetic programming, early life nutrition and the risk of metabolic disease. *Atherosclerosis* 266, 31–40.
- Bouman, L., Schlierf, A., Lutz, A.K., Shan, J., Deinlein, A., Kast, J., Galehdar, Z., Palmisano, V., Patenge, N., Berg, D., et al. (2011). Parkin is transcriptionally regulated by ATF4: evidence for an interconnection between mitochondrial stress and ER stress. *Cell Death and Differentiation* 18, 769–782.
- Burdge, G.C., and Lillycrop, K.A. (2010). Nutrition, Epigenetics, and Developmental Plasticity: Implications for Understanding Human Disease. In *Annual Review of Nutrition*, Vol 30, R.J. Cousins, ed. (Palo Alto: Annual Reviews), pp. 315–339.
- Caballero, F., Fernández, A., Matías, N., Martínez, L., Fucho, R., Elena, M., Caballeria, J., Morales, A., Fernández-Checa, J.C., and García-Ruiz, C. (2010). Specific Contribution of Methionine and Choline in Nutritional Nonalcoholic Steatohepatitis IMPACT ON MITOCHONDRIAL S-ADENOSYL-L-METHIONINE AND GLUTATHIONE. *J. Biol. Chem.* 285, 18528–18536.
- Cohen, S.A., and Michaud, D.P. (1993). Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of

499 hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Analytical*
500 *Biochemistry* *211*, 279–287.

501 Cook, R.J., Horne, D.W., and Wagner, C. (1989). Effect of dietary methyl group deficiency
502 on one-carbon metabolism in rats. *The Journal of Nutrition* *119*, 612–617.

503 Craig, P.M., and Moon, T.W. (2013). Methionine restriction affects the phenotypic and
504 transcriptional response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to carbohydrate-enriched
505 diets. *British Journal of Nutrition* *109*, 402–412.

506 Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H.-U., and Kimchi, A. (2009). Life and death
507 partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death and*
508 *Differentiation* *16*, 966–975.

509 Fang, L., Liang, X.-F., Zhou, Y., Guo, X.-Z., He, Y., Yi, T.-L., Liu, L.-W., Yuan, X.-C., and
510 Tao, Y.-X. (2014). Programming effects of high-carbohydrate feeding of larvae on adult
511 glucose metabolism in zebrafish, *Danio rerio*. *British Journal of Nutrition* *111*, 808–818.

512 Fontagné-Dicharry, S., Godin, S., Liu, H., Prabhu, P.A.J., Bouyssiere, B., Bueno, M., Tacon,
513 P., Médale, F., and Kaushik, S.J. (2015a). Influence of the forms and levels of dietary
514 selenium on antioxidant status and oxidative stress-related parameters in rainbow trout
515 (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *British Journal of Nutrition* *113*, 1876–1887.

516 Fontagné-Dicharry, S., Alami-Durante, H., Aragão, C., Kaushik, S.J., and Geurden, I. (2017).
517 Parental and early-feeding effects of dietary methionine in rainbow trout (*Oncorhynchus*
518 *mykiss*). *Aquaculture* *469*, 16–27.

519 Gao, Z., Wang, X., Tan, C., Zhou, H., Mai, K., and He, G. (2019). Effect of dietary
520 methionine levels on growth performance, amino acid metabolism and intestinal homeostasis
521 in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* *498*, 335–342.

522 Geurden, I., Aramendi, M., Zambonino-Infante, J., and Panserat, S. (2007). Early feeding of
523 carnivorous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with a hyperglucidic diet during a short
524 period: effect on dietary glucose utilization in juveniles. *American Journal of Physiology -*
525 *Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* *292*, R2275–R2283.

526 Geurden, I., Borchert, P., Balasubramanian, M.N., Schrama, J.W., Dupont-Nivet, M., Quillet,
527 E., Kaushik, S.J., Panserat, S., and Médale, F. (2013). The positive impact of the early-
528 feeding of a plant-based diet on its future acceptance and utilisation in rainbow trout. *PLoS*
529 *One* 8, e83162.

530 Geurden, I., Mennigen, J., Plagnes-Juan, E., Veron, V., Cerezo, T., Mazurais, D., Zambonino-
531 Infante, J., Gatesoupe, J., Skiba-Cassy, S., and Panserat, S. (2014). High or low dietary
532 carbohydrate:protein ratios during first-feeding affect glucose metabolism and intestinal
533 microbiota in juvenile rainbow trout. *Journal of Experimental Biology* 217, 3396–3406.

534 Guo, J., Yang, Z., Yang, X., Li, T., Liu, M., and Tang, H. (2018). miR-346 functions as a pro-
535 survival factor under ER stress by activating mitophagy. *Cancer Lett.* 413, 69–81.

536 Karimi, M., Johansson, S., Stach, D., Corcoran, M., Grandér, D., Schalling, M., Bakalkin, G.,
537 Lyko, F., Larsson, C., and Ekström, T.J. (2006). LUMA (LUMinometric Methylation
538 Assay)—A high throughput method to the analysis of genomic DNA methylation.
539 *Experimental Cell Research* 312, 1989–1995.

540 Kim, R., Emi, M., and Tanabe, K. (2006). Role of mitochondria as the gardens of cell death.
541 *Cancer Chemother Pharmacol* 57, 545–553.

542 Lillycrop, K.A., and Burdge, G.C. (2012). Epigenetic mechanisms linking early nutrition to
543 long term health. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 26, 667–
544 676.

545 Liu, J., Dias, K., Plagnes-Juan, E., Veron, V., Panserat, S., and Marandel, L. (2017). Long-
546 term programming effect of embryonic hypoxia exposure and high-carbohydrate diet at first
547 feeding on glucose metabolism in juvenile rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*
548 220, 3686–3694.

549 Llames, C.R., and Fontaine, J. (1994). Determination of amino acids in feeds: collaborative
550 study. *Journal of AOAC International* 77, 1362–1402.

551 Lucas, A. (1991). Programming by early nutrition in man. *Ciba Found. Symp.* 156, 38–50;
552 discussion 50-55.

553 Lucas, A. (1998). Programming by early nutrition: an experimental approach. *J. Nutr.* 128,
 554 401S-406S.

555 Ma, C., Niu, R., Huang, T., Shao, L.-W., Peng, Y., Ding, W., Wang, Y., Jia, G., He, C., and
 556 Li, C.-Y. (2019). N6-methyldeoxyadenine is a transgenerational epigenetic signal for
 557 mitochondrial stress adaptation. *Nature Cell Biology* 21, 319.

558 Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing:
 559 crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 741–
 560 752.

561 Mambrini, M., Roem, A.J., Carvèdi, J.P., Lallès, J.P., and Kaushik, S.J. (1999). Effects of
 562 replacing fish meal with soy protein concentrate and of DL-methionine supplementation in
 563 high-energy, extruded diets on the growth and nutrient utilization of rainbow trout,
 564 *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Animal Science* 77, 2990–2999.

565 Marchi, S., Patergnani, S., and Pinton, P. (2014). The endoplasmic reticulum–mitochondria
 566 connection: One touch, multiple functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -*
 567 *Bioenergetics* 1837, 461–469.

568 Marycz, K., Kornicka, K., Szlapka-Kosarzewska, J., and Weiss, C. (2018). Excessive
 569 Endoplasmic Reticulum Stress Correlates with Impaired Mitochondrial Dynamics, Mitophagy
 570 and Apoptosis, in Liver and Adipose Tissue, but Not in Muscles in EMS Horses. *Int J Mol Sci*
 571 19.

572 Niculescu, M.D., and Zeisel, S.H. (2002). Diet, Methyl Donors and DNA Methylation:
 573 Interactions between Dietary Folate, Methionine and Choline. *J. Nutr.* 132, 2333S-2335S.

574 Panserat, S., Marandel, L., Seiliez, I., and Skiba-Cassy, S. (2019). New Insights on
 575 Intermediary Metabolism for a Better Understanding of Nutrition in Teleosts. *Annual Review*
 576 *of Animal Biosciences* 7, null.

577 Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool
 578 (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in
 579 real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, e36.

580 Rainbolt, T.K., Saunders, J.M., and Wiseman, R.L. (2014). Stress-responsive regulation of
581 mitochondria through the ER unfolded protein response. *Trends in Endocrinology &*
582 *Metabolism* 25, 528–537.

583 Rees, W.D. (2002). Manipulating the sulfur amino acid content of the early diet and its
584 implications for long-term health. *Proceedings of the Nutrition Society* 61, 71–77.

585 Seilliez, I., Belghit, I., Gao, Y., Skiba-Cassy, S., Dias, K., Cluzeaud, M., Rémond, D.,
586 Hafnaoui, N., Salin, B., Camougrand, N., et al. (2016). Looking at the metabolic
587 consequences of the colchicine-based in vivo autophagic flux assay. *Autophagy* 12, 343–356.

588 Seilliez, I., Vélez, E.J., Lutfi, E., Dias, K., Plagnes-Juan, E., Marandel, L., Panserat, S.,
589 Geurden, I., and Skiba-Cassy, S. (2017). Eating for two: Consequences of parental methionine
590 nutrition on offspring metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 471,
591 80–91.

592 Séité, S., Mourier, A., Camougrand, N., Salin, B., Figueiredo-Silva, A.C., Fontagné-Dicharry,
593 S., Panserat, S., and Seilliez, I. (2018). Dietary methionine deficiency affects oxidative status,
594 mitochondrial integrity and mitophagy in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).
595 *Scientific Reports* 8, 10151.

596 Senft, D., and Ronai, Z.A. (2015). UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the
597 ER stress response. *Trends in Biochemical Sciences* 40, 141–148.

598 Skiba-Cassy, S., Geurden, I., Panserat, S., and Seilliez, I. (2016). Dietary methionine
599 imbalance alters the transcriptional regulation of genes involved in glucose, lipid and amino
600 acid metabolism in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 454, 56–
601 65.

602 Szymański, J., Janikiewicz, J., Michalska, B., Patalas-Krawczyk, P., Perrone, M., Ziółkowski,
603 W., Duszyński, J., Pinton, P., Dobrzyń, A., and Więckowski, M.R. (2017). Interaction of
604 Mitochondria with the Endoplasmic Reticulum and Plasma Membrane in Calcium
605 Homeostasis, Lipid Trafficking and Mitochondrial Structure. *Int J Mol Sci* 18.

606 Tesseraud, S., Métayer Coustard, S., Collin, A., and Seilliez, I. (2009). Role of sulfur amino
607 acids in controlling nutrient metabolism and cell functions: implications for nutrition. *British*
608 *Journal of Nutrition* 101, 1132–1139.

609 Vagner, M., Robin, J.H., Zambonino-Infante, J.L., Tocher, D.R., and Person-Le Ruyet, J.
610 (2009). Ontogenic effects of early feeding of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a
611 range of dietary n-3 highly unsaturated fatty acid levels on the functioning of polyunsaturated
612 fatty acid desaturation pathways. *British Journal of Nutrition* *101*, 1452–1462.

613 Veron, V., Marandel, L., Liu, J., Vélez, E.J., Lepais, O., Panserat, S., Skiba, S., and Seiliez, I.
614 (2018). DNA methylation of the promoter region of *bnip3* and *bnip3l* genes induced by
615 metabolic programming. *BMC Genomics* *19*, 677.

616 Waterland, R.A. (2006). Assessing the Effects of High Methionine Intake on DNA
617 Methylation. *J Nutr* *136*, 1706S-1710S.

618 Waterland, R.A., and Jirtle, R.L. (2004). Early nutrition, epigenetic changes at transposons
619 and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition* *20*, 63–
620 68.

621 Zhang, X., Yuan, Y., Jiang, L., Zhang, J., Gao, J., Shen, Z., Zheng, Y., Deng, T., Yan, H., Li,
622 W., et al. (2014). Endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin and thapsigargin
623 protects against transient ischemic brain injury. *Autophagy* *10*, 1801–1813.

624

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge EVONIK Industries and Agence National de la Recherche et de la Technologie (ANRT, France) for the scholarship to S.S. (CIFRE PhD Research Grant). Special thanks are due to K. Dias, V. Veron, M Cluzeaud, A Surget (INRA-UPPA, UMR1419 Nutrition Métabolisme Aquaculture, F-64310 St-Pée-sur-Nivelle, France). We also thank the staff at the fish farm (F. Vallée, F. Terrier, A. Lanuque, F. Sandres and P. Aguirre) for animal care.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.S., K.M., S.P. and I.S. designed the research. S.S. and C.H. conducted the analyses. All the data were analysed by S. S. under the supervision of S.P. and I.S. The manuscript was written by S.S. and critically revised by I.S., L.M., K.M. and S.P. All authors have read and approved the final manuscript. I.S. has primary responsibility for final content.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

There are no contractual agreements for the presented data, which might cause conflicts of interest.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Experimental set-up. At first feeding, fry were fed with either a control diet (C) containing 0.91% of methionine or a methionine deficient diet (MD) containing 0.39% of methionine for 2 weeks. Afterwards, fish were subjected to a 18-week growth trial with a standard diet (SD) followed by a 2-week challenge test (with the MD diet as the challenge diet compared to the C diet) in order to test the existence of a nutritional programming.

Figure 2. Dietary methionine deficiency was sensed in fry. (A) The mRNA levels of *asparagine synthase (asns)* and *DNA-damage inductible transcript 3 (ddit3)* were measured using quantitative real-time RT-qPCR assays in liver of fry sampled 16h after the last meal. Expression values were normalized with the *eukaryotic translation elongation factor 1 α 1 (eef1a1efl)* mRNA. Values are means (n = 6), with standard error of the mean represented by vertical bars. * was used to indicate significant difference between treatment among the two dietary group ($P < 0.05$; t-test). **(B)** Graph showing area of liver (% of control) of 3 fish / condition. Below: Representative images of livers of fry fed the control diet “C” or the methionine deficient diet “MD”.

Figure 3. Direct and programmed effect of dietary methionine deficiency on the levels of (A) methionine and (B) methionine related metabolites as well as on (C and D) the phosphorylation of key factors of the mTOR and GCN2/eIF2 α signaling pathways in the liver of trout sampled 16 h after the last meal. Western blot analyses shown in C and D were carried out on six individual samples per treatment, and a representative blot is shown. Graphs show the ratio of the phosphorylated form to the total form of the targeted protein. . Values are means (n = 6), with standard error of the mean represented by vertical bars and were analysed using two-way Anova or PERMANOVA, followed by Tukey’s post hoc test for multiple comparisons. When interaction between Diet and nutritional past is significant, lowercases letters (a, b and c) represent statistically significant differences ($P < 0.05$, Tukey’s HSD).

Figure 4. Methionine deficiency and mitochondrial integrity. (A) Relative mtDNA copy number in the liver of experimental trout sampled 16 h after the last meal **(B)** TIM23 levels in the liver of trout of C-C, C-MD, MD-C or MD-MD group sampled 16 h after the last meal. 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 TIM23 to β -tubulin

(TUBB) used as a loading control. **(C)** Complex II and IV activity in the hepatic mitochondria isolation of trout of C-C, C-MD, MD-C or MD-MD group sampled 16 h after the last meal. Analysis was carried out on six individual samples per treatment. Values are means ($n = 6$), with standard error of the mean represented by vertical bars and were analysed using two-way Anova or PERMANOVA, followed by Tukey's post hoc test for multiple comparisons. When interaction between diet and nutritional past is significant, lowercases letters (a, b and c) represent statistically significant differences ($P < 0.05$, Tukey's HSD).

Figure 5. Methionine deficiency has a direct and programmed effect on mitophagy. Levels of **(A)** PARKIN, **(B)** p-S65-Ub and **(C)** MFN2 in mitochondria isolated from liver of trout of C-C, C-MD, MD-C or MD-MD group and sampled 16 h after the last meal 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 to β -tubulin (TUBB), the total amount of ubiquitin or the total amount of protein used as a loading control. Values are means ($n = 6$), with standard error of the mean represented by vertical bars and were analysed using two-way Anova or PERMANOVA, followed by Tukey's post hoc test for multiple comparisons. When interaction between Diet and nutritional past is significant, lowercases letters (a, b and c) represent statistically significant differences ($P < 0.05$, Tukey's HSD).

Figure 6. Induction of ER stress- and apoptosis-related factors in the liver of fish fed the methionine deficient diet. **(A)** mRNA levels of *DNA-damage inducible transcript 3 (ddit3)*, *X-box binding protein 1 (xbp1)* and *asparagine synthetase (asns)* were measured using quantitative real-time RT-qPCR assays in liver of trout sampled 16 h after the last meal. Expression values were normalized with the *eukaryotic translation elongation factor 1 α 1 (eef1a1efl)* mRNA. **(B)** Western blot analysis of cleaved Parp protein in the liver of trout sampled 16h after the last meal. 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 to β -tubulin (TUBB) used as a loading control. Values are means ($n = 6$), with standard error of the mean represented by vertical bars and were analysed using two-way Anova or PERMANOVA, followed by Tukey's post hoc test for multiple comparisons. When interaction between Diet and nutritional past is significant, lowercases letters (a, b and c) represent statistically significant differences ($P < 0.05$, Tukey's HSD).

709 **Figure 7. Methionine deficiency at the first feeding affected the hepatic epigenetic**
710 **landscape of fish at later juvenile stages. (A)** Global DNA methylation in liver of fish
711 sampled 16h after the last meal. (B-D) Western blot analysis of global histone modifications
712 at H3k9me3, H3K36me3 and H3K4me3 in liver of trout sampled 16h after the last meal.
713 Western blot analysis was carried out on six individual samples per treatment, and a
714 representative blot is shown. Graphs show the ratio of the targeted histone mark to the total
715 amount of H3 used as a loading control. Values are means ($n = 6$), with standard error of the
716 mean represented by vertical bars and were analysed using two-way Anova or
717 PERMANOVA, followed by Tukey's post hoc test for multiple comparisons. When
718 interaction between Diet and nutritional past is significant, lowercases letters (a, b and c)
719 represent statistically significant differences ($P < 0.05$, Tukey's HSD).

Table 1. Ingredient and analytical composition of the C and MD diets

	C	MD
Ingredient (%)		
Fish protein concentrate ^a	5	5
Faba bean protein concentrate ^b	17.5	17.5
Soy protein concentrate ^c	17.5	17.5
White lupin meal ^d	12	12
Dehulled pea meal ^e	6	6
Fish oil ^f	15	15
Gelatinised starch ^g	10	10
CaHPO ₄ .2H ₂ O (18%P)	3	3
Min. premix, INR1 ^h	2	2
Vit. Premix, INRA ⁱ	2	2
Free amino acid (%)	10*	10**
Analytical composition (%)		
DM	96.94	96.73
carbohydrate	13.85	13.91
crude protein (% as fed)	41.42	41.66
lipids (%DM)	18.04	18.15
energy (%DM)	23.21	23.21
Amino acid (% as fed)		
Cysteine	0.43	0.44
Histidine	1.18	1.20
Isoleucine	1.90	1.91
Lysine	2.61	2.68
Methionine	0.91	0.39
Phenylalanine	2.13	2.20
Threonine	1.89	1.95
Valine	2.18	2.21
Alanine	2.40	2.55
Aspartic acid	3.54	3.70
Glutamic acid	4.98	5.08
Glycine	2.71	2.89
Proline	1.91	1.96
Serine	1.90	2.01

721

722 ^aCPSP-G (Sopropêche); ^bFabaqua 55 (Sotexpro); ^cEstrilvo; CP 70 (Sopropêche); ^dFarilup500 (Terrena); ^eAquatex (sotexpro);723 ^fSouthern hemisphere (Sopropêche); ^gRoquette; ^hMineral premix (g or mg kg⁻¹ diet): calcium carbonate (40% Ca), 4.3 g;

724 magnesium oxide (60%Mg), 2.48 g; ferric citrate (21% Fe), 0.4 g; potassium iodide (76% I), 0.8 mg; zinc sulfate (36% Zn),

725 0.08 g; copper sulfate (25% Cu), 0.6 g; manganese sulfate (33% Mn), 0.06 g; dibasic calcium phosphate (23% Ca. 18%P), 10

726 g; cobalt sulfate, 0.4 mg; sodium selenite (46% Se), 0.6 mg; KCl, 1.8 g; NaCl, 0.8 g; ⁱVitamin premix (IU or mg kg⁻¹ diet):727 DL- α tocopherol acetate, 120 IU; sodium menadione bisulphate, 10 mg; retinyl acetate, 30.000 IU; DL-cholecalciferol, 6.000

728 IU; thiamine, 30 mg; riboflavin, 60 mg; pyridoxine, 30 mg; B12, 0.1 mg; nicotinic acid, 350 mg; folic acid, 1 g; inositol, 2 g;

729 biotin, 5 mg; calcium pantothenate, 0.1 g; choline chloride, 4 g; *Free amino acid (% of the diet): Arginine, 0.07%; Cysteine,

730 0%; Histidine, 0.42%; Isoleucine, 0.30%; Leucine, 0.77%; Lysine, 1.36%; DL-methionine 0.55%; Phenylalanine, 0.5%;

731 Threonine, 0.81%; Tryptophan, 0.07%; Tyrosine, 0.45%; Valine, 0.54%; Alanine, 0.97%, Aspartic acid, 0.51%; Glutamic

732 acid, 0.45%; Glycine, 1.20%; Proline, 0.52%, Serine, 0.5% (Evonik); **Free amino acid (% of the diet): Arginine, 0.07%;

733 Cysteine, 0%; Histidine, 0.42%, Isoleucine, 0.30%; Leucine, 0.77%; Lysine, 1.36%; DL-methionine 0.0%; Phenylalanine,

734 0.5%; Threonine, 0.81%; Tryptophan, 0.07%; Tyrosine, 0.45%; Valine, 0.54%; Alanine, 1.10%, Aspartic acid, 0.58%;

735 Glutamic acid, 0.51%; Glycine, 1.35%; Proline, 0.58%, Serine, 0.57%.

736

	SD
Ingredient (%)	
fish flour 70 ^j	32
Corn gluten meal ^k	9
Wheat gluten meal ^l	10
Soybean meal ^m	2.5
soyabean protein concentrate ⁿ	8.5
White lupin meal ^o	2.5
Dehulled pea meal ^p	1.5
Rapeseed meal ^q	2
Whole wheat ^r	14
Soyabean lecithin ^s	1
Mineral premix ^t	1
Vitamin premix ^u	1
Fish oil ^v	15
Analytical composition (%as fed)	
DM	96.59
carbohydrate	11.27
crude protein (% DM)	48.51
lipids (%DM)	20.42
energy (%DM)	24.01
Amino acid (% as fed)	
Cysteine	0.71
Histidine	1.04
Isoleucine	2.18
Lysine	2.77
Methionine	1.09
Phenylalanine	2.40
Threonine	1.75
Valine	2.40
Alanine	2.70
Aspartic acid	3.86
Glutamic acid	9.48
Glycine	2.40
Proline	3.18
Serine	2.17

738

739 ^j Sopropêche (Wimille, France) ; ^k Soal ; ^l Roquette (Lestrem, France); ^m CP 48; Inzo, France ; ⁿ Estrilvo; CP 70
740 (Sopropêche) ; ^o Farilup500 (Terrena); ^p Aquatex (sotexpro) ; ^q Primor 00; Sud Ouest Aliment, France ; ^r Sud Ouest Aliment,
741 France ; ^s Louis François (Croissy-Beaubourg, France); ^t Mineral mixture (g/kg premix): CaHPO₄·2H₂O, 500; CaCO₃, 215;
742 Mg(OH)₂, 124; KCl, 90; NaCl, 40; FeSO₄ · 7H₂O, 20; ZnSO₄ · 7H₂O, 4; MnSO₄·H₂O, 3; CuSO₄·5H₂O, 3; NaF, 10; KI,
743 0.04; Na₂SeO₃, 0.03; CoCl₂ · 6H₂O, 0.02. All ingredients were diluted with α-cellulose. ^u Vitamin premix (IU or g/kg
744 premix): retinyl acetate, 500,000 IU; cholecalciferol, 250,000 IU; DL-α-tocopheryl acetate, 5,000 IU; sodium menadione
745 bisulfate, 1 g; thiamin-HCl, 0.1 g; riboflavin, 0.4 g; niacin, 1 g; D-calcium pantothenate, 2 g; pyridoxine-HCl, 0.3 g; D-biotin,
746 20 mg; folic acid, 0.1 g; cyanocobalamin, 1 mg; L-ascorbyl-2-polyphosphate, 5 g; myo-inositol, 30 g; choline, 100 g. All
747 ingredients were diluted with α-cellulose. ^v Sopropêche (Wimille, France).

748

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

Genes	Forward primer	Reverse primer
ER stress related genes		
<i>asns</i>	CTGCACACGGTCTGGAGCTG	GGATCTCGTCTGGGATCAGGT
<i>ddit3</i>	CTGCACACGGTCTGGAGCTG	GGATCTCGTCTGGGATCAGGT
<i>xbp1</i>	CAACCCCGAGAACACAGTTT	AAGTGACACACGCTGTGGTC
Reference gene		
<i>eef1a1efl</i>	TCCTCTTGGTCGTTTCGCT	ACCCGAGGGACATCCTGTG

750

Table 4 Direct and programmed effect of methionine restriction in rainbow trout on survival, weight (g), feed intake (% body weight/d), feed efficiency and hepatosomatic index (HSI).

Index	C		MD	
Weeks 0–20 (first stimuli and growth trial)				
Survival (%)	98.61 ± 1.86		98.05 ± 2.38	
final body mass (g)	56.12 ± 1.45		59.56 ± 2.15	
Feed intake (% body weight/d)	2.38 ± 0.82		1.92 ± 0.20	
Feed efficiency	1.18 ± 0.03		1.24 ± 0.04	
	C-C	C-MD	MD-C	MD-MD
Weeks 20-22 (final challenge)				
Survival (%)	80.74 ± 2.56	81.48 ± 1.28	82.96± 2.56	82.96 ± 1.28
Final body mass (g)	81.26 ± 11.79 ^a	80.08 ± 17.18 ^a	89.21 ± 18.16 ^b	91.16 ± 19.64 ^b
HSI	1.61 ± 0.31 ^a	2.26 ± 0.50 ^b	1.56 ± 0.28 ^a	2.59 ± 0.41 ^c

C, control diet; MD, methionine deficient diet. C-C corresponds to fish fed the C diet during the first meal and during the final challenge, C-MD corresponds to fish fed the C diet during the first meal and MD diet during the final challenge, MD-C corresponds to fish fed the MD diet during the first meal and C diet during the final challenge and finally, MD-MD corresponds to fish fed the MD diet during the first meal and during the final challenge. Survival (%) = 100 × final fish number / initial fish Number. Feed intake = 100 × the total amount of ingested feed (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 = Gain in total biomass [(final biomass – initial biomass) (kg wet mass)] divided by the amount of ingested dry matter (kg DM). HSI = (liver weight / total body weight) × 100. ^{a,b}Mean values with unlike superscript letters were significantly different among the two dietary groups (P < 0.05; t-test).

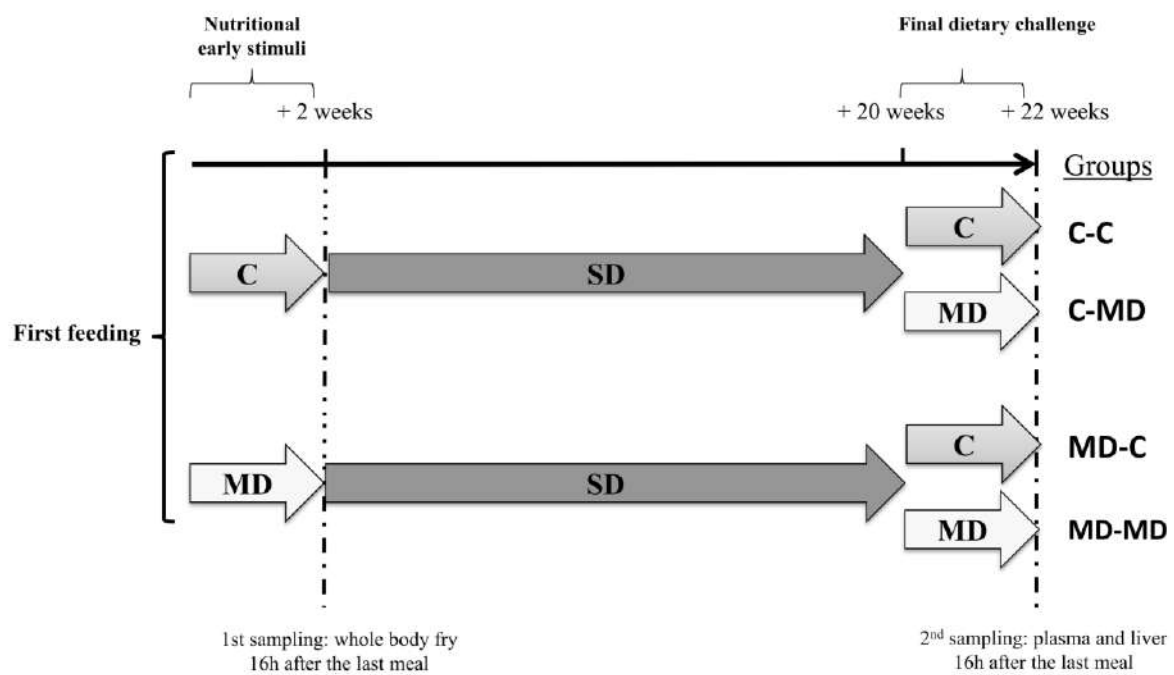


Figure 1

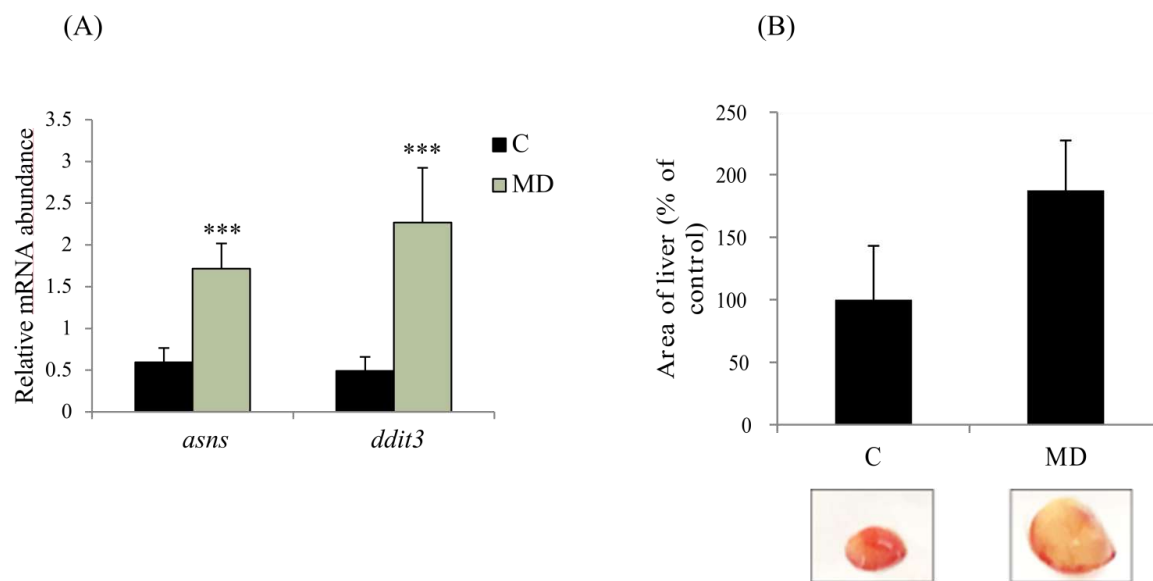


Figure 2

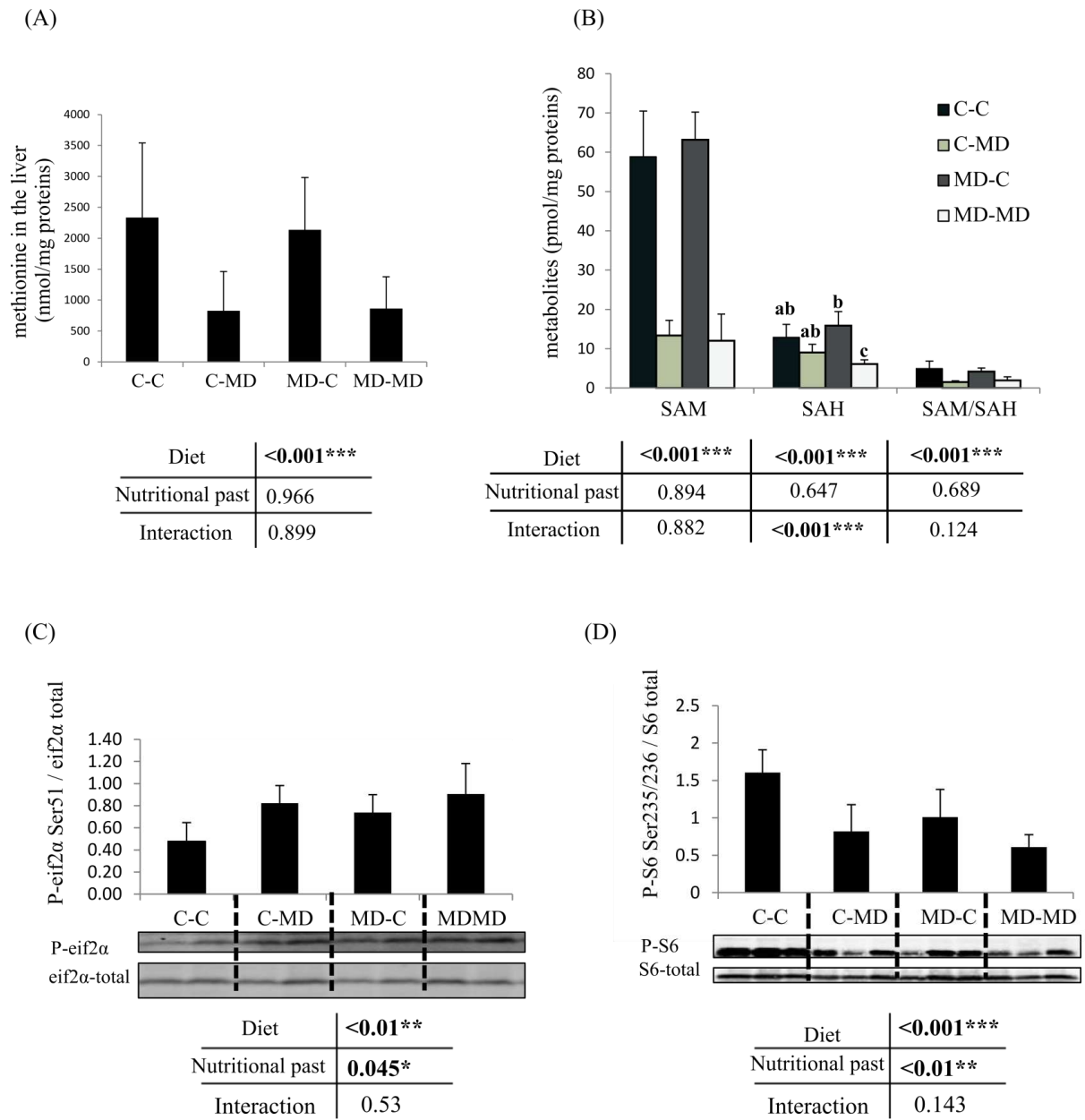


Figure 3

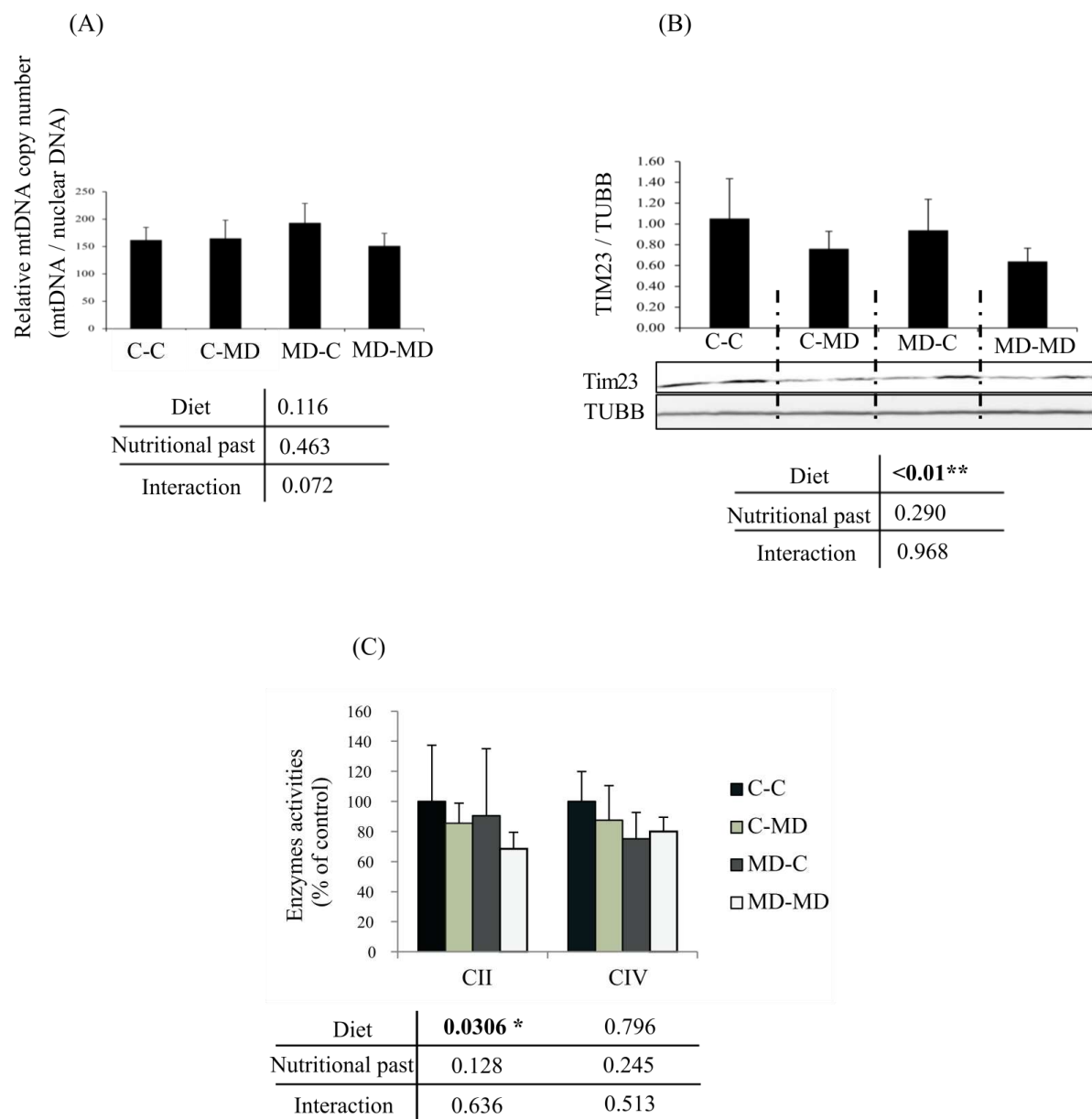


Figure 4

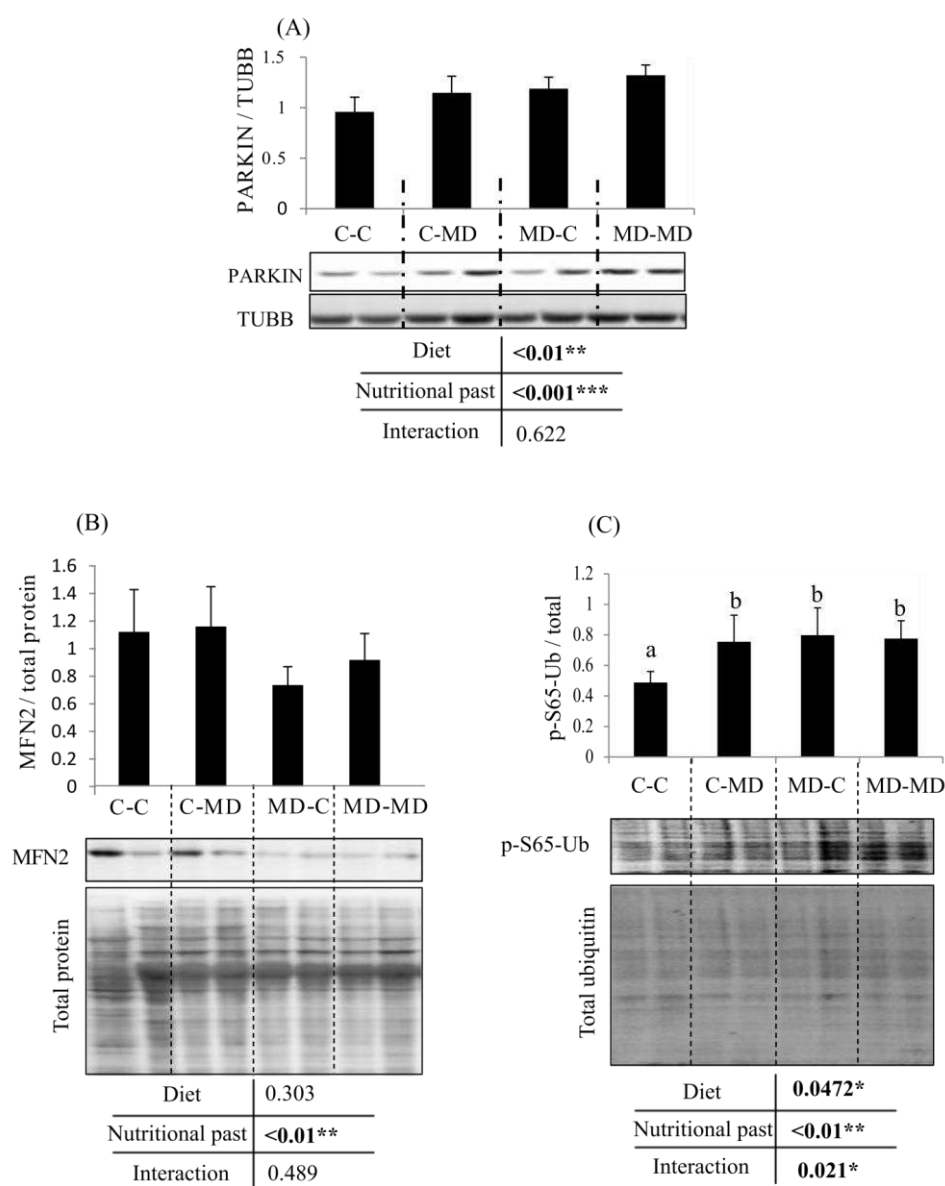


Figure 5

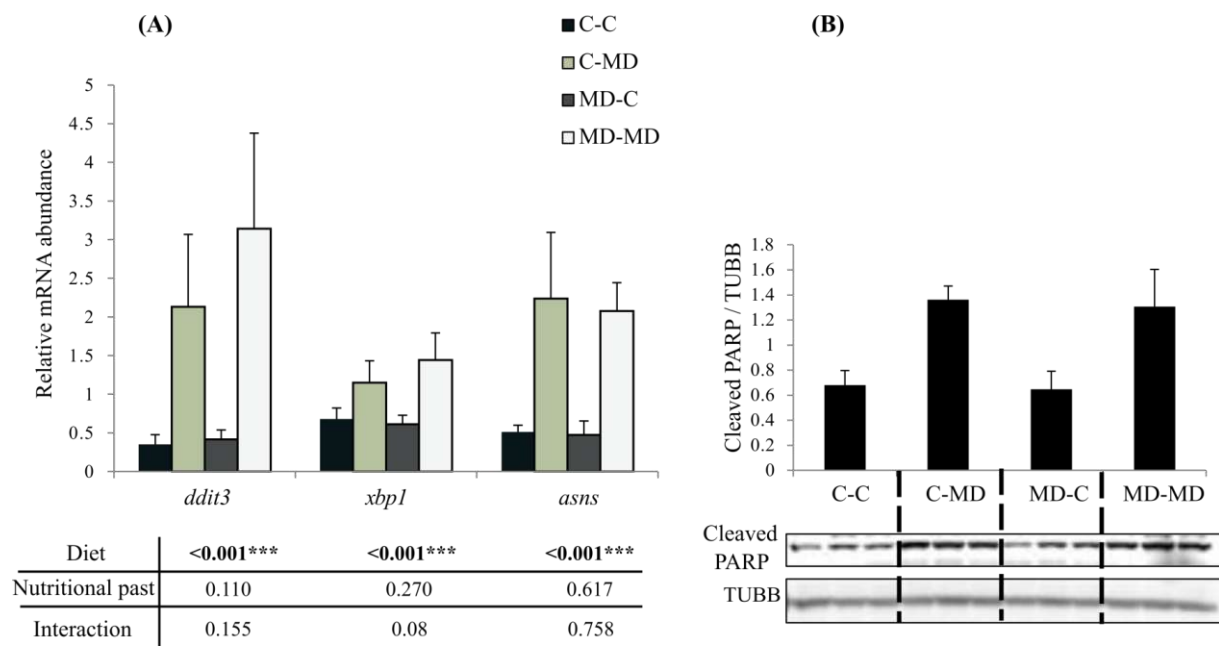


Figure 6

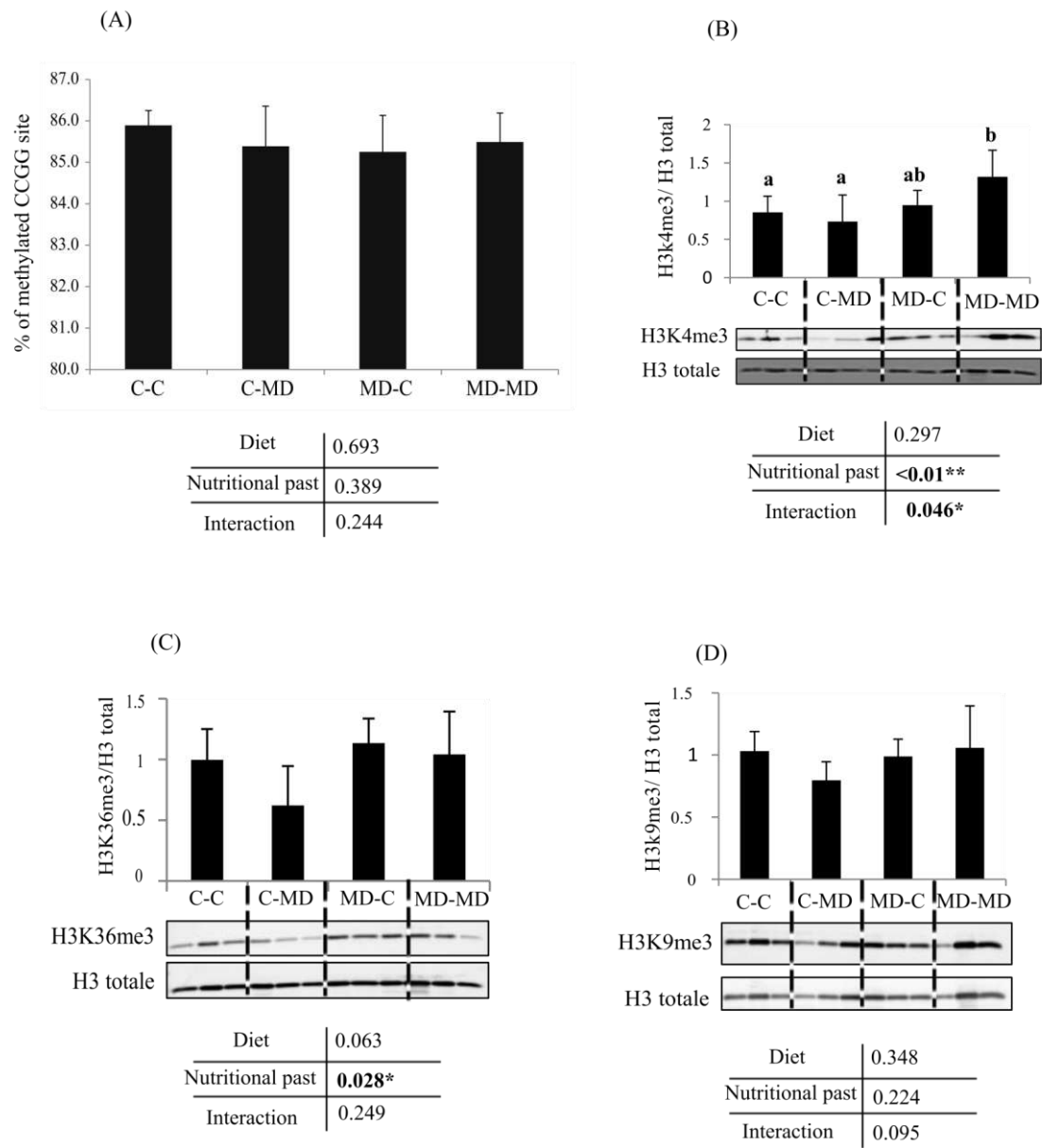


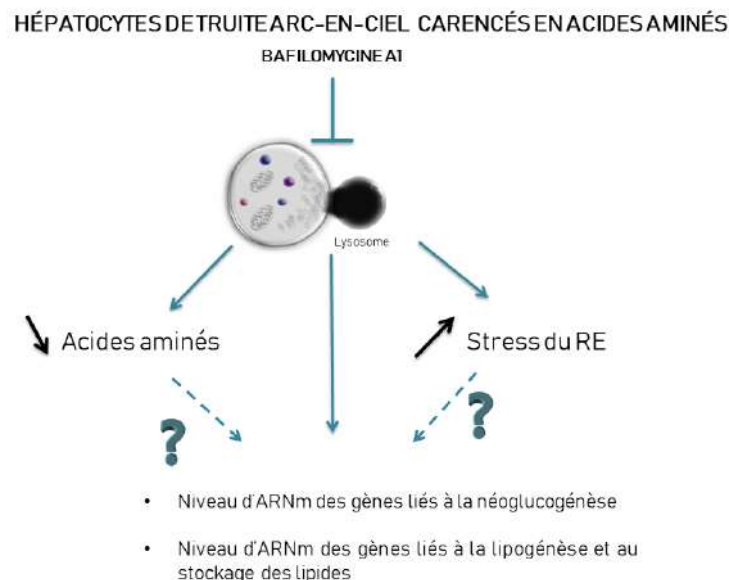
Figure 7

PUBLICATION N°3: L'inhibition de l'autophagie avec la bafilomycine A1 affecte l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire

Objectifs :

Au cours de cette partie nous nous sommes détachés de la thématique principale de la thèse afin (i) de clarifier l'effet d'une inhibition de l'autophagie sur l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire dans des hépatocytes de truite carencés en acides aminés et (ii) déterminer les interactions existantes entre l'autophagie, l'homéostasie du Réticulum Endoplasmique (RE) et le métabolisme intermédiaire..

Principaux résultats et conclusions



- L'inhibition de l'autophagie avec la bafilomycine A1 diminue les niveaux d'ARNm des gènes liés à la néoglucogénèse et augmente ceux impliqués dans la lipogénèse et le stockage de lipides.
- Ces effets sont associés à une baisse de la quantité des acides aminés dans les hépatocytes et une induction du stress du RE.

Dans cette étude, nous confirmons qu'une inhibition de l'autophagie affecte l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire et mettons en lumière un rôle jusqu'ici inconnu de l'autophagie. De plus, nous avons mis en évidence que l'inhibition de l'autophagie avec la bafilomycine A1 diminuait la quantité d'acide aminé et induisait un stress du RE dans les hépatocytes, ce qui peut expliquer les effets observés.



The Autophagic Flux Inhibitor Bafilomycine A1 Affects the Expression of Intermediary Metabolism-Related Genes in Trout Hepatocytes

Sarah Séité^{1,2,3}, Tracy Pioche¹, Nicolas Ory¹, Elisabeth Plagnes-Juan¹, Stéphane Panserat¹ and Iban Seilliez^{1*}

¹ INRA, E2S UPPA, UMR 1419, Nutrition, Métabolisme, Aquaculture, University of Pau and Pays de l'Adour, Saint-Pée-sur-Nivelle, France, ² Evonik Rexim, Ham, France, ³ Evonik Nutrition and Care GmbH, Hanau, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

Francesco Fazio,
University of Messina, Italy

Reviewed by:

Zhen-Yu Du,
East China Normal University, China
Isabel Navarro,
University of Barcelona, Spain

*Correspondence:

Iban Seilliez
iban.seilliez@inra.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Aquatic Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 17 December 2018

Accepted: 28 February 2019

Published: 18 March 2019

Citation:

Séité S, Pioche T, Ory N,
Plagnes-Juan E, Panserat S and
Seilliez I (2019) The Autophagic Flux
Inhibitor Bafilomycine A1 Affects
the Expression of Intermediary
Metabolism-Related Genes in Trout
Hepatocytes. *Front. Physiol.* 10:263.
doi: 10.3389/fphys.2019.00263

Autophagy is an evolutionarily conserved process of cellular self-eating which emerged these last years as a major adaptive metabolic response to various stresses such as fasting, hypoxia, or environmental pollutants. However, surprisingly very few data is currently available on its role in fish species which are directly exposed to frequent environmental perturbations. Here, we report that the treatment of fasted trout hepatocytes with the autophagy inhibitor Bafilomycine A1 lowered the mRNA levels of many of the gluconeogenesis-related genes and increased those of genes involved in intracellular lipid stores. Concurrently, intracellular free amino acid levels dropped and the expression of the main genes involved in the endoplasmic reticulum (ER) stress exhibited a sharp increase in autophagy inhibited cells. Together these results highlight the strong complexity of the crosstalk between ER, autophagy and metabolism and support the importance of considering this function in future studies on metabolic adaptation of fish to environmental stresses.

Keywords: fish, hepatocyte, autophagy, intermediary metabolism, ER stress, gene expression

INTRODUCTION

Macroautophagy (autophagy hereafter) is a cellular function conserved in eukaryotes that allows the recruitment of substrates into lysosomes for their degradation (Bento et al., 2016). In addition to its role as a “cell cleaner,” autophagy allows providing energy during fasting or other cellular stress in order to promote survival (Yang and Klionsky, 2010). In mammals, several studies demonstrated that autophagy maintains cellular, and energy homeostasis by degrading and recycling the main

Abbreviations: Acc2, acetyl CoA carboxylase 2; ATF6, activating transcription factor 6; Baf A1, Bafilomycine A1; chop, C/EBP homologous protein; CoA, stearyl coenzyme A; Dgat2, diacylglycerol acetyltransferase 2; edem1, ER degradation enhancing alpha-mannosidase like protein 1; eef1a1, eukaryotic elongation factor 1 α 1; eIF2 α , eukaryotic initiation factor 2 α ; fas, fatty acid synthase; fbp, fructose 1,6-bisphosphatase; g6pc, glucose 6-phosphatase; IRE1, inositol requiring 1; pck1, phosphoenol pyruvate carboxykinase 1 (cytosolic); pck2, phosphoenol pyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial); PERK, PKR-like ER kinase; plin2, perilipin 2; plin3, perilipin 3; Scd1, stearyl desaturase 1; SIDT2, SID-1 transmembrane family member 2; SREBP, sterol regulatory element-binding proteins; TUBB, β -tubulin; UPR, unfolded protein response; xbp1, X-box binding protein 1.

energy sources (proteins, lipids or glycogen) on exposure to various stresses (Madrigal-Matute and Cuervo, 2016). One of the first metabolic functions attributed to autophagy has been the release of amino acids through protein degradation during starvation. The released amino acids not only sustain protein synthesis under fasting condition, but also feed the tricarboxylic acid cycle for ATP production (Lum et al., 2005; Rabinowitz and White, 2010; Ezaki et al., 2011; Thomas et al., 2018). Furthermore, autophagic proteolysis in liver has been shown to make a significant contribution to the maintenance of glycaemia during fasting by releasing amino acids for glucose production via gluconeogenesis (Ezaki et al., 2011). In addition to its role in protein breakdown, autophagy has also been shown to play an important role in the degradation of hepatic lipid stores through a selective form of autophagy termed lipophagy (Singh et al., 2009). During this process, autophagy-dependent breakdown of lipid droplets supplies free fatty acids, which undergo β -oxidation in the mitochondria to support ATP production (Singh et al., 2009; Rambold et al., 2015; Welte, 2015). Although less studied than the two former autophagic processes, lysosomal breakdown of hepatic glycogen might also contribute to glucose homeostasis during some critical periods. In mice, this process known as glycophagy has thus been shown to be necessary to sustain life during the period of postnatal hypoglycemia (Kotoulas et al., 2006). Collectively, these data highlight the critical importance of autophagy for the adaptation of intermediary metabolism to environmental changes.

In fish, this cellular function is attracting growing interest and the number of studies in this field is constantly increasing. As such, induction of autophagy has been demonstrated upon different biotic or abiotic stress situations including pollution (Khengarot, 1992; Chen et al., 2015; Xing et al., 2015), hypoxia (Beck et al., 2016), viral contamination (Liu et al., 2015), fasting, or nutritional imbalance (Seiliez et al., 2012; Yabu et al., 2012; Wei et al., 2017, 2018; Séité et al., 2018; Wang et al., 2018). In these last few years, increasing research also focused on the mechanisms involved in the control of this cellular function in fish, particularly in zebrafish (He et al., 2009; Dowling et al., 2010; He and Klionsky, 2010; Mathai et al., 2017). In contrast, surprisingly, its metabolic role remains poorly explored in these species and very little data is currently available on this subject.

However, we previously reported that rainbow trout treated with the autophagy flux inhibitor agent Colchicine exhibited severe alterations in hepatic carbohydrate and fat metabolisms, as revealed by a significant decrease in plasma glucose levels associated with a decrease of the concentration of some glucogenic amino acids in the liver, but also an increase in hepatic triglyceride and lipid droplet contents (Seiliez et al., 2016). Similarly, recent works provided the evidence for the degradation of lipid stores through lipophagy in the liver of fasted zebrafish (Wang et al., 2018) and yellow catfish (*pelteobagrus fulvidraco*) fed zinc supplemented diet (Wei et al., 2018). Together, these data are in close agreement with the aforementioned metabolic role of autophagy demonstrated in mammals (Madrigal-Matute and Cuervo, 2016). However, they also suggest that in addition to this previously reported role of autophagy in providing substrates for glucose production, energy furniture, or the synthesis of

specific proteins, it could also play a major role in the regulation of the expression of some key metabolic genes. Indeed, these studies pointed out that autophagy inhibited fish exhibited strong perturbations in the mRNA levels of genes involved in hepatic carbohydrate and fat metabolisms (Seiliez et al., 2016; Wang et al., 2018). This would be an unknown function for autophagy. However, they show conflicting outcomes on specific gene expression regulations, precluding a clear picture of the role of autophagy in this process. Such differences could be explained by the divergence of experimental protocols such as the use of (1) different fish models (zebrafish vs. rainbow trout) and (2) different autophagy flux inhibitors (chloroquine vs. colchicine) and deserved further investigations.

In the present study, we treated primary cultures of trout hepatocytes with another autophagy flux inhibitor, the Baf A1, to assess the specificity of the previously reported *in vivo* effect of colchicine-mediated autophagy inhibition on the expression of several metabolism-related genes in this species. Baf A1 is widely used *in vitro* as an autophagic flux inhibitor. This drug inhibits the lysosomal V-ATPase to prevent its acidification as well as the Ca²⁺ pump SERCA to disrupt autophagosome-lysosome fusion, together resulting in a strong block of autophagic flux (Mauvezin and Neufeld, 2015). The use of primary cultures of trout hepatocytes is an additional asset for our study, as they allow testing the response of the studied factors to specific stimuli independently of their systemic effects. This model is now widely used to improve understanding of intermediary metabolism in fish (Moon et al., 1985).

MATERIALS AND METHODS

Animals

Sexually immature rainbow trout having a mean initial weight of 200 g were obtained from the INRA experimental facilities at Donzacq (Landes, France). Fish were maintained in tank kept in open circuits at a constant water temperature of 17°C, under natural photoperiod. They were fed to satiety every 2 days with a commercial diet (T-3P classic, Trouw, France). The experiments performed in the present study comply with the EU Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for research as well as the decree No 2013-118, 1 February 2013 of the French legislation on the ethical treatment of animals.

Hepatocyte Cell Culture

Rainbow trout liver cells were isolated from 3 days feed-deprived fish according to the previously detailed protocol (Lansard et al., 2010). We measured the cell viability (>98%) with trypan blue exclusion method (0.04% in 0.15 mol/L NaCl) and cells were counted using Neubauer chamber. They were then plated in a 6-well Primaria culture dish (BD) at a density of 3.106 cells/well and incubated at 18°C, the optimal temperature for cell cultures of trout origin, with complete medium containing modified Hanks' medium (136.9 mmol/L NaCl, 5.4 mmol/L KCl, 0.8 mmol/L MgSO₄, 0.44 mmol/L KH₂PO₄, 0.33 mmol/L Na₂HPO₄, 5 mmol/L NaHCO₃, and 10 mmol/L HEPES) supplemented with 1% defatted BSA, 3 mmol/L glucose, 2%

MEM essential amino acid mixture, 1% MEM non-essential amino acid mixture and 1% antibiotic antimycotic solution (1X) (sigma). The incubation medium was replaced every 24 h over the 48 h of primary cell culture. Microscopic examination ensured that hepatocytes progressively re-associated throughout culture to form cell heap. After 2 days of culture, the cells were incubated in a minimal medium deprived of serum and amino acids (a condition known to activate autophagy) in presence or absence of 100 nM of Baf A1 a concentration commonly used to block autophagosome-lysosome fusion *in vitro* (Klionsky et al., 2016). Cells were then sampled 4, 8, 16, and 24 h after the treatment and were prepared for western blot analysis or resuspended in TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, United States) and stored at -80°C for subsequent analyses. Each experiment was repeated 2 times.

Protein Extraction and Western Blot Analyses

Cells were prepared for western blot analyses according to the previously detailed protocol (Lansard et al., 2010). LC3-II levels were measured by western blot as described previously in Belghit et al. (2014) and using the following antibodies: anti-LC3b (#2775 Cell Signaling Technology) and anti-TUBB (#2146, Cell Signaling Technology). These antibodies have already been validated in rainbow trout (Belghit et al., 2014).

Quantitative RT-PCR Analyses

The protocol conditions for sample preparation and quantitative RT-PCR have been previously published (Lansard et al., 2010). The primers used for real time RT-PCR assays are listed in **Table 1**. Primer of *edem1* and *xbp1* were newly designed using Primer3 software. The primers that amplified glucose and lipid metabolism-related genes have already been described in previous studies (Plagnes-Juan et al., 2008; Marandel et al., 2015;

Seiliez et al., 2016). For the expression analysis, relative quantification of target gene expression was done using the ΔCT method described by Pfaffl et al. (2002). The relative gene expression value of *ef1a1* was used for the normalization of the measured expression values of the target mRNA, and was found to not change significantly over sampling time or among treatments (data not shown).

Free Amino Acid Analyses

Free amino acid concentrations in hepatocytes were determined by ion exchange chromatography with a ninhydrin post-column reaction (L-8900 Amino Acid Analyzer, Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan).

Statistical Analyses

Data are expressed as means $\pm$ SD. Normality was assessed using the Shapiro-test, while the equality of variances was determined using Levene's test. When the normality and/or equal variances of data were respected, two-way ANOVA was used to detect significant differences. Following two-way ANOVA analysis, the Tukey test was used for *post hoc* analysis. For all statistical analyses, the level of significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Baf A1 Inhibits Autophagy in Trout Hepatocytes

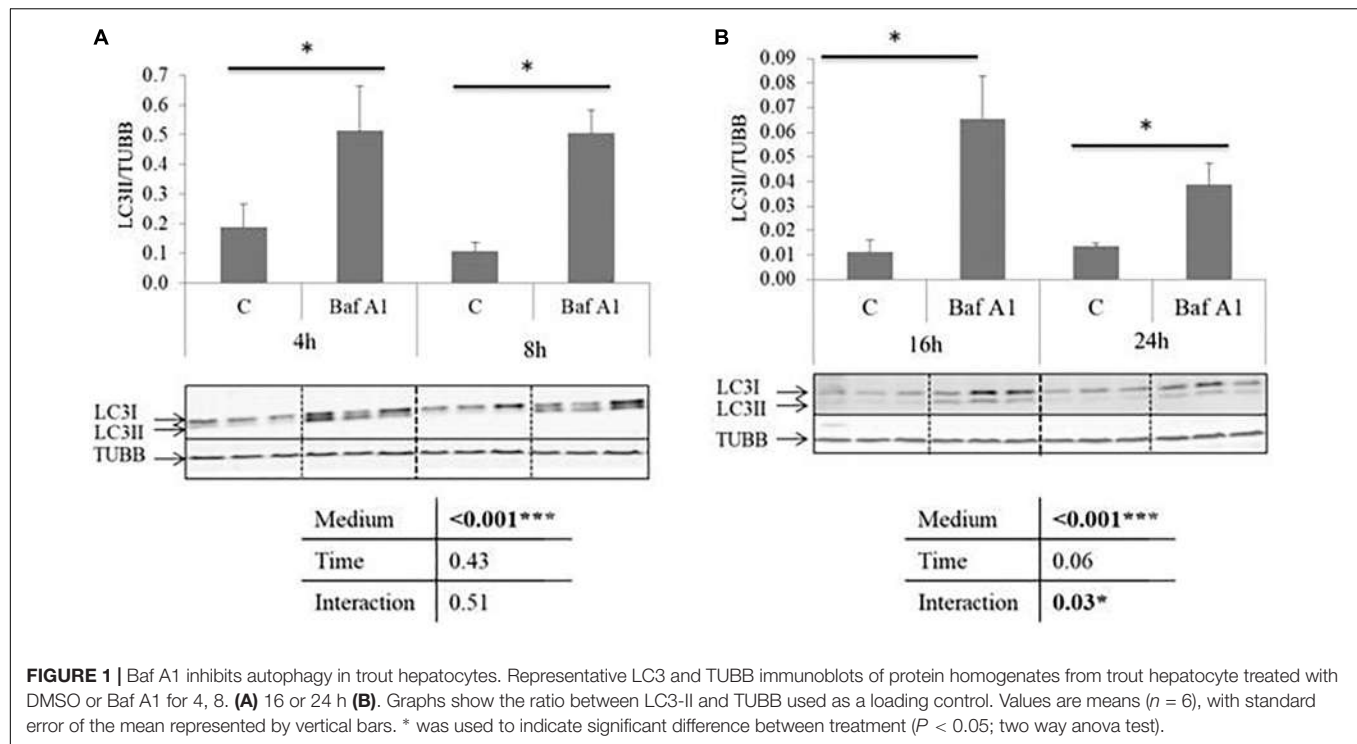
We first tested the ability of Baf A1 to block autophagy in our cell culture model. For this purpose, we analyzed by western blot the well-established autophagy marker LC3II in cells incubated in a serum- and amino acid-deprived medium (a condition known to activate autophagy) and treated or not with Baf A1 for 4, 8, 16, and 24 h. During autophagy, LC3 is converted from a non-lipidated cytosolic form (LC3-I) to a phosphatidylethanolamine-conjugated form (LC3II) on the autophagosomal membrane (Klionsky et al., 2016). However, LC3-II is also degraded during the late stage of autophagy, and it is now well accepted that the exposure of cells to lysosomal inhibitors, protease inhibitors or agent that block fusion of autophagosome with lysosomes, leads to LC3-II accumulation (Klionsky et al., 2016). As shown in **Figure 1**, the ratio of LC3-II to TUBB reached significantly higher levels in Baf A1 treated cells compared to non-treated cells. These results indicated that Baf A1 treated cells displayed a loss of autophagy function and that this drug is useful in our cell culture model.

Baf A1 Treatment Affects the Expression of Key Genes of the Intermediary Metabolism in Trout Hepatocytes

We next addressed the consequences of Baf A1 treatment on the expression of several metabolism-related genes. We first monitored the expression of several genes of the gluconeogenesis in cells incubated in the same conditions described above with or without Baf A1. The obtained results showed that the addition of

TABLE 1 | Sequences of the primer pairs used in the quantitative real-time RT-PCR assays.

Genes	Forward primer	Reverse primer
Gluconeogenesis related genes		
<i>pck1</i>	ACAGGGTGAGGCAGATGTAGG	CTAGTCTGTGGAGGTCTAAGGGC
<i>pck2</i>	ACAATGAGATGATGTGACTGCA	TGCTCCATCACCTACAACCT
<i>fbp1b1</i>	CTCTCAAGAACCTCTACAGCCT	TCAGTTCTCCGTTCCCTTC
<i>g6pca</i>	GATGGCTTGACGTTCTCCT	AGATCCAGGAGAGTCCCTCC
<i>g6pcb1</i>	AGGGACAGTTTCGAAAATGGAG	CCAGAGAGGGAAGAAGATGAAGA
<i>g6pcb2</i>	CCTGCGGAACACCTCTTTG	TCAATTTGTGGCGTGATGAG
Lipid metabolism related genes		
<i>fas</i>	TGATCTGAAGGCCCGTGCA	GGGTGACGTTGCCGTGGTAT
<i>plin2</i>	CATGGAGTCAGTTGAAGTCGTC	AATTTGTGGCTCCAGCTTGCC
<i>plin3</i>	GATGTCCAACACCGTCACAG	TCGATTCCAACCTCGTCCTC
ER stress related genes		
<i>chop</i>	CTGCACACGGTCTGGAGCTG	GGATCTCGTCTGGGATCAGGT
<i>edem1</i>	GAACATCCAACGGGACAGT	TGAGAAGAGGGAGGGAGTCA
<i>xbp1</i>	CAACCCCGAGAACACAGTTT	AAGTGACACAGCTGTGGTC
Reference gene		
<i>ef1a1</i>	TCCTCTTGGTCGTTTCGCT	ACCCGAGGGACATCCTGTG



Baf A1 to the media led to a significant decrease of mRNA levels of gluconeogenesis-related genes *g6pcb1* and *pck1* regardless of the time of treatment (Figures 2A,E). Similar results were obtained for *g6pca* and *fbp1b1* at 24 h after the treatment (Figures 2C,D) and for *pck2* at 16 and 24 h after the treatment (Figure 2F). In contrast, we observed an increase of mRNA levels of one of the *g6pc* paralogs, the *g6pcb2*, in trout hepatocyte treated with Baf A1 (Figure 2B).

We then analyzed the expression of several genes involved in lipid metabolism. The obtained results showed that mRNA levels of *fas* increased in cells treated with Baf A1 (Figure 3A). Similar results were obtained for *plin2* and *plin3*, two critical regulators of hepatic neutral lipid storage (Figures 3B,C).

Overall, these data confirmed our previous *in vivo* results obtained with Colchicine and established a tight link between the activity of autophagy and the expression of several glucose and lipid metabolism-related genes.

Baf A1 Treatment Lowers the Level of Free Amino Acids in Trout Hepatocytes

It is now well established that the expression of many metabolism-related genes is under the tight control of amino acid availability (Lansard et al., 2010, 2011). Autophagy being one of the main systems for the release of free amino acids during fasting, we wondered whether the effects of Baf A1 on metabolic gene expression could be related to a decrease in free amino acid levels in hepatocytes whose autophagy has been inhibited. We therefore, monitored the concentration of the main amino acids in fasted cells treated or not with Baf A1. As shown in Figure 4, hepatocytes treated with Baf A1 exhibited lower levels of most of the analyzed amino acids, in accordance with the reported role

of liver autophagy on amino acid release during starvation. This global decrease in amino acid release in hepatocytes treated with BafA1 could therefore contribute to perturb the expression of the studied genes.

Baf A1 Treatment Leads to ER Stress

Another hypothesis to explain the effect of Baf A1 on the expression of the studied genes concerns the endoplasmic reticulum (ER) stress. Accumulating evidences demonstrated that autophagy dysregulation causes ER stress (Yang et al., 2010), which has been shown to strongly impact the expression of intermediary metabolism-related genes (Lee et al., 2012; Wang and Kaufman, 2014; Zhou and Liu, 2014). However, to our knowledge, few if no data is available on the effect of autophagy dysregulation-mediated ER stress on the expression of intermediary metabolism-related genes. In the present study, we therefore sought to determine whether Baf A1 caused ER stress in our cells. To this end, we analyzed, in fasted hepatocytes treated with or without Baf A1, the expression of three target genes *chop*, *xbp1*, and *edem1* of the main ER-stress sensing pathways PERK, ATF6, and IRE1 pathways, respectively. As shown in Figure 5A, the mRNA levels of *chop* significantly increased in Baf A1 treated cells in comparison to control cells 4, 8 and 16 h after the treatment. Similar results were obtained for *xbp1*, with an increase at 4 and 8 h after the treatment (Figure 5B). Likewise, the mRNA levels of *edem1* increased 24 h after the treatment (Figure 5C), in line with previous findings demonstrating that *edem1* is a late ER-stress marker. Overall, the results obtained clearly show that hepatocytes treated with Baf A1 display sign of ER stress, which in turn could affect the expression of the studied genes.

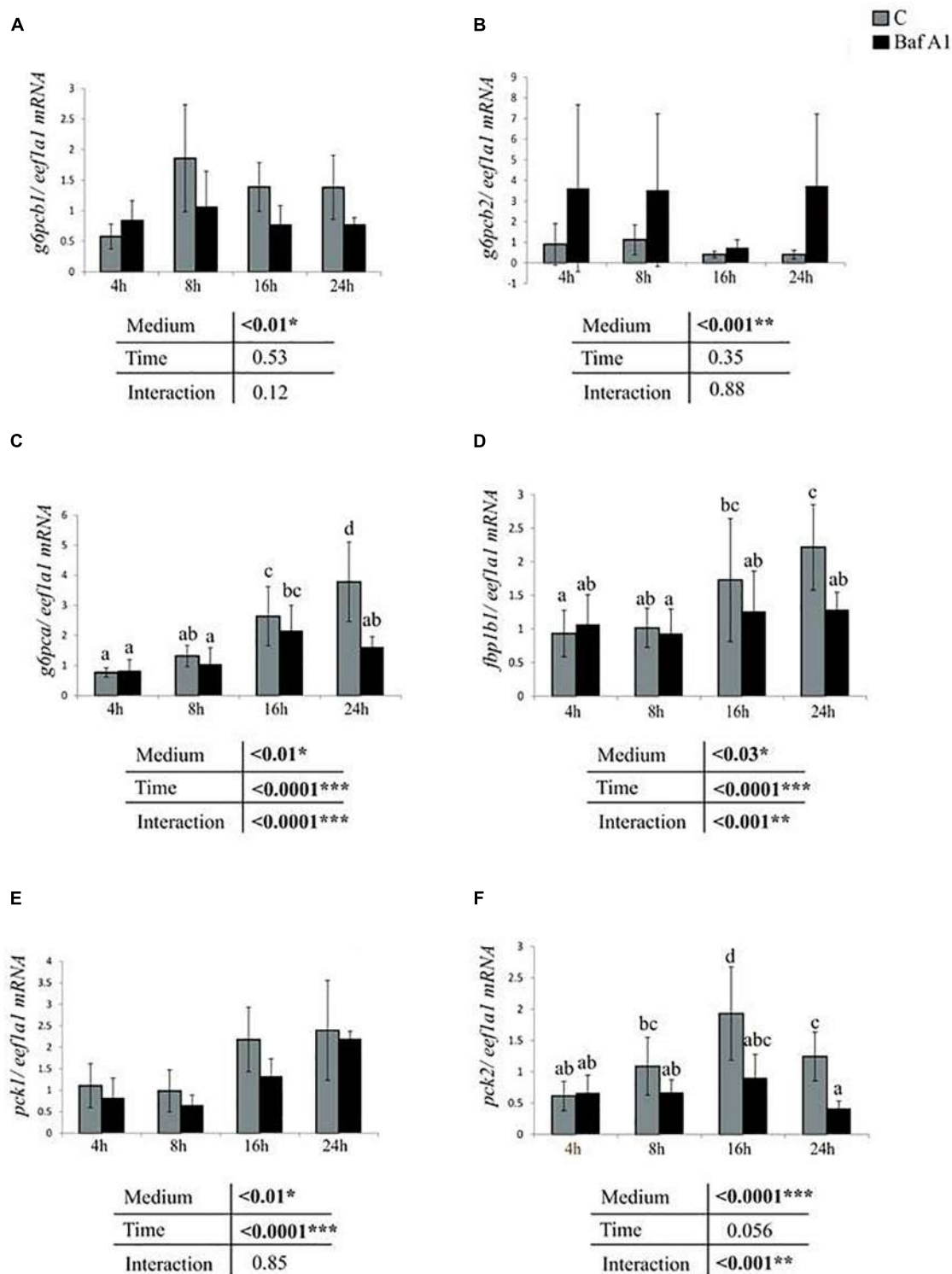


FIGURE 2 | Baf A1 treatment affects mRNA levels of gluconeogenic genes. Hepatocytes were treated with DMSO or Baf A1 for 4, 8, 16, or 24 h. Hepatocyte mRNA levels of (A) *g6pcb1*, (B) *g6pcb2*, (C) *G6pca*, (D) *fbp1b*, (E) *pck1*, and (F) *pck2* were measured using quantitative real time RT-PCR assays. Expression values are normalized with the eukaryotic translation elongation factor 1 α 1 (*eef1a1*) mRNA. Value are means ($n = 6$) with standard error represented by vertical bars and were analyzed using two-way ANOVA ($P < 0.05$), followed by Tukey's *post hoc* test for multiple comparisons. When interaction between sampling time and treatment is significant, lowercases letters (a, b, c, and d) represent statistically significant differences ($P < 0.05$, Tukey's HSD).

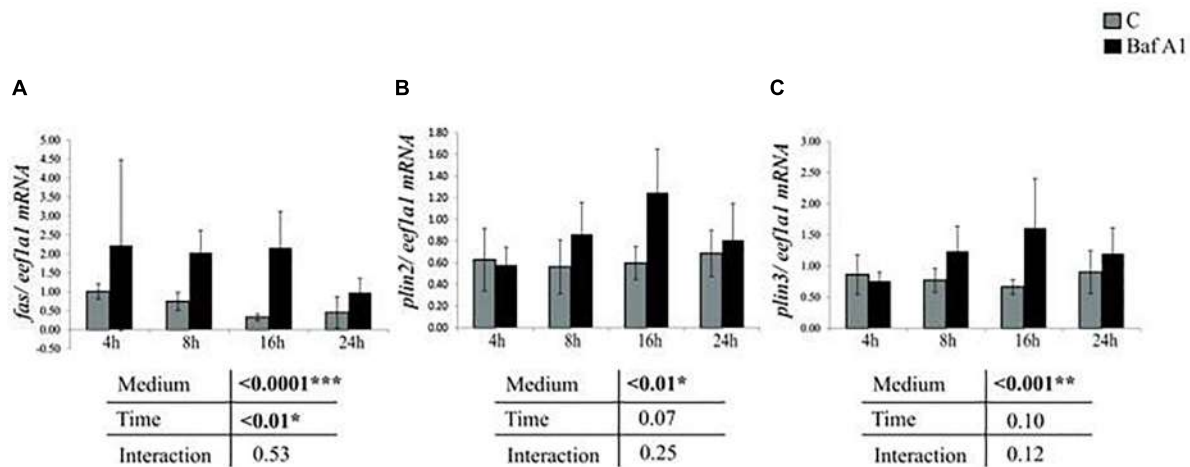


FIGURE 3 | Baf A1 treatment induces mRNA levels of lipid metabolism related genes. Hepatocytes were treated with DMSO or Baf A1 for 4, 8, 16, or 24 h. Transcripts levels of (A) *fas*, (B) *plin2*, and (C) *plin3* were measured using quantitative real time RT-PCR assays. Expression values are normalized with the *eukaryotic translation elongation factor 1 α 1* (*eefta1*) mRNA. Value are means ($n = 6$), with standard error represented by vertical bars and were analyzed using two-way ANOVA ($P < 0.05$), followed by Tukey's *post hoc* test for multiple comparisons.

DISCUSSION

Autophagy has long been considered merely as a cellular waste disposal and recycling mechanism. However, studies in recent years have highlighted its major role for the adaptation of metabolism to environmental changes (Kroemer et al., 2010; Chen et al., 2015; Chiarelli et al., 2016; Tang, 2016). In this regard, we and others showed that treatment of fasted fish (rainbow trout or zebrafish) with autophagy flux inhibitor agents (colchicine or chloroquine) led to strong defaults in intracellular substrates delivery for glucose production or energy furniture (Seiliez et al., 2016; Wang et al., 2018). Interestingly, these studies also pointed out sever perturbations in the mRNA levels of several intermediary metabolism-related genes in these fish, establishing a new potential link between autophagy and intermediary metabolism. However, probably due to divergences of experimental protocols (including the species investigated and the used autophagy flux inhibitors), these studies led to conflicting results with respect to the regulations of specific gene expression, precluding a clear picture of the role of autophagy in this process.

In the present study, we demonstrated that Baf A1 treatment of trout hepatocytes decreased the mRNA levels of genes involved in gluconeogenesis and conversely, increased those of genes involved in lipogenesis and lipid storage. Although it is well accepted that Baf A1 is an autophagy inhibitor, it may also have other side effects. For instance, some data reported that it has some effects on mitochondria quality (Yuan et al., 2015; Redmann et al., 2017), making it difficult to determine which effects on metabolism-related mRNAs could be a consequence of inhibiting autophagy or of direct effects on mitochondria independently of autophagy. However, our results are in close agreement with those previously reported in trout showing that *in vivo* treatment with colchicine (which act on autophagy by

inducing microtubule disassembly) led to a similar lowering effect on the mRNA levels of gluconeogenesis-related genes and an increasing effect on both *plin2* and *plin3* (Seiliez et al., 2016), suggesting that the observed effects are specific to autophagy inhibition. Interestingly, previous findings in mammals also evidenced a tight link between the activity of autophagy and mRNA levels of some enzymes involved in glucose metabolism (Wang et al., 2015). Acute suppression of autophagy with lysosome inhibitors (Chloroquine or Bafilomycin A1) in statin treated human liver cancer cell line (HepG2 cells) has thus been shown to reduce mRNA levels of the two gluconeogenic enzymes *g6pc* and *pck1* (Wang et al., 2015). Similarly, the statin-induced increase in expression of *g6pc* and *pck1* was blocked in Atg7-deficient hepatocytes, providing a genetic confirmation of these results (Wang et al., 2015). However, another study suggests the opposite role of autophagy in gluconeogenesis with the finding that overexpression of Atg7 reduces mRNA levels of *g6pc* and *pck1* in the livers of mice (Yang et al., 2010); But the induction of autophagy by Atg7 overexpression was not verified in this study, preventing to conclude on the specific role of this function in the observed effects. More recently, Wang et al. (2018) showed that chloroquine treatment of fasted zebrafish inhibited the hepatic expression of most genes related to lipid metabolism and conversely upregulated those of carbohydrates metabolism, making possible the existence of species-dependent effects of autophagy inhibition. Overall, these data support a close link between autophagy and the mRNA levels of metabolic genes, although the exact nature of this relationship, which likely depends on many factors (including the species studied and/or the protocol used to monitor this link), remains to be clarified.

It is now clearly established that the expression of a wide range of hepatic genes involved in the intermediary metabolism is under the control of amino acid availability. In trout hepatocytes, free amino acid addition to an amino acid-deprived medium

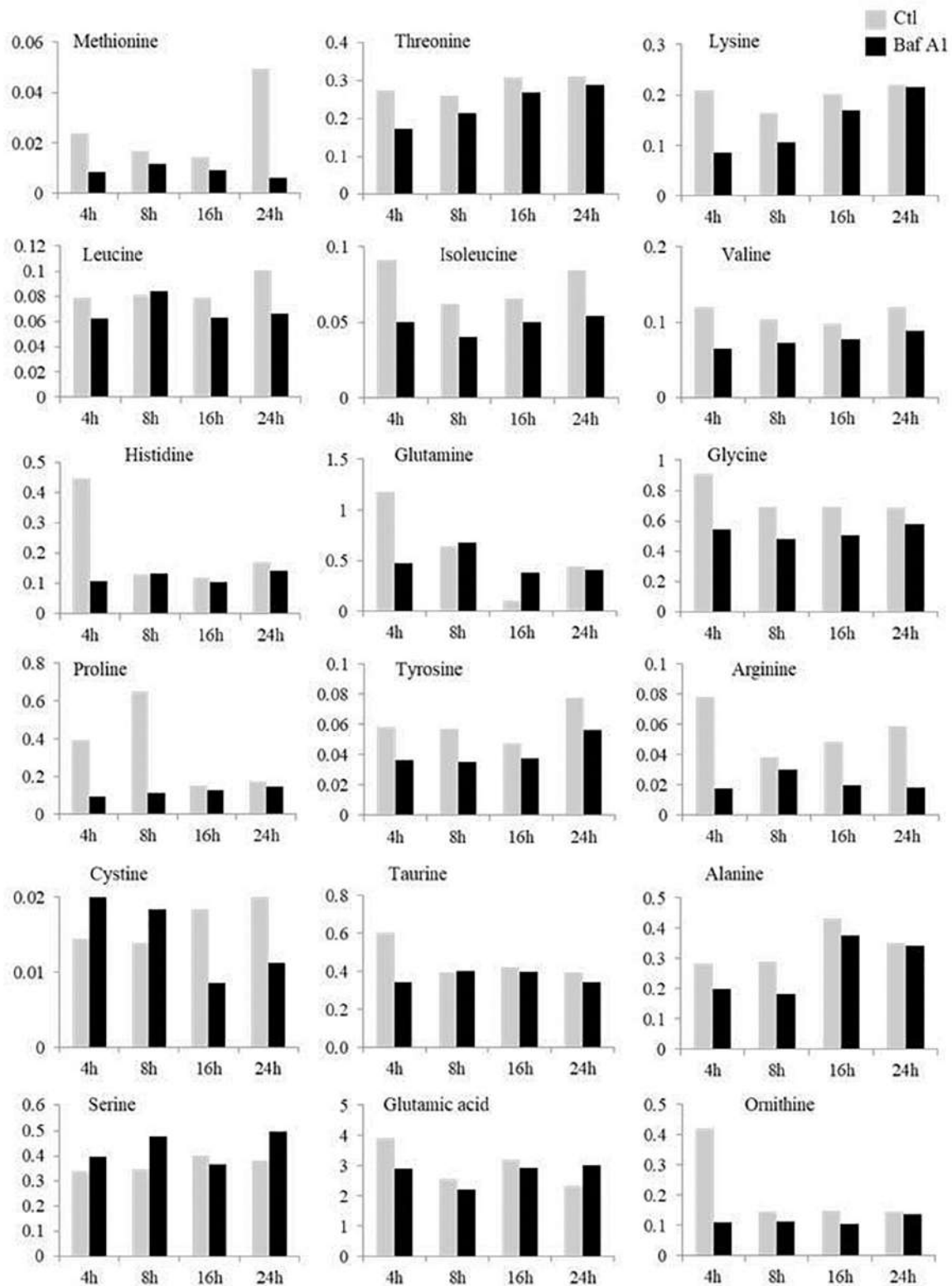
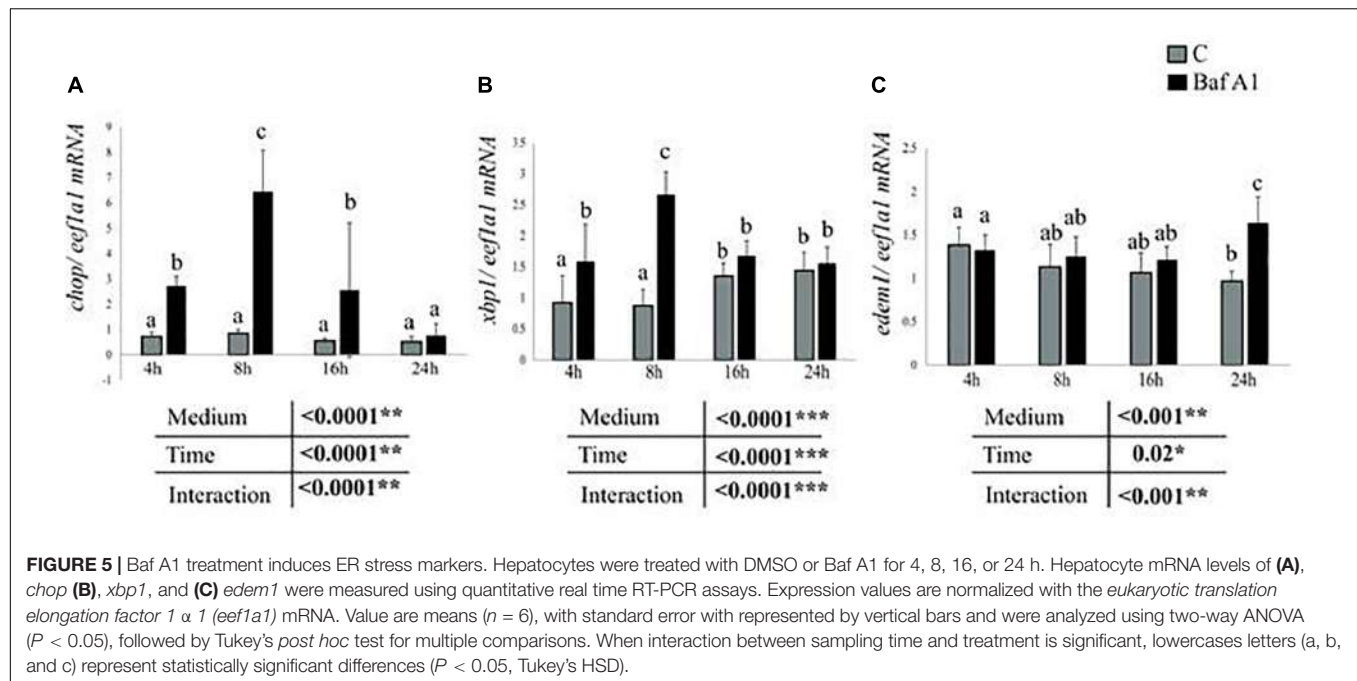


FIGURE 4 | Time courses of the changes in free amino acids in fasted hepatocytes treated or not with Baf A1. Fasted trout hepatocytes were treated with DMSO or Baf A1 for 4, 8, 16, or 24 h. The concentration of each amino acid is expressed as $\mu\text{mol/l}$ cell homogenate and was determined on a pool of samples from two independent experiments.



has thus been shown to up-regulate the mRNA levels of gluconeogenesis-related enzymes (Lansard et al., 2010, 2011). As autophagy is described as one of the main amino acid provider during fasting (Kuma et al., 2004; Ezaki et al., 2011), we therefore hypothesized that the observed effect of Baf A1 treatment on the mRNA levels of metabolic genes could be due to a default in free amino acid release in autophagy-inhibited hepatocytes. Accordingly, Baf A1 treated cells exhibited lower levels of most of the analyzed amino acids compared to control cells. Such an effect of autophagy in providing amino acids endogenously to sustain mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling when extracellular amino acids are limited has previously been reported in C2C12 murine myotubes (Yu and Long, 2014), and could therefore be also at play in the observed effect of Baf A1 on the studied genes. Interestingly, the expression of *g6pcb2* which, in contrast to the other analyzed gluconeogenesis-related genes increased in Baf A1 treated hepatocytes, was previously shown to exhibit an opposite regulation by feeding different levels of proteins and by amino acids levels in hepatocytes compared to other *g6pc* paralogs (Marandel et al., 2015; Lucie et al., 2016), tipping the scale in favor of a default of autophagy-dependent release of amino acids in the observed Baf A1 effect. However, not all studied genes are known to be under the control of amino acids *per se*. This is particularly the case for the gene *fas*, whose expression has already been shown to be not directly affected by the addition of amino acids to an amino acid-free medium in trout hepatocytes (Lansard et al., 2010, 2011). Instead, it is possible that the induction of ER stress observed in autophagy-inhibited hepatocytes plays an important role in the observed effect of Baf A1 treatment on these genes. Indeed, previous studies have shown that ER stress plays a critical role in regulation of lipid metabolism (Sriburi et al., 2004; Bobrovnikova-Marjon et al., 2008; Oyadomari et al., 2008; Rutkowski et al., 2008; Kammoun

et al., 2009; Zhang et al., 2014). According to these studies, ER stress leads to activation of the evolutionarily conserved UPR signaling system in order to restore ER homeostasis (Shen et al., 2004). Accumulating evidence shows that activation of the UPR pathways can modulate lipid metabolism by controlling the transcriptional regulation of lipogenesis and triglyceride storage (Basseri and Austin, 2012; Han and Kaufman, 2016). For example, PERK and eIF2 α phosphorylation are induced by antipsychotic drugs, resulting in increased lipid accumulation in hepatocytes through activation of sterol regulatory element-binding proteins SREBP-1c and SREBP-2, two transcription factors that regulate the expression of critical enzymes involved in lipogenic pathways including *fas* (Gosmain et al., 2005; Lauressergues et al., 2012). XBP1 also seems to be involved in the lipid metabolism through both direct and indirect activation of the transcription of key lipogenic genes in the liver, including *fas*, *plin2* as well as *CoA*, *desaturase 1* (*Scd1*), *Dgat2*, and *Acc2* (Lee et al., 2008, 2012). Together, these data support a possible role of ER stress in the observed effect of Baf A1 on the mRNA levels of enzymes involved in lipid metabolism. Noteworthy, UPR signaling has also been shown to affect the expression of genes involved in glucose metabolism and more particularly those of the gluconeogenesis pathway (Wagner and Moore, 2011).

Finally, recent findings in mammals reported a novel RNA degradation system called RNautophagy, during which direct import of RNA into lysosomes followed by degradation takes place (Fujiwara et al., 2013). During this process, the putative nucleic acid transporter SIDT2 predominantly localizes to lysosomes and mediates the translocation of RNA into lysosomes (Aizawa et al., 2016; Contu et al., 2017). Interestingly, the authors found that treatment of cells with lysosome inhibitors (chloroquine or Bafilomycin A1) hindered the SIDT2 overexpression-mediated increase in intracellular

RNA degradation. These data make therefore the impairment of RNautophagy a possible mechanism of the observed inducing effect of Baf A1 in the level of some mRNAs. However, it remains to be established whether or not RNautophagy or a RNautophagy-like process exists in fish.

Wrapping-Up

In the present study, we report that the treatment of fasted trout hepatocytes with Baf A1 strongly perturb the mRNA expression of several genes involved in glucose and lipid metabolisms. These results are in close agreement with those already reported with other autophagy inhibitors both in mammals and fish, and support a tight link between autophagy activity and the mRNA levels of metabolic genes. The underlying mechanisms are likely multiple and highlight the complexity of the crosstalk between ER, autophagy and metabolism.

Interestingly, the observed decrease in mRNA levels of gluconeogenic genes in cells treated with Baf A1 is also consistent with the reported role of autophagy in the maintenance of blood glucose during fasting by releasing amino acids for glucose production via gluconeogenesis (Ezaki et al., 2011). Similarly, we observed an increase in mRNA levels of FAS and the two LD-associated proteins PLIN2 and PLIN3 in Baf A1 treated cells in agreement with the well-established role of autophagy in the control of lipid stores during fasting (Singh et al., 2009; Wang et al., 2018; Wei et al., 2018). Autophagy could thus combine its role as a supplier of substrates for the production of glucose or energy furniture with the molecular regulation of several related metabolic enzymes.

REFERENCES

- Aizawa, S., Fujiwara, Y., Contu, V. R., Hase, K., Takahashi, M., Kikuchi, H., et al. (2016). Lysosomal putative RNA transporter SIDT2 mediates direct uptake of RNA by lysosomes. *Autophagy* 12, 565–578. doi: 10.1080/15548627.2016.1145325
- Basseri, S., and Austin, R. C. (2012). Endoplasmic reticulum stress and lipid metabolism: mechanisms and therapeutic potential. *Biochem. Res. Int.* 2012:841362. doi: 10.1155/2012/841362
- Beck, B. H., Fuller, S. A., Li, C., Green, B. W., Zhao, H., Rawles, S. D., et al. (2016). Hepatic transcriptomic and metabolic responses of hybrid striped bass (*Morone saxatilis* × *Morone chrysops*) to acute and chronic hypoxic insult. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* 18, 1–9. doi: 10.1016/j.cbpd.2016.01.005
- Belghit, I., Skiba-Cassy, S., Geurden, I., Dias, K., Surget, A., Kaushik, S., et al. (2014). Dietary methionine availability affects the main factors involved in muscle protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nutr.* 112, 493–503. doi: 10.1017/S0007114514001226
- Bento, C. F., Renna, M., Ghislat, G., Puri, C., Ashkenazi, A., Vicinanza, M., et al. (2016). Mammalian autophagy: how does it work? *Annu. Rev. Biochem.* 85, 685–713. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014556
- Bobrovnikova-Marjon, E., Hatzivassiliou, G., Grigoriadou, C., Romero, M., Cavener, D. R., Thompson, C. B., et al. (2008). PERK-dependent regulation of lipogenesis during mouse mammary gland development and adipocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 16314–16319. doi: 10.1073/pnas.0808517105
- Chen, D., Zhang, Z., Yao, H., Liang, Y., Xing, H., and Xu, S. (2015). Effects of atrazine and chlorpyrifos on oxidative stress-induced autophagy in the immune

In the future, important issues will be to confirm these observations by establishing fish cell lines whose autophagy is genetically invalidated, which is now possible with the CRISPR-Cas9 technology. Gaining knowledge in the relationships between ER, autophagy and metabolism is of paramount for a better understanding of the mechanisms involved in metabolic adaptation of fish to environmental stresses.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SS, SP, and IS designed the research. TP, NO, and EP-J conducted the analyses. All the data were obtained and analyzed by TP, NO, and SS under the supervision of SP and IS. The manuscript was written by SS and critically revised by IS and SP. All authors have read and approved the final manuscript. IS had primary responsibility for final content.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Evonik Industries and Agence National de la Recherche et de la Technologie (ANRT, France) for the scholarship to SS (CIFRE Ph.D. Research Grant). Special thanks are due to K. Dias (INRA-UPPA, UMR1419 Nutrition Métabolisme Aquaculture, F-64310 Saint-Pée-sur-Nivelle, France) and N. Hafnaoui (INRA, UMR1019 UNH, CRNH Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France) for their technical assistance. The authors also thank the staff at the fish farm (F. Vallée, F. Terrier, A. Lanuque, F. Sandres, and P. Aguirre) for animal care.

- organs of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 44, 12–20. doi: 10.1016/j.fsi.2015.01.014
- Chiarelli, R., Martino, C., Agnello, M., Bosco, L., and Roccheri, M. C. (2016). Autophagy as a defense strategy against stress: focus on *Paracentrotus lividus* sea urchin embryos exposed to cadmium. *Cell Stress Chaperones* 21, 19–27. doi: 10.1007/s12192-015-0639-3
- Contu, V. R., Hase, K., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Fujiwara, Y., Kabuta, C., et al. (2017). Lysosomal targeting of SIDT2 via multiple YxxΦ motifs is required for SIDT2 function in the process of RNautophagy. *J. Cell Sci.* 130, 2843–2853. doi: 10.1242/jcs.202481
- Dowling, J. J., Low, S. E., Busta, A. S., and Feldman, E. L. (2010). Zebrafish MTMR14 is required for excitation-contraction coupling, developmental motor function and the regulation of autophagy. *Hum. Mol. Genet.* 19, 2668–2681. doi: 10.1093/hmg/ddq153
- Ezaki, J., Matsumoto, N., Takeda-Ezaki, M., Komatsu, M., Takahashi, K., Hiraoka, Y., et al. (2011). Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels. *Autophagy* 7, 727–736. doi: 10.4161/auto.7.7.15371
- Fujiwara, Y., Furuta, A., Kikuchi, H., Aizawa, S., Hatanaka, Y., Konya, C., et al. (2013). Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA. *Autophagy* 9, 403–409. doi: 10.4161/auto.23002
- Gosmain, Y., Dif, N., Berbe, V., Loizon, E., Rieusset, J., Vidal, H., et al. (2005). Regulation of SREBP-1 expression and transcriptional action on HKII and FAS genes during fasting and refeeding in rat tissues. *J. Lipid Res.* 46, 697–705. doi: 10.1194/jlr.M400261-JLR200
- Han, J., and Kaufman, R. J. (2016). The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity. *J. Lipid Res.* 57, 1329–1338. doi: 10.1194/jlr.R067595

- He, C., Bartholomew, C. R., Zhou, W., and Klionsky, D. J. (2009). Assaying autophagic activity in transgenic GFP-Lc3 and GFP-Gabaparin zebrafish embryos. *Autophagy* 5, 520–526. doi: 10.4161/autophagy.5.4.7768
- He, C., and Klionsky, D. J. (2010). Analyzing autophagy in zebrafish. *Autophagy* 6, 642–644. doi: 10.4161/autophagy.6.5.12092
- Kammoun, H. L., Chabanon, H., Hainault, I., Luquet, S., Magnan, C., Koike, T., et al. (2009). GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 1201–1215. doi: 10.1172/JCI37007
- Khangarot, B. S. (1992). Copper-induced hepatic ultrastructural alterations in the snake-headed fish, *Channa punctatus*. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 23, 282–293. doi: 10.1016/0147-6513(92)90078-H
- Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M. J., Abeliovich, H., Acevedo Arozana, A., et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 12, 1–222. doi: 10.1080/15548627.2015.1100356
- Kotoulas, O. B., Kalamidas, S. A., and Kondomerkos, D. J. (2006). Glycogen autophagy in glucose homeostasis. *Pathol. Res. Pract.* 202, 631–638. doi: 10.1016/j.prp.2006.04.001
- Kroemer, G., Mariño, G., and Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell.* 40, 280–293. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.023
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., et al. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432, 1032–1036. doi: 10.1038/nature03029
- Lansard, M., Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Dias, K., Seiliez, I., and Skiba-Cassy, S. (2011). L-Leucine, L-methionine, and L-lysine are involved in the regulation of intermediary metabolism-related gene expression in rainbow trout hepatocytes. *J. Nutr.* 141, 75–80. doi: 10.3945/jn.110.124511
- Lansard, M., Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Seiliez, I., and Skiba-Cassy, S. (2010). Integration of insulin and amino acid signals that regulate hepatic metabolism-related gene expression in rainbow trout: role of TOR. *Amino Acids* 39, 801–810. doi: 10.1007/s00726-010-0533-3
- Lauressergues, E., Bert, E., Duriez, P., Hum, D., Majd, Z., Staels, B., et al. (2012). Does endoplasmic reticulum stress participate in APD-induced hepatic metabolic dysregulation? *Neuropharmacology* 62, 784–796. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.08.048
- Lee, A.-H., Scapa, E. F., Cohen, D. E., and Glimcher, L. H. (2008). Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science* 320, 1492–1496. doi: 10.1126/science.1158042
- Lee, J.-S., Mendez, R., Heng, H. H., Yang, Z., and Zhang, K. (2012). Pharmacological ER stress promotes hepatic lipogenesis and lipid droplet formation. *Am. J. Transl. Res.* 4, 102–113.
- Liu, C., Zhao, Y., Chen, L., Zhang, Z., Li, M., and Li, S. (2015). Avermectin induced autophagy in pigeon spleen tissues. *Chemico Biol. Interact.* 242, 327–333. doi: 10.1016/j.cbi.2015.10.022
- Lucie, M., Weiwei, D., Stéphane, P., and Sandrine, S.-C. (2016). The five glucose-6-phosphatase paralogous genes are differentially regulated by insulin alone or combined with high level of amino acids and/or glucose in trout hepatocytes. *Mol. Biol. Rep.* 43, 207–211. doi: 10.1007/s11033-016-3962-6
- Lum, J. J., DeBerardinis, R. J., and Thompson, C. B. (2005). Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 439–448. doi: 10.1038/nrm1660
- Madrigal-Matute, J., and Cuervo, A. M. (2016). Regulation of liver metabolism by autophagy. *Gastroenterology* 150, 328–339. doi: 10.1053/j.gastro.2015.09.042
- Marandel, L., Seiliez, I., Véron, V., Skiba-Cassy, S., and Panserat, S. (2015). New insights into the nutritional regulation of gluconeogenesis in carnivorous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a gene duplication trail. *Physiol. Genomics* 47, 253–263. doi: 10.1152/physiolgenomics.00026.2015
- Mathai, B. J., Meijer, A. H., and Simonsen, A. (2017). Studying autophagy in zebrafish. *Cells* 6:21. doi: 10.3390/cells6030021
- Mauvezin, C., and Neufeld, T. P. (2015). Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* 11, 1437–1438. doi: 10.1080/15548627.2015.1066957
- Moon, T. W., Walsh, P. J., and Mommsen, T. P. (1985). Fish hepatocytes: a model metabolic system. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 1772–1782. doi: 10.1139/f85-222
- Oyadomari, S., Harding, H. P., Zhang, Y., Oyadomari, M., and Ron, D. (2008). Dephosphorylation of translation initiation factor 2 α enhances glucose tolerance and attenuates hepatosteatosis in mice. *Cell Metab.* 7, 520–532. doi: 10.1016/j.cmet.2008.04.011
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., and 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. doi: 10.1093/nar/30.9.e36
- Plagnes-Juan, E., Lansard, M., Seiliez, I., Médale, F., Corraze, G., Kaushik, S., et al. (2008). Insulin regulates the expression of several metabolism-related genes in the liver and primary hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 211, 2510–2518. doi: 10.1242/jeb.018374
- Rabinowitz, J. D., and White, E. (2010). Autophagy and metabolism. *Science* 330, 1344–1348. doi: 10.1126/science.1193497
- Rambold, A. S., Cohen, S., and Lippincott-Schwartz, J. (2015). Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. *Dev. Cell* 32, 678–692. doi: 10.1016/j.devcel.2015.01.029
- Redmann, M., Benavides, G. A., Berryhill, T. F., Wani, W. Y., Ouyang, X., Johnson, M. S., et al. (2017). Inhibition of autophagy with bafilomycin and chloroquine decreases mitochondrial quality and bioenergetic function in primary neurons. *Redox Biol.* 11, 73–81. doi: 10.1016/j.redox.2016.11.004
- Rutkowski, D. T., Wu, J., Back, S.-H., Callaghan, M. U., Ferris, S. P., Iqbal, J., et al. (2008). UPR pathways combine to prevent hepatic steatosis caused by ER stress-mediated suppression of transcriptional master regulators. *Dev. Cell* 15, 829–840. doi: 10.1016/j.devcel.2008.10.015
- Seiliez, I., Belghit, I., Gao, Y., Skiba-Cassy, S., Dias, K., Cluzeaud, M., et al. (2016). Looking at the metabolic consequences of the colchicine-based in vivo autophagic flux assay. *Autophagy* 12, 343–356. doi: 10.1080/15548627.2015.1117732
- Seiliez, I., Gabillard, J.-C., Riffard, M., Sadoul, B., Dias, K., Avérous, J., et al. (2012). Amino acids downregulate the expression of several autophagy-related genes in rainbow trout myoblasts. *Autophagy* 8, 364–375. doi: 10.4161/autophagy.18863
- Séité, S., Mourier, A., Camougrand, N., Salin, B., Figueiredo-Silva, A. C., Fontagné-Dicharry, S., et al. (2018). Dietary methionine deficiency affects oxidative status, mitochondrial integrity and mitophagy in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Sci. Rep.* 8:10151. doi: 10.1038/s41598-018-28559-8
- Shen, X., Zhang, K., and Kaufman, R. J. (2004). The unfolded protein response—a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J. Chem. Neuroanat.* 28, 79–92. doi: 10.1016/j.jchemneu.2004.02.006
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., et al. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458, 1131–1135. doi: 10.1038/nature07976
- Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K., and Brewer, J. W. (2004). XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 167, 35–41. doi: 10.1083/jcb.200406136
- Tang, B. L. (2016). Autophagy in response to environmental stresses: new monitoring perspectives. *Ecol. Indic.* 60, 453–459. doi: 10.1016/j.ecolind.2015.07.022
- Thomas, M., Davis, T., Loos, B., Sishi, B., Huisamen, B., Strijdom, H., et al. (2018). Autophagy is essential for the maintenance of amino acids and ATP levels during acute amino acid starvation in MDAMB231 cells. *Cell Biochem. Funct.* 36, 65–79. doi: 10.1002/cbf.3318
- Wagner, M., and Moore, D. D. (2011). Endoplasmic reticulum stress and glucose homeostasis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 14, 367–373. doi: 10.1097/MCO.0b013e32834778d4
- Wang, H. J., Park, J. Y., Kwon, O., Choe, E. Y., Kim, C. H., Hur, K. Y., et al. (2015). Chronic HMGCR/HMG-CoA reductase inhibitor treatment contributes to dysglycemia by upregulating hepatic gluconeogenesis through autophagy induction. *Autophagy* 11, 2089–2101. doi: 10.1080/15548627.2015.1091139
- Wang, J., Han, S.-L., Li, L.-Y., Lu, D.-L., Limbu, S. M., Li, D.-L., et al. (2018). Lipophagy is essential for lipid metabolism in fish. *Sci. Bull.* 63, 879–882. doi: 10.1016/j.scib.2018.05.026
- Wang, S., and Kaufman, R. J. (2014). How does protein misfolding in the endoplasmic reticulum affect lipid metabolism in the liver? *Curr. Opin. Lipidol.* 25, 125–132. doi: 10.1097/MOL.0000000000000056
- Wei, C.-C., Luo, Z., Hogstrand, C., Xu, Y.-H., Wu, L.-X., Chen, Y.-X., et al. (2018). Zinc reduces hepatic lipid deposition and activates lipophagy via

- Zn2+/MTF-1/PPAR α and Ca2+/CaMKK β /AMPK pathways. *FASEB J.* doi: 10.1096/fj.201800463 [Epub ahead of print].
- Wei, C.-C., Luo, Z., Song, Y.-F., Pan, Y.-X., Wu, K., and You, W.-J. (2017). Identification of autophagy related genes LC3 and ATG4 from yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* and their transcriptional responses to waterborne and dietborne zinc exposure. *Chemosphere* 175, 228–238. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.02.042
- Welte, M. A. (2015). Expanding roles for lipid droplets. *Curr. Biol.* 25, R470–R481. doi: 10.1016/j.cub.2015.04.004
- Xing, H., Wang, Z., Gao, X., Chen, D., Wang, L., Li, S., et al. (2015). Atrazine and chlorpyrifos exposure induces liver autophagic response in common carp. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 52–58. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.11.027
- Yabu, T., Imamura, S., Mizusawa, N., Touhata, K., and Yamashita, M. (2012). Induction of autophagy by amino acid starvation in fish cells. *Mar. Biotechnol.* 14, 491–501. doi: 10.1007/s10126-012-9432-9
- Yang, L., Li, P., Fu, S., Calay, E. S., and Hotamisligil, G. S. (2010). Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab.* 11, 467–478. doi: 10.1016/j.cmet.2010.04.005
- Yang, Z., and Klionsky, D. J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 124–131. doi: 10.1016/j.ceb.2009.11.014
- Yu, X., and Long, Y. C. (2014). Autophagy modulates amino acid signaling network in myotubes: differential effects on mTORC1 pathway and the integrated stress response. *FASEB J.* 29, 394–407. doi: 10.1096/fj.14-252841
- Yuan, N., Song, L., Zhang, S., Lin, W., Cao, Y., Xu, F., et al. (2015). Bafilomycin A1 targets both autophagy and apoptosis pathways in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 100, 345–356. doi: 10.3324/haematol.2014.113324
- Zhang, X., Yuan, Y., Jiang, L., Zhang, J., Gao, J., Shen, Z., et al. (2014). Endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin and thapsigargin protects against transient ischemic brain injury. *Autophagy* 10, 1801–1813. doi: 10.4161/auto.32136
- Zhou, H., and Liu, R. (2014). ER stress and hepatic lipid metabolism. *Front. Genet.* 5:112. doi: 10.3389/fgene.2014.00112

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Séité, Pioche, Ory, Plagnes-Juan, Panserat and Seiliez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

PARTIE 1 : EFFETS A COURT ET LONG TERMES D'UNE DEFICIENCE EN METHIONINE SUR LES MITOCHONDRIES DANS LE FOIE DE TRUITE ARC-EN-CIEL

1.1. Effet à court terme d'une déficience en méthionine sur les mitochondries	148
1.1.1 Causes potentielles de l'altération de l'intégrité mitochondriale en situation de déficience en méthionine	148
1.1.2 Perturbations mitochondriales et conséquences sur différents systèmes cellulaires primordiaux	154
1.2. Effet d'une déficience en méthionine au premier repas sur les mitochondries des juvéniles	160
1.2.1 Carence en méthionine et méthylation de l'ADN	160
1.2.2 Carence en méthionine et méthylation des histones	162
1.2.3 D'autres acides aminés peuvent-ils jouer un rôle dans la programmation nutritionnelle ?	163

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

PARTIE 1: EFFET S A COURT ET LONG TERMES D'UNE DEFICIENCE EN METHIONINE SUR LES MITOCHONDRIES DANS LE FOIE DE TRUITE ARC-EN-CIEL

Ce travail de thèse avait pour premier objectif de déterminer, *in vivo*, les conséquences à court terme d'une carence en méthionine alimentaire sur l'intégrité mitochondriale dans le foie de truite arc-en-ciel. Les résultats obtenus ont montré que l'alimentation de truites avec un aliment déficient en méthionine, pendant 2 ou 6 semaines (1^{er} et 2^{ème} article respectivement), entraînait une baisse du niveau ou de l'activité de plusieurs facteurs impliqués dans le transport mitochondrial, le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire. Ces résultats suggèrent un défaut général du fonctionnement des mitochondries hépatiques qui semble être confirmé par une induction de la mitophagie. De plus nous avons observés que ces anomalies mitochondriales étaient associées à un stress du RE et une baisse du statut oxydant tous deux étant étroitement liés à l'intégrité mitochondriale et à l'induction de la mitophagie.

Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle de la méthionine dans la programmation nutritionnelle. Nous avons mis en évidence que deux semaines de carence en méthionine, lors des premiers repas des alevins, entraînait une programmation à long terme de la mitophagie dans le foie de truite arc-en-ciel. De plus nous avons démontré que cet effet n'était pas associé à un dysfonctionnement mitochondrial ou à une induction du stress du RE. En revanche nous avons démontré que cette mitophagie «programmée» était accompagnée de changements du niveau de méthylation de plusieurs histones. Ainsi, ces résultats suggèrent que la méthionine peut être un levier important pour la programmation nutritionnelle.

Dans cette partie nous discuterons des principaux résultats obtenus et tenterons de comprendre les mécanismes impliqués dans les effets observés.

1.1. Effet à court terme d'une déficience en méthionine sur les mitochondries

Chez les mammifères, de nombreuses études ont mis en évidence qu'une restriction en méthionine alimentaire diminuait la quantité et l'activité de nombreuses protéines mitochondriales (Kozieł et al., 2014; Naudí et al., 2007; Sanz et al., 2006; Ying et al., 2015). Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont montré, pour la première fois, des résultats similaires dans le foie de truite arc-en-ciel. Ces données soulèvent à présent un certain nombre de questions, concernant notamment les causes et les conséquences de l'altération de l'intégrité mitochondriale en situation de déficience en méthionine, que nous aborderons dans les sections suivantes.

1.1.1 Causes potentielles de l'altération de l'intégrité mitochondriale en situation de déficience en méthionine

Au cours de cette thèse (articles 1 et 2), nous avons démontré qu'une déficience en méthionine alimentaire entraînait une baisse de la quantité de méthionine dans le foie des poissons, mais également de ses métabolites tels que la SAM ou le glutathion. Ces effets peuvent conduire à des dérèglements cellulaires préjudiciables aux mitochondries comme une baisse de la traduction des protéines mitochondriales, une induction du stress du RE ou du stress oxydant ou encore un dérèglement de la qualité des membranes mitochondriales. Au cours de cette section nous discuterons des différents mécanismes pouvant être responsables des défauts mitochondriaux observés lors d'une carence en méthionine alimentaire.

A) Déficience en méthionine et conséquences sur la traduction protéique

Aujourd'hui il est clairement établi que la méthionine joue un rôle essentiel dans la traduction des protéines. En effet, la traduction d'un ARNm en protéine commence toujours par le recrutement de l'ARNt initiateur-*méthionine*. Il a ainsi été démontré qu'une baisse de la méthionine alimentaire induisait une baisse de la synthèse et de l'accrétion protéique (Barnes et al., 1995; Métayer et al., 2008). Ainsi il ne serait pas surprenant qu'une déficience en méthionine puisse diminuer la synthèse des protéines et notamment les protéines mitochondriales, expliquant en partie les résultats obtenus sur les différents marqueurs mitochondriaux mesurés.

La taurine, qui est un des métabolites de la méthionine, peut également jouer un rôle direct dans la traduction des protéines mitochondriales. En effet, cet acide aminé semi essentiel joue un rôle clé dans la traduction mitochondriale en modifiant notamment les ARNt mitochondriaux (de la leucine et la lysine), permettant ainsi la stabilisation de l'interaction codon-anticodon (Suzuki et

al., 2002). Ainsi, plusieurs études ont démontré qu'une déficience en taurine diminuait la synthèse d'un certain nombre de protéines mitochondriales et altérait l'activité de la chaîne respiratoire (Jong et al., 2012; Lambert et al., 2015; Suzuki et al., 2002; Warskulat et al., 2006). Ces données concordent avec les données obtenues dans notre première étude (article 1) mettant en évidence une diminution de l'activité des complexes I et IV de la chaîne respiratoire dans le foie des truites carencées en méthionine.

Ainsi, ces données mettent en évidence qu'une déficience en méthionine alimentaire a pu entraîner une baisse de la traduction des ARNm issus des gènes nucléaires mais également des gènes mitochondriaux, induisant alors des défauts de l'intégrité mitochondriale (Figure 28).

B°) Le rôle du stress du RE

Au cours de nos différentes expérimentations, nous avons observé qu'une déficience en méthionine conduisait à une diminution de la quantité de glutathion total dans le foie (cf. article 1 et figure 27). Outre son rôle en tant qu'antioxydant, le glutathion catalyse également la formation de ponts disulfures, qui sont indispensables au repliement des protéines dans le RE (Harding et al., 1999; Wanders et al., 2016). Ainsi, une carence en glutathion pourrait entraîner une accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE et ainsi induire un stress du RE. Cette hypothèse concorde avec les données que nous avons obtenues dans la seconde étude (article 2) montrant une induction de l'expression des gènes *chop*, *as* et *xbp1* chez les truites nourries pendant deux semaines avec l'aliment carencé en méthionine. Comme nous l'avons évoqué dans l'étude bibliographique (cf. partie 2.3), le RE et son stress sont étroitement liés aux mitochondries. En effet il a été démontré qu'un stress du RE dans des cellules souches neurales de souris, conduisait à l'activation du gène *chop* qui à son tour réprimait l'expression de *pgc1a*, et induisait un dysfonctionnement mitochondrial (Chen et al., 2017). Ainsi, il est possible que la baisse du taux de glutathion total observée dans le foie des truites carencées en méthionine ait pu induire un stress du RE qui s'est alors répercuté sur l'intégrité mitochondriale et la mitophagie (Figure 28).

Une baisse de la quantité de taurine dans le foie pourrait également induire un stress du RE. En effet, une étude récente a démontré qu'une altération des modifications des ARNt

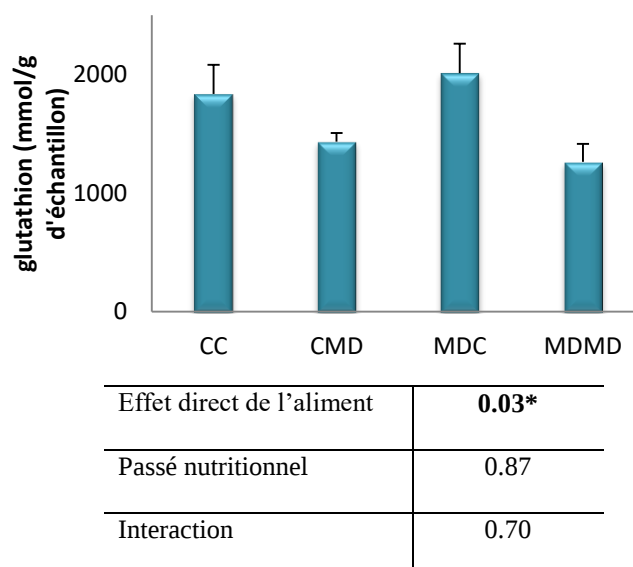


Figure 27 : Quantité de glutathion dans le foie des truites arc-en-ciel. La quantité de glutathion a été mesurée dans le foie des truites CC (truites ayant reçu le régime contrôle au premier et dernier repas), CMD (truites ayant reçu le régime contrôle au premier repas et le régime déficient en méthionine au dernier repas), MDC (truites ayant reçu le régime déficient au premier repas et l'aliment contrôle au dernier repas) et MDMD (truite ayant reçu le régime déficient en méthionine au premier et dernier repas). Le glutathion a été mesuré par HPLC sur 6 individus par groupe alimentaire. Les valeurs représentent des moyennes (n=6), l'erreur standard de la moyenne est représentée par des barres verticales et les valeurs ont été analysées à l'aide d'une Anova à deux voies

mitochondriaux induites par une déficience en taurine impactait, non seulement, la traduction mitochondriale et l'activité de la chaîne respiratoire, mais également l'import de protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire, induisant ainsi une accumulation des protéines mitochondriales dans le cytoplasme et une augmentation de l'UPR (Fakruddin et al., 2018). Ces résultats concordent étroitement avec les résultats obtenus dans l'article 2 de la présente thèse qui mettent en évidence que l'altération de l'intégrité mitochondriale induite par la déficience en méthionine s'accompagne d'une induction de l'expression de plusieurs gènes cibles de l'UPR (*as*, *chop* et *xbp1*).

Ainsi, une déficience en méthionine peut conduire à une diminution de la quantité des métabolites de la méthionine, tout particulièrement le glutathion et la taurine, entraînant une induction du stress du réticulum qui à son tour peut affecter l'intégrité mitochondriale (Figure 28).

C°) Déficience en méthionine et stress oxydant

La méthionine et ses métabolites, le glutathion et la taurine, jouent un rôle important en tant qu'antioxydant (cf. Partie 1 de l'étude bibliographique, section 1.2). Ainsi une baisse de la quantité de ses molécules antioxydantes peut avoir de graves répercussions sur le statut oxydant. En ce sens, plusieurs études chez les poissons ont observé qu'une déficience en méthionine pouvait augmenter l'activité ou l'expression de plusieurs enzymes antioxydantes et induire des dommages oxydatifs (Cowey et al., 1992; Elmada et al., 2016; Espe et al., 2014; Feng et al., 2011; Fontagné-Dicharry et al., 2017; Wu et al., 2017). Le stress oxydant peut avoir de graves conséquences sur les différents constituants cellulaires et tout particulièrement sur les mitochondries qui se trouvent en première ligne d'exposition aux ROS. De nombreuses études ont ainsi démontré qu'un stress oxydant pouvait causer des lésions irréversibles au niveau de l'ADNmt ainsi qu'au niveau des lipides et protéines mitochondriales, entraînant ainsi un dysfonctionnement de ces organites et leur dégradation (Di Rita et al., 2018; Lemasters, 2005; Xiao et al., 2017). Ainsi, l'ensemble de ces données suggère qu'une déficience en méthionine alimentaire peut altérer profondément l'intégrité des mitochondries via une induction du stress oxydant. Toutefois, les résultats obtenus dans notre première étude (article 1), ont clairement mis en évidence que la carence en méthionine alimentaire, au contraire, diminuait la quantité de protéines carbonylées ainsi que celle du glutathion oxydé, et inversement augmentait le rapport GSH/GSSG dans le foie des truites, suggérant une diminution (et non une augmentation) du stress oxydant.

Ces résultats

suggèrent ainsi que l'altération de l'intégrité des mitochondries observée chez les truites nourries avec l'aliment déficient en méthionine est une cause de la baisse du stress oxydant (liée à une baisse de l'activité mitochondriale) et non une conséquence d'un stress élevé. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que la carence en méthionine ait induit un stress oxydant très rapidement, ce qui pourrait provoquer les dommages observés au niveau des mitochondries, leur dégradation et *in fine* une baisse du statut oxydant au moment du prélèvement (Figure 28). Une cinétique de l'effet de la déficience en méthionine pourrait répondre à cette question.

D) Déficience en méthionine et intégrité des membranes mitochondriales

Au cours de la seconde expérimentation (article 2), nous avons observé une diminution drastique de la quantité de SAM dans le foie de truites alimentées avec le régime déficient en méthionine lors du challenge final. Outre son rôle dans la méthylation des histones et de l'ADN, la SAM peut également fournir des groupements méthyles pour la synthèse de la phosphatidylcholine (PC) à partir de phosphatidylethanolamine (PE) (Andersen et al., 2016). Plusieurs études chez les poissons ainsi que chez les mammifères ont ainsi observé une baisse de la quantité de PC ou du ratio PC/PE en situation de carence en méthionine alimentaire (Caballero et al., 2010; Espe et al., 2014). Or, la PC est le phospholipide le plus abondant dans les membranes mitochondriales (Schuler et al., 2016; Sperka-Gottlieb et al., 1988; Zinser et al., 1991) et joue un rôle clé dans le transport des protéines à travers ces membranes (Schuler et al., 2016). En effet, récemment, une étude a mis en évidence qu'un appauvrissement en PC affectait spécifiquement la stabilité et donc l'activité du complexe TIM23 qui est impliqué dans le transport des protéines dans la membrane interne et la matrice mitochondriale. Etant donné que 99% des protéines mitochondriales sont synthétisées dans le cytosol et sont importées par la suite dans les mitochondries, un dérèglement du transport mitochondrial peut avoir de graves répercussions sur l'intégrité des mitochondries. De plus, il a été démontré qu'une baisse du rapport PC/PE réduisait la fluidité des membranes mitochondriales entraînant une baisse du transport d'autres molécules telles que le glutathion (Caballero et al., 2010; Li et al., 2006).

Ainsi, la PC est non seulement un élément constitutif important des mitochondries, mais joue également un rôle essentiel dans le transport mitochondrial. Ces données suggèrent ainsi qu'une baisse de l'apport en méthionine alimentaire peut avoir des répercussions sur l'intégrité de la membrane mitochondriale et donc sur son fonctionnement (Figure 28).

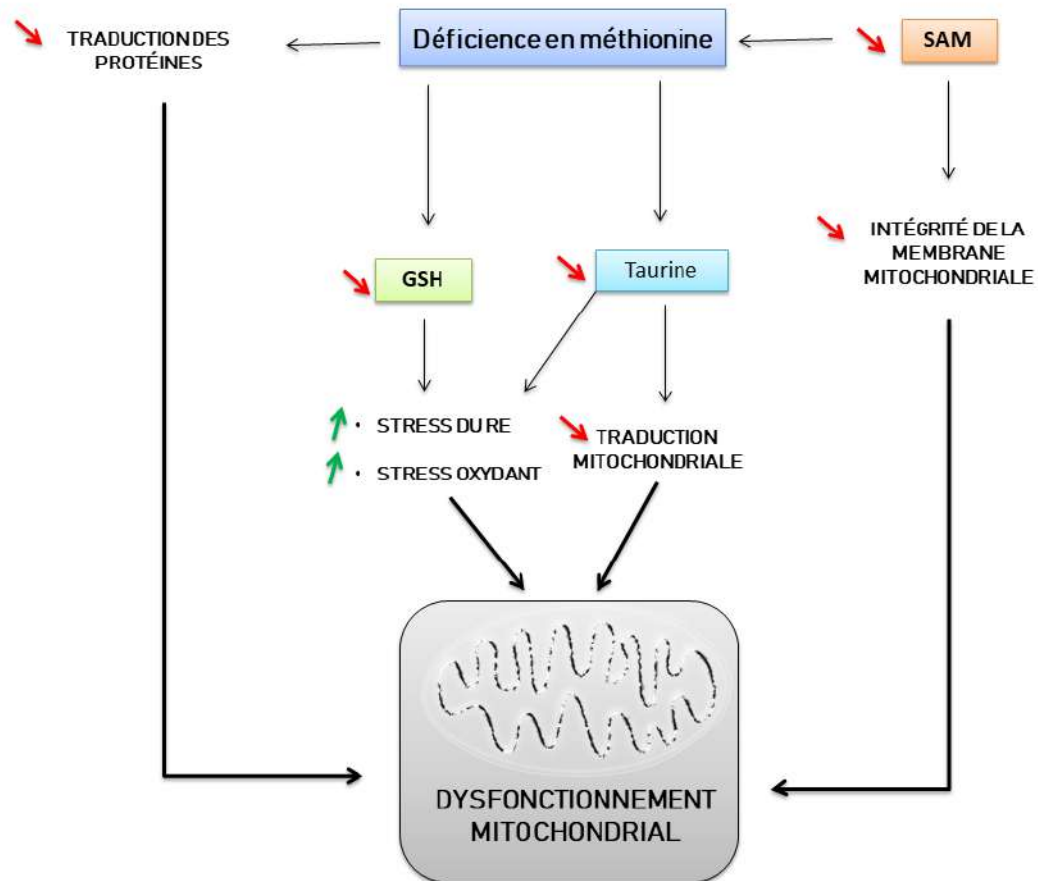


Figure 28 : Les différents modèles proposés pour expliquer comment une déficiencia en méthionine peut impacter l'intégrité mitochondriale

En conclusion, il existe plusieurs hypothèses pouvant expliquer l'effet de la déficience en méthionine sur l'intégrité mitochondriale, et il est probable que différentes causes soient à l'origine des effets observés. Des études *in vitro* sur des lignées cellulaires d'hépatocytes de truite aujourd'hui disponibles (RTL-W1 et RTH-149) pourraient nous aider à démêler les mécanismes sous-jacents et déterminer les interactions existantes entre ces différentes voies.

1.1.2 Perturbations mitochondriales et conséquences sur différents systèmes cellulaires primordiaux

Comme nous l'avons présenté dans la partie 2.3 de l'étude bibliographique, les mitochondries agissent en étroite collaboration avec différents systèmes cellulaires primordiaux. Dans cette section, nous nous intéresserons particulièrement aux conséquences d'un dysfonctionnement des mitochondries sur le statut oxydant, le réticulum endoplasmique et le métabolisme intermédiaire.

A) Dysfonctionnement mitochondrial et statut oxydant

Les ROS sont des produits majeurs du métabolisme oxydatif mitochondrial. Il est par conséquent possible que l'altération de l'intégrité et/ou de la fonction des mitochondries dans le foie des truites carencées en méthionine, ait pu entraîner des modulations de la production de ROS et des dommages oxydatifs associés. En ce sens, les résultats obtenus dans le premier article ont clairement mis en évidence une baisse des dommages oxydatifs dans le foie des poissons carencés en méthionine par rapport aux poissons non carencés. La baisse de l'activité du complexe I, en situation de carence en méthionine (article 1) pourrait expliquer cette baisse observée.

Cependant d'autres hypothèses peuvent être proposées. En effet, de récentes études ont démontré qu'une déficience en méthionine s'accompagnait d'une induction des protéines de découplages UCP que nous avons présenté dans la section 2.3.2 B de l'étude bibliographique (Brown-Borg and Buffenstein, 2017; Craig et al., 2013; Hasek et al., 2010; Yin et al., 2018). Ces protéines sont connues pour diminuer la production de ROS en découplant la respiration mitochondriale de la synthèse d'ATP. Cela a pour conséquence d'accélérer le flux d'électrons, limitant leur fuite et ainsi empêcher la synthèse des ROS (Figure 30).

La mitophagie peut également jouer un rôle important dans la diminution de la production de ROS. En effet, il a été démontré que des levures confrontées à une carence en azote, présentaient une augmentation de la mitophagie, entraînant par voie de conséquence, une diminution de la production de ROS (Kurihara et al., 2012). Ainsi, l'induction de la mitophagie, observée dans le

foie des poissons carencés en méthionine pourrait contribuer à la réduction de la production de ROS comme illustré dans la figure 30.

Toutefois, il est important de noter que plusieurs études réalisées chez les poissons (et notamment la truite arc-en-ciel) ont démontré, non pas une réduction, mais une induction du stress oxydatif en situation de carence en méthionine (Cowey et al., 1992; Elmada et al., 2016; Espe et al., 2014; Feng et al., 2011; Fontagné-Dicharry et al., 2017; Wu et al., 2017). Ces différences de résultats entre ces études et les nôtres pourraient être dues à de nombreux facteurs, comme la composition des aliments expérimentaux (notamment le niveau de la déficience en méthionine mais également la teneur des autres nutriments), le stade de développement des poissons étudiés, la durée des expériences ou encore des différences dans d'autres paramètres d'élevage (densité de poissons par bassin, paramètres chimiques de l'eau etc..) qui pourraient affecter les résultats obtenus. Malheureusement, ces études antérieures ne portaient pas sur les mitochondries, empêchant de déterminer si l'induction du stress oxydatif observée en situation de carence en méthionine était accompagnée de perturbations de l'activité mitochondriale.

B) Dysfonctionnement mitochondrial et métabolisme intermédiaire

Compte tenu des interactions étroites qui existent entre l'activité mitochondriale et le métabolisme intermédiaire (Cf. section 2.3.1 de l'étude bibliographique), il ne serait pas surprenant que des défauts de l'intégrité et/ou de la fonction des mitochondries dans le foie des truites carencées en méthionine puissent également se répercuter, directement ou indirectement, sur le métabolisme intermédiaire et donc les réserves énergétiques. En ce sens, les résultats obtenus lors de la première étude (article 1) ont révélé des teneurs en glycogène hépatique significativement supérieures chez les truites nourries avec le régime déficient en méthionine par rapport aux poissons non carencés (Figure 29 B). Cette accumulation du glycogène dans le foie des truites carencées ne semble pas être due à une augmentation de l'expression des gènes de la néoglucogénèse. En effet, nous avons également observé une diminution de l'expression de plusieurs gènes liés à la néoglucogénèse (*g6pca*, *pck1* et *fbpa*) dans le foie des poissons carencés (Figure 29 C). Par contre, des études antérieures suggèrent qu'elle pourrait directement résulter d'un défaut de l'activité des mitochondries hépatiques. En effet, ces études ont démontré qu'une restriction en méthionine augmentait le niveau d'expression de la protéine de découplages UCP2 et diminuait ainsi la synthèse d'ATP par les mitochondries (Craig et al., 2013; Craig and Moon, 2013). Cette baisse d'ATP pourrait entraîner une baisse de la glycolyse par rétrocontrôle et donc une augmentation du glycogène.

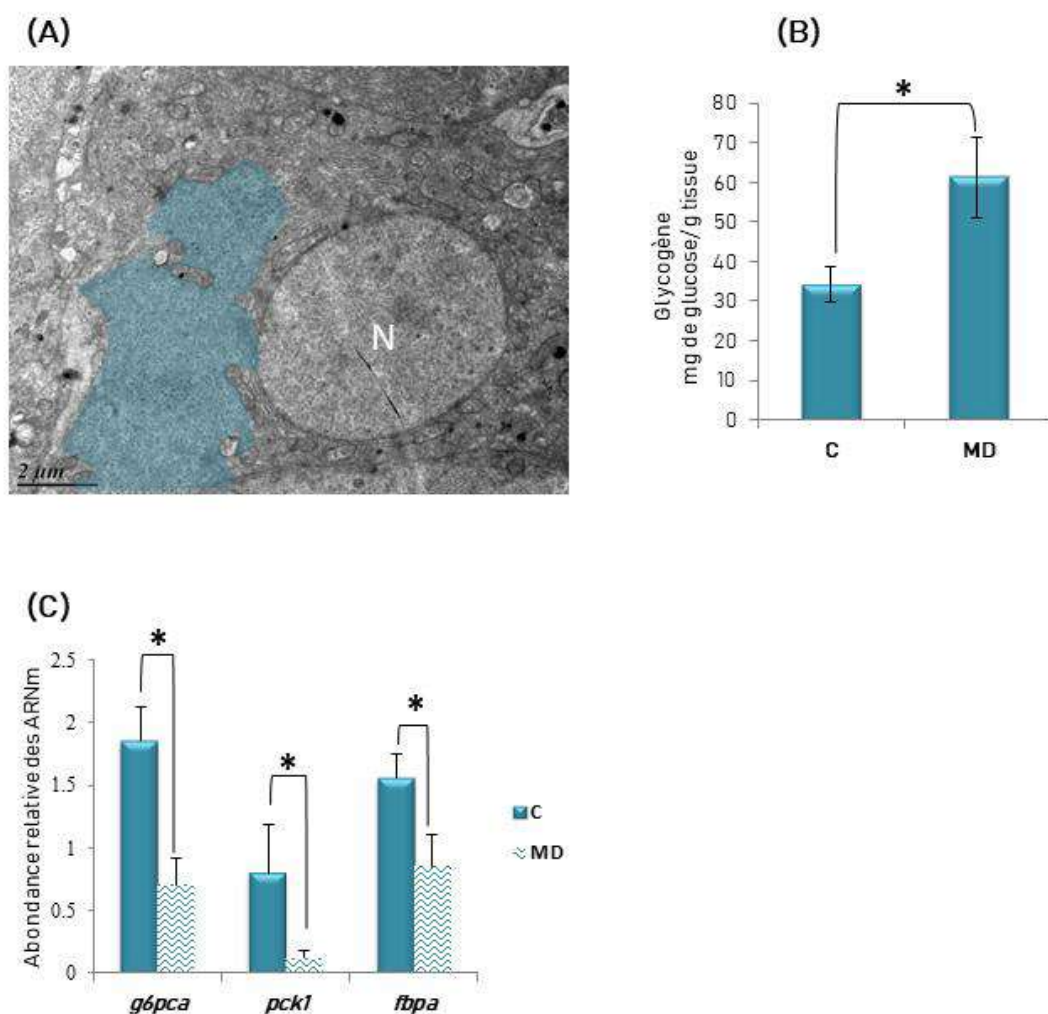


Figure 29: Conséquence d'une déficience en méthionine sur le métabolisme du glucose. (A) Image de microscopie électronique d'une section de foie de truite nourrie avec un régime déficient en méthionine (MD). La zone bleue représente le glycogène tandis que le (N) représente le noyau. (B) Dosage du glycogène 16h après le dernier repas (en mg de glucose/ g de tissu) dans le foie de truite arc en ciel nourries avec le régime contrôle (C) ou MD (n=6/régime). (C) Niveau d'ARNm de la glucose-6-phosphatase a (*g6pca*), phosphoénolpyruvate carboxylase cytosolique (*pck1*), fructose-1-6 biphosphate (*fbpa*) mesurées par RT-qPCR dans le foie de truites arc-en-ciel nourris avec le régime C ou MD et échantillonnées 16h après leur dernier repas. Les valeurs représentent des moyennes (n=6), l'erreur standard de la moyenne est représentée par des barres verticales. * indique une différence significative entre les régimes ($P < 0.05$; t-test)

Ainsi une baisse de la production d'ATP pourrait avoir des répercussions sur le métabolisme glucidique dans le foie des truites arc en ciel.

C) Dysfonctionnement mitochondrial et stress du réticulum endoplasmique

Dans la littérature, il est largement admis qu'un stress du RE induit un dysfonctionnement général des mitochondries, qui peut aboutir à leur dégradation. Cependant, étant donné l'étroite collaboration de ces deux organites (décrite dans la section 2.3.3 de l'étude bibliographique), il n'est pas surprenant qu'un stress des mitochondries puisse également se répercuter sur le RE. Par exemple, le repliement des protéines dans le réticulum endoplasmique nécessite de grandes quantités d'ATP. Des études antérieures ont ainsi établi un lien direct entre le niveau cellulaire d'ATP (donc l'activité mitochondriale) et le stress du RE (Kaufman, 2002; Koh et al., 2007). En ce sens, il a également été démontré qu'une perturbation de l'activité de la chaîne respiratoire déclenchait un stress du RE (Xu et al., 2004). Les résultats obtenus dans la présente thèse (articles 1 et 2) mettent en évidence qu'une carence en méthionine affecte à la fois l'intégrité et/ou la fonction des mitochondries et l'homéostasie du RE (révélé par l'induction de l'expression de gènes cibles de l'UPR). Il est donc possible que, dans notre cas également, la baisse de production d'ATP (révélée par l'induction de la phosphorylation de l'AMPK dans l'article 1) due à des mitochondries défaillantes joue un rôle important dans le stress du RE observé chez les poissons carencés.

La baisse de la quantité de la protéine MFN2 chez les poissons nourris avec le régime carencé en méthionine pourrait également jouer un rôle important dans l'activation du stress du RE. En effet, outre son rôle dans la fusion mitochondriale (Cf. section 2.2.2 de l'étude bibliographique), d'autres fonctions cellulaires ont été attribuées à la protéine MFN2, et notamment un rôle dans la liaison entre le RE et les mitochondries qui est essentiel pour une absorption efficace du Ca^{2+} par les mitochondries. Il a été ainsi démontré qu'une délétion de *mfn2* dans le foie de souris entraîne de nombreuses perturbations métaboliques, et notamment un stress du RE (Sebastián et al., 2012). Ainsi dans notre étude, nous pouvons supposer que la diminution de MFN2 peut avoir eu des répercussions sur l'homéostasie calcique et provoquer un stress du RE (Figure 30).

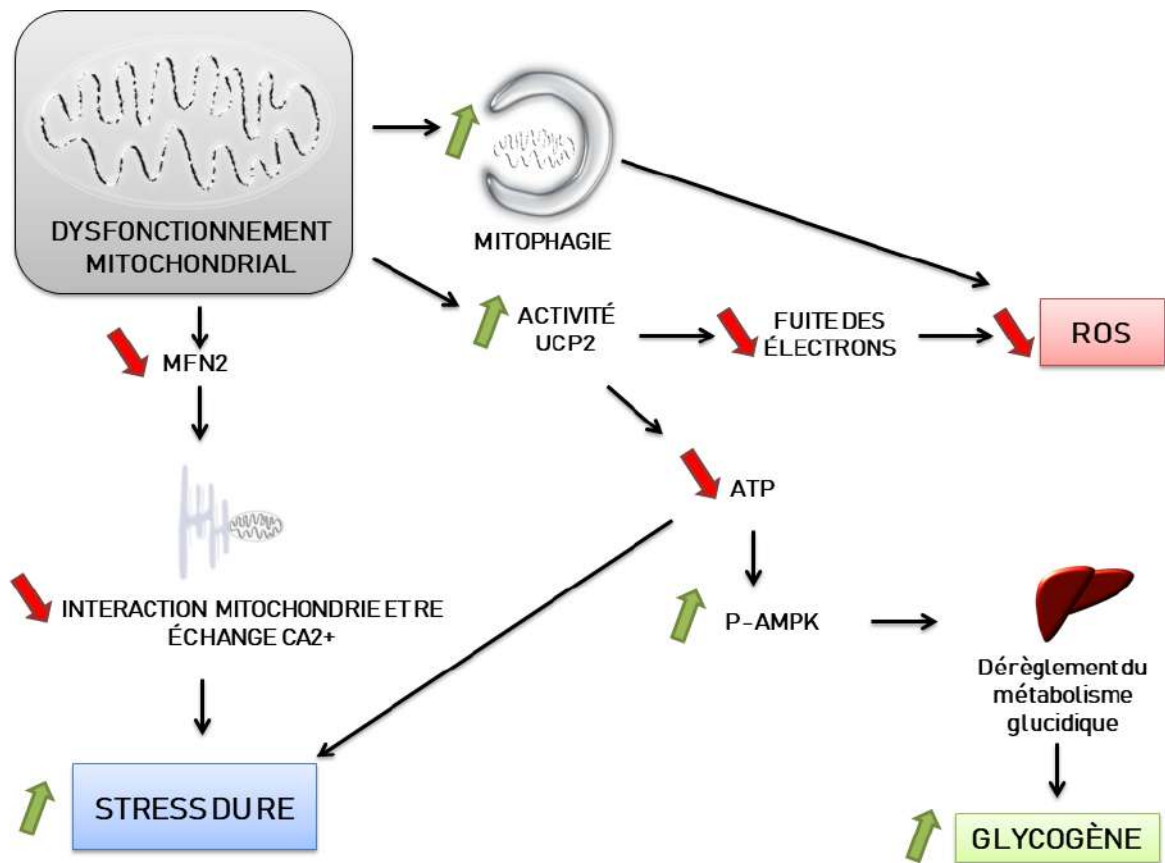


Figure 30 : Représentation schématique de l'impact d'un dysfonctionnement mitochondriale sur le statut oxydant, le métabolisme du glucose et le stress du RE. MFN2, mitofusin 2; P-AMPK, phosphorylation de AMP-activated protein kinase; ROS, reactive oxygen species; UCP2, uncoupling protein.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans cette section, nous avons discuté de la pluralité des effets engendrés par une déficience en méthionine. Nous avons également mis en évidence la complexité des mécanismes qui relient les mitochondries au statut oxydant, au métabolisme intermédiaire et au stress du réticulum endoplasmique et la difficulté de déterminer les relations épistatiques entre ceux-ci. Les figures 28 et 30 proposent des représentations schématiques des interactions en jeu dans les effets observés en situation de carence en méthionine.

Perspectives :

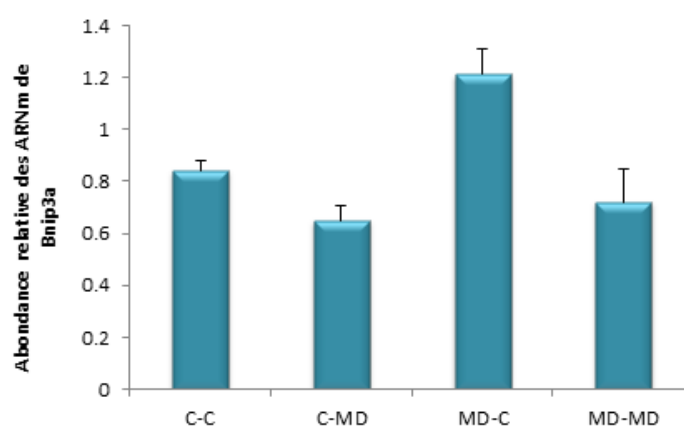
- Pour la suite de ces recherches, il serait intéressant d'essayer de savoir qui est impacté en premier lors d'une carence en méthionine. Pour cela il serait judicieux de faire une cinétique mais également de tester in vitro l'effet d'une carence en méthionine sur les hépatocytes afin de simplifier le système d'étude.
- Cette étude a permis également de mettre en lumière de nouveaux marqueurs qui pourraient être utilisés par la suite afin de déterminer les besoins nutritifs des poissons et tout particulièrement ceux liés à l'intégrité mitochondriale. Les mitochondries sont des producteurs d'énergie indispensable à la croissance des poissons et sont donc essentielles pour la production aquacole.

1.2 Effet d'une déficience en méthionine au premier repas sur les mitochondries des juvéniles

Au cours de notre seconde expérimentation (article 2) nous avons démontré qu'une carence en méthionine durant deux semaines lors des premiers repas des alevins a entraîné une programmation à long terme de la mitophagie chez la truite arc-en-ciel, sans pour autant impacter la fonction mitochondriale, le RE ou l'apoptose. Dans cette section nous chercherons à identifier les mécanismes pouvant expliquer comment une déficience en méthionine peut entraîner une programmation à long terme de la mitophagie.

1.2.1 Carence en méthionine et méthylation de l'ADN

La méthionine est un facteur clé dans la modulation de la biodisponibilité cellulaire en SAM. La SAM est un donneur universel de groupements méthyl qui sont indispensable pour toutes les réactions de méthylation dans la cellule, et notamment, la méthylation des histones et de l'ADN. Au cours de la seconde étude, nous n'avons observé aucune modulation de la quantité de SAM, du rapport SAM/SAH ou encore de la méthylation globale de l'ADN dans le foie des poissons provenant d'alevins nourris avec une déficience en méthionine, comparativement à leurs homologues témoins. Ces premiers résultats suggèrent que la déficience en méthionine était insuffisante pour induire des différences de teneur en SAM et de méthylation de l'ADN, ou que d'autres sources de groupement méthyle peuvent compenser la déficience en méthionine telles que la choline, la betaine ou les folates (Niculescu and Zeisel, 2002). Toutefois l'équipe de recherche de l'INRA de St Pée-sur-Nivelle a récemment démontré que la méthylation de plusieurs sites CpG ainsi que le taux d'ARNm de deux gènes impliqués dans la mitophagie (*bnip3a* et *bnip3lb1*) sont sensibles à la teneur en méthionine de l'aliment des géniteurs ainsi que des alevins de truite avec des effets observables à des niveaux de déficience équivalents à ceux de notre étude (Véron et al. 2018). Ces résultats suggèrent que bien que nous n'ayons pas observé d'effet de la déficience en méthionine sur la méthylation globale de l'ADN, cela n'exclut pas qu'il y ait eu des effets plus spécifiques au niveau de certains gènes. En ce sens, il est intéressant de noter que, dans notre étude, le niveau d'ARNm de *bnip3a* était augmenté chez les poissons issus des alevins carencés en méthionine par rapport aux poissons témoins (Figure 31). Ainsi la déficience en méthionine a pu entraîner des modulations au niveau de la méthylation de certains promoteurs qui ont conduit à une programmation à long terme de la mitophagie.



Effet direct de l'aliment	<0.001***
Passé nutritionnel	0.019**
Interaction	0.101

Figure 31: Effet direct ou programmé d'une déficience en méthionine sur l'abondance relative de Bnip3a dans le foie de truite arc-en-ciel. C-C, représente les truites ayant reçu le régime contrôle au premier et dernier repas ; CMD, les truites ayant reçu le régime contrôle au premier repas et le régime déficient en méthionine au dernier repas ; MDC, les truites ayant reçu le régime déficient au premier repas et l'aliment contrôle au dernier repas et MDMD, les truites ayant reçu le régime déficient en méthionine au premier et dernier repas. Le niveau d'ARNm de Bnip3a a été mesuré par RT-qPCR dans le foie des truites échantillonnées 16h après le dernier repas. L'expression de *Bnip3a* a été normalisée avec le niveau d'ARNm de *eef1a1* (the eukaryotic translation elongation factor 1 α 1). Les valeurs représentent des moyennes (n=6), l'erreur standard de la moyenne est représentée par des barres verticales et les valeurs ont été analysées à l'aide d'une Anova à deux voies.

1.2.2 Carence en méthionine et méthylation des histones

La méthylation des histones peut également jouer un rôle dans la programmation à long terme de la mitophagie observée chez les poissons ayant reçu le régime déficient en méthionine au premier repas. En effet, nos résultats ont clairement mis en évidence des niveaux significativement plus élevés en H3K4me3 et H3K36me3 dans le foie des poissons issus d'alevins carencés en méthionine par rapport aux poissons témoins. Toutefois, l'absence de différence de teneur en SAM entre ces poissons pose la question de l'origine de tels résultats. La réponse pourrait venir d'une récente étude effectuée sur le nématode *Caenorhabditis elegans*. En effet, cette étude démontre que l'exposition des nématodes à un stress mitochondrial induit un enrichissement en H3K4me3 au niveau des promoteurs de nombreux gènes liés à la réponse au stress mitochondrial (Ma et al., 2019). Cette réponse serait transmissible aux descendants, leur conférant ainsi une capacité plus importante à résister aux stress mitochondriaux. L'ensemble de ces données suggère ainsi qu'une altération de l'intégrité ou de l'activité mitochondriale en situation de carence en méthionine pourrait être à l'origine de l'enrichissement en H3K4me3, qui en retour, pourrait jouer un rôle déterminant dans les phénomènes de programmation nutritionnel observés. Une autre étude a également démontré un enrichissement global en H3K36me3 en situation de stress oxydatif. En effet il semblerait qu'une augmentation des ROS mitochondriaux conduirait à une baisse de la déméthylase H3K36 Rph1p et, de façon concomitante, à un enrichissement en H3K36me3. Ainsi, il est possible que les poissons ayant reçu le régime déficient en méthionine au premier repas aient subi un stress oxydatif qui a conduit à une augmentation du niveau de H3K36me3.

Dans l'ensemble ces données montrent que deux semaines de carence en méthionine au premier repas peuvent entraîner d'importantes perturbations de la méthylation des histones. De plus, ces modifications pourraient jouer un rôle important dans la programmation à long terme de la mitophagie.

1.2.3 D'autres acides aminés peuvent-ils jouer un rôle dans la programmation nutritionnelle ?

Nous pouvons nous demander également si la méthionine est le seul acide aminé pouvant jouer un rôle dans la programmation nutritionnelle. En effet d'autres acides aminés sont impliqués dans la synthèse des groupements méthyles tels que l'arginine, la sérine ou encore la glycine (Buckley et al., 2005). La sérine, par exemple, intervient dans la synthèse de la cystéine (et donc du glutathion), dans le cycle des folates et dans la reméthylation de l'homocystéine afin de soutenir le cycle de la méthionine (Yang and Vousden, 2016). Ainsi une déficience en sérine (due à une baisse de sa synthèse) peut potentiellement conduire à des effets similaires aux effets observés en situation de carence en méthionine. L'arginine est également un acide aminé de plus en plus étudié en programmation nutritionnelle. Par exemple, il a été démontré que la perfusion avec de l'arginine de brebis sous-alimentées permet d'augmenter le poids à la naissance des agneaux et d'améliorer leur croissance (Lassala et al., 2010). Ainsi l'arginine pourrait également être un facteur intéressant à étudier pour la programmation nutritionnelle.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion nous démontrons ici que la méthionine peut être un important levier pour la programmation nutritionnelle. Nous montrons également que la restriction alimentaire en méthionine induit d'importantes perturbations de la méthylation des histones (et potentiellement également de l'ADN au niveau de certains gènes) qui pourraient jouer un rôle déterminant dans les processus de programmation de la mitophagie observés.

Perspectives :

- Il serait intéressant de vérifier si la méthionine impacte le niveau de méthylation des promoteurs impliqués dans le métabolisme mitochondriale et plus particulièrement dans la mitophagie.
- De plus, il serait intéressant de regarder si la déficience en méthionine précoce a également eu des conséquences au niveau du muscle qui est un tissu clé pour la croissance.
- Du point de vue de l'aquaculture, il est primordial de comprendre si la programmation de la mitophagie avec une carence précoce en méthionine peut avoir des répercussions négatives ou positives sur d'autres systèmes cellulaires ou physiologiques. Ces informations sont primordiales afin de définir au mieux les besoins en méthionine des poissons tout au long du cycle de production

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

PARTIE 2 : AUTOPHAGIE, STRESS DU RE ET METABOLISME INTERMEDIAIRE

2.1. Spécificité de l'effet de l'inhibition de l'autophagie sur l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire.....	164
2.2. Comment une inhibition de l'autophagie peut impacter le niveau des ARNm des gènes du métabolisme intermédiaire	165
2.2.1. Le rôle des acides aminés.....	165
2.2.2. Le rôle du stress du réticulum endoplasmique	166
2.2.3. Le rôle des mitochondries.....	167

PARTIE 2: AUTOPHAGIE, STRESS DU RE ET METABOLISME INTERMEDIAIRE

Au cours de notre dernière étude, nous nous sommes détachés de la thématique principale de la thèse afin d'étudier l'effet d'une inhibition de l'autophagie avec de la bafilomycine A1 sur l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire dans des hépatocytes de truite en culture (Cf. section 2.2.3 de l'étude bibliographique). Il s'agissait de déterminer si les effets de l'inhibition de l'autophagie sur l'expression des gènes du métabolisme observés précédemment (chez la truite et d'autres espèces) étaient bien spécifiques de la fonction étudiée ou dus à des effets non-spécifiques des drogues utilisées. L'utilisation de la bafilomycine A1 dans des hépatocytes de truite en culture permettait ainsi de comparer les effets générés avec ceux publiés précédemment avec d'autres inhibiteurs et/ou chez d'autres espèces, permettant *in fine* de déterminer les effets réellement dus à l'inhibition de l'autophagie.

Dans cette section nous comparerons les résultats obtenus dans notre étude avec ceux publiés précédemment chez les poissons et mammifères, et essayerons de comprendre quels sont les mécanismes associés aux effets observés.

2.1 Spécificité de l'effet de l'inhibition de l'autophagie sur l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire

Les résultats obtenus ont démontré que l'inhibition de l'autophagie avec de la bafilomycine A1 sur des hépatocytes de truite diminuait le taux d'ARNm des gènes impliqués dans la néoglucogénèse et augmentait en parallèle celui des gènes impliqués dans la lipogenèse et le stockage des lipides. Bien que la bafilomycine A1 soit considérée comme une drogue capable d'inhiber l'autophagie, elle peut également avoir des répercussions sur d'autres systèmes cellulaires et notamment les mitochondries (Redmann et al., 2017; Yuan et al., 2015) (dont nous parlerons plus en détails par la suite). Toutefois, nos résultats s'apparentent à ceux observés *in vivo* chez les truites arc-en-ciel ayant reçu une injection de colchicine (cette drogue agit sur l'autophagie en induisant le désassemblage des microtubules). En effet, les auteurs de cette étude ont clairement mis en évidence qu'une injection intra-péritonéale de colchicine chez la truite abaisse le niveau des ARNm des gènes liés à la néoglucogénèse et inversement augmente celui des ARNm de Plin2 et Plin3

(impliqué dans le stockage des lipides) dans le foie. Ces données suggèrent donc que les effets observés dans ces deux études sont spécifiques de l'inhibition de l'autophagie et non liés à de potentiels effets non-spécifiques des drogues utilisées. En ce sens, une autre étude réalisée sur une lignée de cellules cancéreuses hépatiques humaines (cellules HepG2), a observé des résultats similaires sur les niveaux d'ARNm des gènes *g6pc* et *pck1* impliqués dans la néoglucogénèse. Dans cette étude, les auteurs ont non seulement utilisés deux drogues différentes pour inhiber l'autophagie (chloroquine et colchicine) mais ils ont également confirmé leurs résultats avec une lignée d'hépatocytes déficiente en *atg7* (un gène clé de l'autophagie), fournissant ainsi une confirmation génétique de leurs résultats. Cependant et contrairement aux données présentées ci-avant, Wang et al., (2018) ont récemment rapporté que des poissons zèbres à jeun, traités avec de la chloroquine, présentaient une inhibition de la plupart des gènes du métabolisme lipidique et au contraire une augmentation du niveau des ARNm des gènes liés à la glycolyse et à la néoglucogénèse. Quelques réserves peuvent toutefois être émises sur la qualité des résultats présentés dans cette dernière étude comme par exemple une absence de vérification des données transcriptomiques générées ou encore de l'efficacité du traitement (Chloroquine) administré aux poissons. Dans l'ensemble, nos résultats confirment l'idée selon laquelle l'autophagie, en plus d'être impliquée dans la dégradation des réserves énergétiques, joue un rôle important dans le contrôle de l'expression de gènes clés du métabolisme intermédiaire. Il s'agirait là d'une fonction encore inconnue pour l'autophagie. Toutefois, il est probable que les effets observés, bien que liés à l'inhibition de l'autophagie, résultent des interactions étroites qui existent entre l'autophagie, le RE, les mitochondries et le métabolisme intermédiaire, dont nous avons déjà parlé dans les sections précédentes et que nous discuterons ci-après.

2.2 Comment une inhibition de l'autophagie peut impacter le niveau des ARNm des gènes du métabolisme intermédiaire ?

2.2.1 Le rôle des acides aminés

Actuellement, il est établi que les acides aminés jouent un rôle important dans le contrôle de l'expression de nombreux gènes hépatiques impliqués dans le métabolisme intermédiaire. Il a d'ailleurs été démontré, dans des hépatocytes de truites arc-en-ciel, que l'addition d'acides aminés libres dans un milieu de culture dépourvu d'acides aminés

augmente le niveau des ARNm des enzymes impliquées dans la néoglucogénèse (Lansard et al., 2011, 2010). Etant donné que l'autophagie est le principal fournisseur d'acides aminés en situation de jeûne (Ezaki et al., 2011; Kuma et al., 2004), notre première hypothèse était que les effets observés dans les hépatocytes de truite traités avec de la bafilomycine A1 sur l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire, étaient dus à un défaut de libération des acides aminés (Figure 32). En ce sens, les résultats obtenus dans notre étude mettent en évidence une baisse de la quantité d'acides aminés libres dans les hépatocytes de truites traités avec de la bafilomycine A1 par rapport aux cellules non traitées. Une étude portant sur des myotubes de souris à jeun a par ailleurs observé que l'autophagie fournissait les acides aminés nécessaires à l'activation de la voie mTORC1 (Yu and Long, 2014), qui est connue pour jouer un rôle déterminant dans la régulation de l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire. Ce mécanisme pourrait donc également jouer un rôle dans les effets observés dans notre étude.

2.2.2 Le rôle du stress du Réticulum endoplasmique

Le défaut de libération des acides aminés par l'autophagie dans les cellules traitées à la bafilomycine A1 ne peut toutefois pas expliquer tous nos résultats. En effet, certains gènes que nous avons étudiés (notamment ceux impliqués dans le métabolisme lipidique) ne sont pas contrôlés par les acides aminés. Par exemple, dans les hépatocytes de truite cultivés dans un milieu dépourvu d'acides aminés, le niveau d'expression du gène *fas*, qui intervient dans la lipogenèse, n'est pas impacté par l'ajout d'acides aminés (Lansard et al., 2011, 2010). En revanche, l'induction du stress du RE dans les hépatocytes traités à la bafilomycine A1 (révélée par l'induction des gènes *chop*, *xbp1* et *edem1*) pourrait jouer un rôle important sur le niveau des ARNm de ces gènes. En effet, il a été démontré que le stress du RE était étroitement lié au métabolisme des lipides (Basseri and Austin, 2012; Han and Kaufman, 2016; Kammoun et al., 2009; Sriburi et al., 2004; Yang et al., 2010). Comme nous l'avons présenté au cours de l'étude bibliographique (cf. partie 2 section 2.3.3, Figure 26), le stress du RE induit l'activation des différentes voies de l'UPR afin de rétablir l'homéostasie cellulaire. De plus en plus de preuves mettent en évidence que les différentes voies de l'UPR peuvent moduler le métabolisme des lipides en contrôlant l'expression de certains gènes de la lipogenèse et du stockage des triglycérides (Basseri and Austin, 2012; Han and Kaufman, 2016). Il a ainsi été démontré que l'induction de la voie PERK entraînait la phosphorylation de eIF2 α qui à son tour activait les protéines SREBP-1c et SREBP-2, qui sont deux facteurs de transcription qui régulent l'expression de gènes codant pour des enzymes impliquées dans

la lipogenèse et notamment *fas* (Gosmain et al., 2005; Laouressergues et al., 2012). Le facteur de transcription XBP1 semble également jouer un rôle important dans la modulation de l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire. En effet, XBP1 semble être capable d'activer directement et indirectement la transcription de plusieurs gènes clés de la lipogenèse dans le foie et notamment *fas*, *plin2*, *Scd1* (stearyl coenzyme A (CoA) desaturase 1), *Dgat2* (diacylglycerol acetyltransferase 2) et *Acc2* (acetyl CoA carboxylase 2) (Lee et al., 2008, 2012). Outre le métabolisme lipidique, les facteurs de transcription induit lors de l'UPR peuvent aussi affecter l'expression des gènes de la néoglucogénèse (Wagner and Moore, 2011). Dans l'ensemble ces données confirment que le stress du RE peut également jouer un rôle dans la modulation de l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire via l'UPR (Figure 32).

2.2.3 Le rôle des mitochondries

Plusieurs études rapportent que la Bafilomycine A1 n'inhibe pas seulement l'autophagie mais a également des conséquences sur les mitochondries. Teplova et al., (2007) ont ainsi démontré que la bafilomycine A1 induit l'absorption d'ions potassium dans les mitochondries grâce à son activité en tant que ionophore de potassium (transporteur d'ions). Cette absorption de potassium par les mitochondries provoque leur gonflement, une perte du potentiel membranaire, le découplage de la phosphorylation oxydative et une baisse de la respiration mitochondriale dans les mitochondries issues de foies de rats. Une autre étude *in vitro*, a démontré également que les cellules PC12 et SH-SY5Y ainsi que les neurones granuleux cérébelleux traitées à la bafilomycine A1 présentaient un découplage mitochondrial, une baisse du pH et de la quantité de Ca^{2+} mitochondriaux et une baisse du potentiel membranaire mitochondriale (Zhdanov et al., 2011). Ainsi, ces études suggèrent que la bafilomycine agit directement sur l'intégrité mitochondriale. Toutefois, il semblerait que la bafilomycine puisse également impacter indirectement les mitochondries en inhibant l'autophagie. En effet, une étude a démontré que l'inhibition de l'autophagie avec deux drogues différentes (chloroquine et bafilomycine A1) qui ciblent les lysosomes grâce à deux mécanismes distincts, impactait de manière similaire l'intégrité mitochondriale dans les neurones corticaux primaires de rat. Les auteurs de cette étude ont effectivement observé que l'utilisation de la bafilomycine ou de la chloroquine conduisait à une diminution de la respiration mitochondriale qui est probablement due à une baisse de l'activité des complexes I, II et IV. De plus ils ont observé une baisse de la quantité des métabolites du cycle de Krebs et de l'activité de la citrate synthase ainsi qu'une augmentation des dommages au niveau de

l'ADNmt. Dans l'ensemble, ces données suggèrent que l'inhibition de l'autophagie cause une baisse de la qualité des mitochondries. Ce point de vue est corroboré par une étude qui a démontré que des mitochondries isolées à partir de muscles squelettiques de souris *Atg7*^{-/-} présentaient une baisse de la respiration mitochondriale (Wu et al., 2009). Dans l'ensemble ces données suggèrent que l'inhibition de l'autophagie avec la bafilomycine A1 peut impacter directement et indirectement l'intégrité mitochondriale. Or, comme nous l'avons présenté précédemment, au cours de l'étude bibliographique (cf. partie 2 section 2.3.1 et 2.3.3) mais également lors de la discussion (partie 1 section 1.1.2), les mitochondries sont étroitement liées au métabolisme intermédiaire mais également au stress du RE. Ainsi, il est probable que les mitochondries jouent également un rôle dans les effets observés dans cette étude. Plus précisément, l'inhibition de l'autophagie par la bafilomycine A1 dans les hépatocytes de truite à jeun a pu conduire à une diminution de l'intégrité mitochondriale qui a pu, à son tour, impacter l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire (Figure 32). Il est également possible qu'un dysfonctionnement mitochondrial a pu induire un stress du RE qui a affecté l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire (Figure 32).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, nous avons démontré que l'inhibition de l'autophagie dans les hépatocytes de truite arc-en-ciel avec de la bafilomycine A1 affecte les gènes du métabolisme intermédiaire. Ces résultats corroborent avec les données précédemment obtenues *in vivo* et *in vitro* chez les poissons et mammifères. Ils mettent en lumière les liens étroits qui existent entre l'activité autophagique et l'expression des gènes liés au métabolisme intermédiaire, mais également la complexité des mécanismes qui peuvent intervenir dans ces processus.

Perspectives :

- A l'avenir il serait intéressant de confirmer ces résultats en utilisant des lignées cellulaires de poisson dont l'autophagie serait génétiquement invalidée et cela grâce à la technique CRISPR-Cas 9.
- Il serait également primordial d'acquérir d'avantages de connaissances dans la relations qui existe entre le RE, l'autophagie, les mitochondries et le métabolisme intermédiaire afin de comprendre plus en détail les mécanismes impliqués dans l'adaptation du métabolisme des poissons face aux stress environnementaux.

HÉPATOCYTES DE TRUITE ARC-EN-CIEL À JEUN

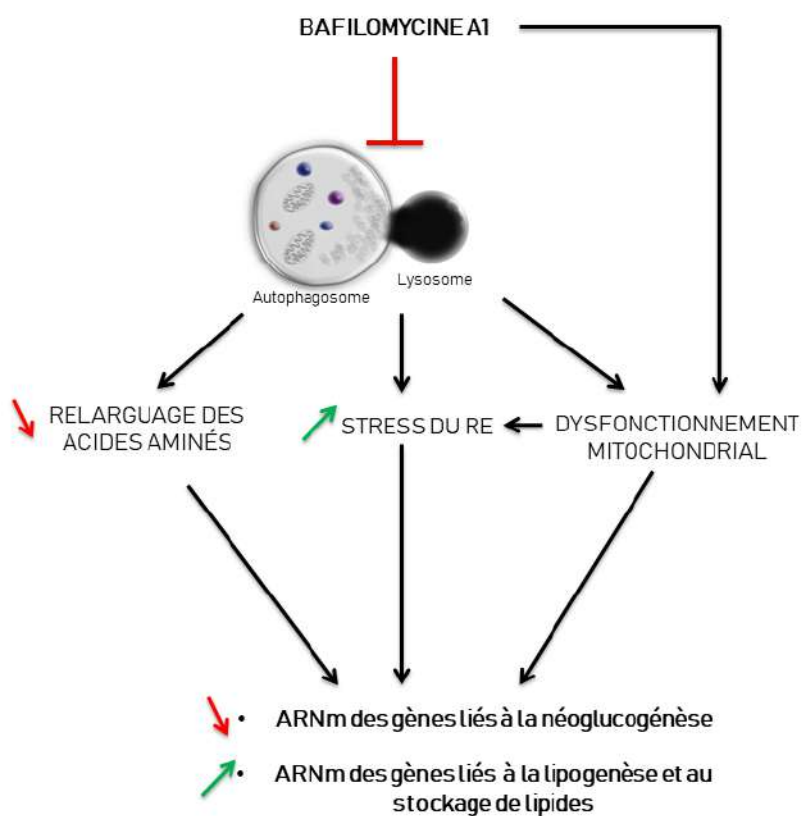


Figure 32 : Représentation schématique des conséquences d'une inhibition de l'autophagie avec de la bafilomycine A1 sur l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire dans des hépatocytes de truite arc-en-ciel à jeun.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

PARTIE 1: EFFETS A COURT ET LONG TERMES D'UNE DEFICIENCE EN METHIONINE SUR LES MITOCHONDRIES DANS LE FOIE DE TRUITE ARC-EN-CIEL

Au cours de cette thèse, nous avons démontré pour la première fois, chez les poissons, qu'une déficience en méthionine affectait directement la principale source énergétique des cellules : les mitochondries. De plus nous avons observé que cette baisse de l'intégrité mitochondriale était associée à de profondes perturbations de l'homéostasie hépatique, impactant notamment le RE, le statut oxydant et le métabolisme intermédiaire. Ces résultats, mettent en évidence la complexité des mécanismes qui se mettent en place au cours d'une déficience en méthionine. Compte tenu du nombre important de processus cellulaires dépendants de la disponibilité en méthionine et/ou ses dérivés, il n'est donc pas surprenant qu'un défaut d'apport en cet acide aminé puisse avoir d'importantes répercussions, non seulement sur la croissance, mais également sur le métabolisme dans son ensemble et l'état de santé général des poissons. Au cours de cette thèse nous avons d'ailleurs rédigé un article dans la revue *Aquafeed*, destiné aux professionnels, qui résume les nombreux effets physiologiques de la méthionine au-delà de ceux observé sur la croissance des poissons (cf. Article *Aquafeed*, Annexes) (Séité et al., 2019). La définition précise des mécanismes mis en jeu dans l'effet de la déficience en méthionine et de leurs interactions revêt donc une importance fondamentale afin d'identifier des marqueurs précoces de déséquilibre nutritionnel en cet acide aminé et/ou de nouvelles stratégies d'alimentation adaptées aux régimes à base de végétaux.

En ce sens, au cours de cette thèse nous avons mis en évidence, pour la première fois qu'une déficience en méthionine pendant seulement deux semaines lors des premiers repas

des alevins, pouvait avoir d'importantes répercussions à long terme sur un processus déterminant du métabolisme énergétique : la mitophagie. Bien que les conséquences physiologiques de cette induction programmée de la mitophagie n'aient pas été étudiées dans la présente thèse, il est probable que cela puisse influencer les performances de production. Il serait intéressant de déterminer les conséquences (positives ou négatives) dans le foie et d'autres tissus tels que le muscle, mais aussi de déterminer si une carence en méthionine précoce peut influencer d'autres systèmes cellulaires. Pour cela il est primordial de comprendre les mécanismes mis en place lors de la programmation nutritionnelle via la méthionine.

PARTIE 2: Autophagie, stress du RE et métabolisme intermédiaire

En milieu naturel ou au en élevage, les poissons sont régulièrement soumis à des stress environnementaux biotiques et abiotiques. L'autophagie est un mécanisme clé permettant aux cellules de rétablir l'homéostasie énergétique et nutritive. Dans cette seconde partie, qui se détache du contexte principale de cette thèse, nous avons démontré qu'une inhibition de l'autophagie impacte fortement l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire dans les hépatocytes de truite à jeun. Comme lors de la première partie de cette thèse, les résultats obtenus ont pu mettre en évidence un lien étroit entre différents compartiments et/ou fonctions cellulaires; dans ce cas entre l'autophagie, le réticulum endoplasmique, et l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire. Mais les relations épistatiques entre ces différentes fonctions ne sont pas encore définies et nécessiteront d'avantage de recherche. Néanmoins, cette étude a renforcé l'idée que l'autophagie joue un rôle primordial sur le métabolisme intermédiaire. Cette fonction est donc à prendre en considération lorsqu'on étudie la nutrition des poissons.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Anand, R., Wai, T., Baker, M.J., Kladt, N., Schauss, A.C., Rugarli, E., Langer, T., 2014. The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *J Cell Biol* 204, 919–929.
- Andersen, S.M., Waagbø, R., Espe, M., 2016. Functional amino acids in fish health and welfare. *Frontiers in Bioscience, Elite* 8, 143–169.
- Anthony, T.G., McDaniel, B.J., Byerley, R.L., McGrath, B.C., Cavener, D.R., McNurlan, M.A., Wek, R.C., 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.
- Arand, J., Spieler, D., Karius, T., Branco, M.R., Meilinger, D., Meissner, A., Jenuwein, T., Xu, G., Leonhardt, H., Wolf, V., Walter, J., 2012. In Vivo Control of CpG and Non-CpG DNA Methylation by DNA Methyltransferases. *PLOS Genetics* 8, e1002750.
- Arismendi-Morillo, G., 2011. Electron microscopy morphology of the mitochondrial network in gliomas and their vascular microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, Bioenergetics of Cancer* 1807, 602–608.
- Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M., Butler, J., 1988. The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochemical Journal* 256, 251–255.
- Averous, J., Lambert-Langlais, S., Mesclon, F., Carraro, V., Parry, L., Jousse, C., Bruhat, A., Maurin, A.-C., Pierre, P., Proud, C.G., 2016. GCN2 contributes to mTORC1 inhibition by leucine deprivation through an ATF4 independent mechanism. *Scientific reports* 6, 27698.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., Finkel, T., 2005. Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell* 120, 483–495.
- Balasubramanian, M.N., Panserat, S., Dupont-Nivet, M., Quillet, E., Montfort, J., Le Cam, A., Medale, F., Kaushik, S.J., Geurden, I., 2016. Molecular pathways associated with the nutritional programming of plant-based diet acceptance in rainbow trout following an early feeding exposure. *BMC genomics* 17, 449.
- Banerjee, R., Zou, C., 2005. Redox regulation and reaction mechanism of human cystathionine- β -synthase: a PLP-dependent hemesensor protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics, Highlight issue on Enzyme Mechanisms* 433, 144–156.

- Bannister, A.J., Kouzarides, T., 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research* 21, 381–395.
- Barnes, D.M., Calvert, C.C., Klasing, K.C., 1995. Methionine Deficiency Decreases Protein Accretion and Synthesis but Not tRNA Acylation in Muscles of Chicks. *J Nutr* 125, 2623–2630.
- Basseri, S., Austin, R.C., 2012. Endoplasmic reticulum stress and lipid metabolism: mechanisms and therapeutic potential. *Biochemistry research international* 2012.
- Begrache, K., Igoudjil, A., Pessayre, D., Fromenty, B., 2006. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 6, 1–28.
- Belghit, I., Skiba-Cassy, S., Geurden, I., Dias, K., Surget, A., Kaushik, S., Panserat, S., Seiliez, I., 2014. Dietary methionine availability affects the main factors involved in muscle protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nutr.* 112, 493–503.
- Black, J.C., Whetstone, J.R., 2013. Tipping the lysine methylation balance in disease. *Biopolymers* 99, 127–135.
- Bleier, L., Dröse, S., 2013. Superoxide generation by complex III: From mechanistic rationales to functional consequences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, Respiratory complex III and related bc complexes 1827, 1320–1331.
- Borek, A., Sarewicz, M., Osyczka, A., 2008. Movement of the Iron–Sulfur Head Domain of Cytochrome bc1 Transiently Opens the Catalytic Qo Site for Reaction with Oxygen. *Biochemistry* 47, 12365–12370.
- Bouckennooghe, T., Remacle, C., Reusens, B., 2006. Is taurine a functional nutrient? *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 9, 728.
- Bouman, L., Schlierf, A., Lutz, A.K., Shan, J., Deinlein, A., Kast, J., Galehdar, Z., Palmisano, V., Patenge, N., Berg, D., Gasser, T., Augustin, R., Trümbach, D., Irrcher, I., Park, D.S., Wurst, W., Kilberg, M.S., Tatzelt, J., Winklhofer, K.F., 2011. Parkin is transcriptionally regulated by ATF4: evidence for an interconnection between mitochondrial stress and ER stress. *Cell Death and Differentiation* 18, 769–782.
- Boya, P., Reggiori, F., Codogno, P., 2013. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature Cell Biology* 15, 713–720.
- Brown-Borg, H.M., Buffenstein, R., 2017. Cutting back on the essentials: Can manipulating intake of specific amino acids modulate health and lifespan? *Ageing Research Reviews*, Nutritional interventions modulating aging and age-associated diseases 39, 87–95.
- Bruhat, A., Jousse, C., Carraro, V., Reimold, A.M., Ferrara, M., Fafournoux, P., 2000. Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the CHOP promoter. *Molecular and Cellular Biology* 20, 7192–7204.
- Buckley, A.J., Jaquiere, A.L., Harding, J.E., 2005. Nutritional programming of adult disease. *Cell Tissue Res* 322, 73–79.

- Burdge, G.C., Hanson, M.A., Slater-Jefferies, J.L., Lillycrop, K.A., 2007. Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *British Journal of Nutrition* 97, 1036–1046.
- Caballero, F., Fernández, A., Matías, N., Martínez, L., Fucho, R., Elena, M., Caballeria, J., Morales, A., Fernández-Checa, J.C., García-Ruiz, C., 2010. Specific Contribution of Methionine and Choline in Nutritional Nonalcoholic Steatohepatitis impact on mitochondrial s-adenosyl-l-methionine and glutathione. *J. Biol. Chem.* 285, 18528–18536.
- Caldwell, S.H., Swerdlow, R.H., Khan, E.M., Iezzoni, J.C., Hespenheide, E.E., Parks, J.K., Parker Jr, W.D., 1999. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of hepatology* 31, 430–434.
- Cao, X., Kambe, F., Lu, X., Kobayashi, N., Ohmori, S., Seo, H., 2005. Glutathionylation of two cysteine residues in paired domain regulates DNA binding activity of Pax-8. *Journal of Biological Chemistry* 280, 25901–25906.
- Caro, P., Gómez, J., López-Torres, M., Sánchez, I., Naudí, A., Jove, M., Pamplona, R., Barja, G., 2008. Forty percent and eighty percent methionine restriction decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology* 9, 183–196.
- Caro, P., Gomez, J., Sanchez, I., Naudi, A., Ayala, V., López-Torres, M., Pamplona, R., Barja, G., 2009. Forty Percent Methionine Restriction Decreases Mitochondrial Oxygen Radical Production and Leak at Complex I During Forward Electron Flow and Lowers Oxidative Damage to Proteins and Mitochondrial DNA in Rat Kidney and Brain Mitochondria. *Rejuvenation Research* 12, 421–434.
- Chang, T.-S., Cho, C.-S., Park, S., Yu, S., Kang, S.W., Rhee, S.G., 2004. Peroxiredoxin III, a Mitochondrion-specific Peroxidase, Regulates Apoptotic Signaling by Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 41975–41984.
- Chantranupong, L., Scaria, S.M., Saxton, R.A., Gygi, M.P., Shen, K., Wyant, G.A., Wang, T., Harper, J.W., Gygi, S.P., Sabatini, D.M., 2016. The CASTOR Proteins Are Arginine Sensors for the mTORC1 Pathway. *Cell* 165, 153–164.
- Chen, G., Han, Z., Feng, D., Chen, Y., Chen, L., Wu, H., Huang, L., Zhou, C., Cai, X., Fu, C., 2014. A regulatory signaling loop comprising the PGAM5 phosphatase and CK2 controls receptor-mediated mitophagy. *Molecular cell* 54, 362–377.
- Chen, X., Zhong, J., Dong, D., Liu, G., Yang, P., 2017. Endoplasmic Reticulum Stress-Induced CHOP Inhibits PGC-1 α and Causes Mitochondrial Dysfunction in Diabetic Embryopathy. *Toxicol. Sci.* 158, 275–285.
- Cho, C.Y., Kaushik, S.J., 1990. Nutritional energetics in fish: energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *World review of nutrition and dietetics* 61, 132–172.
- Clark, S.L., 1957. Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studied with the electron microscope. *The Journal of Cell Biology* 3, 349–362.
- Cogliati, S., Enriquez, J.A., Scorrano, L., 2016. Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends in Biochemical Sciences* 41, 261–273.

- Cotgreave, I.A., 1998. Recent trends in glutathione biochemistry glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242, 1–9.
- Corraze, G., Kaushik, S., 2009. Alimentation lipidique et remplacement des huiles de poisson par des huiles végétales en pisciculture. *Cahiers Agricultures* 18, 112–118.
- Cowey, C.B., Cho, C.Y., Sivak, J.G., Weerheim, J.A., Stuart, D.D., 1992. Methionine intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), relationship to cataract formation and the metabolism of methionine. *The Journal of nutrition* 122, 1154–1163.
- Craig, P.M., Massarsky, A., Moon, T.W., 2013. Understanding glucose uptake during methionine deprivation in incubated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes using a non-radioactive method. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 166, 23–29.
- Craig, P.M., Moon, T.W., 2013. Methionine restriction affects the phenotypic and transcriptional response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to carbohydrate-enriched diets. *British Journal of Nutrition* 109, 402–412.
- Cuervo, A.M., 2004. Autophagy: in sickness and in health. *Trends in cell biology* 14, 70–77.
- Cuervo, A.M., Wong, E., 2014. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Research* 24, 92–104.
- Cusi, K., 2016. Treatment of patients with type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease: current approaches and future directions. *Diabetologia* 59, 1112–1120.
- Dai, D.-F., Chiao, Y.-A., Martin, G.M., Marcinek, D.J., Basisty, N., Quarles, E.K., Rabinovitch, P.S., 2017. Chapter Seven - Mitochondrial-Targeted Catalase: Extended Longevity and the Roles in Various Disease Models, in: Reddy, P.H. (Ed.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science, Molecular Biology of Aging*. Academic Press, pp. 203–241.
- Dashty, M., 2013. A quick look at biochemistry: Carbohydrate metabolism. *Clinical Biochemistry* 46, 1339–1352.
- Detmer, S.A., Velde, C.V., Cleveland, D.W., Chan, D.C., 2007. Hindlimb gait defects due to motor axon loss and reduced distal muscles in a transgenic mouse model of Charcot–Marie–Tooth type 2A. *Human molecular genetics* 17, 367–375.
- Di Rita, A., D’Acunzo, P., Simula, L., Campello, S., Strappazon, F., Cecconi, F., 2018. AMBRA1-Mediated Mitophagy Counteracts Oxidative Stress and Apoptosis Induced by Neurotoxicity in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Front. Cell. Neurosci.* 12.
- Dikic, I., Elazar, Z., 2018. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19, 349.
- Dominy, J.E., Puigserver, P., 2013. Mitochondrial Biogenesis through Activation of Nuclear Signaling Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.

- Dong, J., Qiu, H., Garcia-Barrio, M., Anderson, J., Hinnebusch, A.G., 2000. Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Molecular cell* 6, 269–279.
- Dorn, G.W., 2015. Mitochondrial dynamism and heart disease: changing shape and shaping change. *EMBO Molecular Medicine* 7, 865–877.
- Dröse, S., Brandt, U., 2008. The Mechanism of Mitochondrial Superoxide Production by the Cytochrome bc1 Complex. *J. Biol. Chem.* 283, 21649–21654.
- Duplan, E., Giaime, E., Viotti, J., Sévalle, J., Corti, O., Brice, A., Ariga, H., Qi, L., Checler, F., Costa, C.A. da, 2013. ER-stress-associated functional link between Parkin and DJ-1 via a transcriptional cascade involving the tumor suppressor p53 and the spliced X-box binding protein XBP-1. *J Cell Sci* 126, 2124–2133.
- Echtay, K.S., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabsons, M.B., Cadenas, S., Stuart, J.A., Harper, J.A., Roebuck, S.J., Morrison, A., Pickering, S., Clapham, J.C., Brand, M.D., 2002. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 415, 96–99.
- Elmada, C.Z., Huang, W., Jin, M., Liang, X., Mai, K., Zhou, Q., 2016. The effect of dietary methionine on growth, antioxidant capacity, innate immune response and disease resistance of juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture Nutrition* 22, 1163–1173.
- Espe, M., Andersen, S.M., Holen, E., Rønnestad, I., Veiseth-Kent, E., Zerrahn, J.-E., Aksnes, A., 2014. Methionine deficiency does not increase polyamine turnover through depletion of hepatic S-adenosylmethionine in juvenile Atlantic salmon. *British Journal of Nutrition* 112, 1274–1285.
- Espe, M., Rathore, R.M., Du, Z.-Y., Liaset, B., El-Mowafi, A., 2010. Methionine limitation results in increased hepatic FAS activity, higher liver 18:1 to 18:0 fatty acid ratio and hepatic TAG accumulation in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Amino Acids* 39, 449–460.
- Esworthy, R.S., Ho, Y.-S., Chu, F.-F., 1997. TheGpx1Gene Encodes Mitochondrial Glutathione Peroxidase in the Mouse Liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 340, 59–63.
- Ettema, T.J.G., 2016. Evolution: Mitochondria in the second act. *Nature* 531, 39–40.
- Ezaki, J., Matsumoto, N., Takeda-Ezaki, M., Komatsu, M., Takahashi, K., Hiraoka, Y., Taka, H., Fujimura, T., Takehana, K., Yoshida, M., Iwata, J., Tanida, I., Furuya, N., Zheng, D.-M., Tada, N., Tanaka, K., Kominami, E., Ueno, T., 2011. Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels. *Autophagy* 7, 727–736.
- Fakruddin, M., Wei, F.-Y., Suzuki, Takeo, Asano, K., Kaieda, T., Omori, A., Izumi, R., Fujimura, A., Kaitsuka, T., Miyata, K., Araki, K., Oike, Y., Scorrano, L., Suzuki, Tsutomu, Tomizawa, K., 2018. Defective Mitochondrial tRNA Taurine Modification Activates Global Proteostress and Leads to Mitochondrial Disease. *Cell Reports* 22, 482–496.
- Fang, L., Liang, X.-F., Zhou, Y., Guo, X.-Z., He, Y., Yi, T.-L., Liu, L.-W., Yuan, X.-C., Tao, Y.-X., 2014. Programming effects of high-carbohydrate feeding of larvae on adult glucose metabolism in zebrafish, *Danio rerio*. *British Journal of Nutrition* 111, 808–818.
- FAO. 2018. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2018. Atteindre les objectifs de développement durable. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

- Farmer, T., Naslavsky, N., Caplan, S., 2018. Tying trafficking to fusion and fission at the mighty mitochondria. *Traffic* 19, 569–577.
- Feng, L., Xiao, W.-W., Liu, Y., Jiang, J., Hu, K., Jiang, W.-D., Li, S.-H., Zhou, X.-Q., 2011. Methionine hydroxy analogue prevents oxidative damage and improves antioxidant status of intestine and hepatopancreas for juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture Nutrition* 17, 595–604.
- Ferramosca, A., Zara, V., 2014. Dietary Fat and Hepatic Lipogenesis: Mitochondrial Citrate Carrier as a Sensor of Metabolic Changes¹. *Adv Nutr* 5, 217–225.
- Finkelstein, J.D., 1990. Methionine metabolism in mammals. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 1, 228–237.
- Fontagné-Dicharry, S., Alami-Durante, H., Aragão, C., Kaushik, S.J., Geurden, I., 2017. Parental and early-feeding effects of dietary methionine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 469, 16–27.
- Forgac, M., 2007. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 917–929.
- Foufelle, F., Ferré, P., 2007. La réponse UPR: Son rôle physiologique et physiopathologique. *médecine/sciences* 23, 291–296.
- Gabory, A., Attig, L., Junien, C., 2011. Epigenetic mechanisms involved in developmental nutritional programming. *World J Diabetes* 2, 164–175.
- Gatlin, D.M., Barrows, F.T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, Å., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., J Souza, E., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E., 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research* 38, 551–579.
- Gaull, G.E., 1986. Taurine as a conditionally essential nutrient in man. *Journal of the American College of Nutrition* 5, 121–125.
- Gellerich, F.N., Schlame, M., Bohnensack, R., Kunz, W., 1987. Dynamic compartmentation of adenine nucleotides in the mitochondrial intermembrane space of rat-heart mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 890, 117–126.
- Geurden, I., Aramendi, M., Zambonino-infante, J.L., Panserat, S., 2007. Early feeding of carnivorous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with a hyperglucidic diet during a short period: effect on dietary glucose utilisation in juveniles. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*.
- Geurden, I., Borchert, P., Balasubramanian, M.N., Schrama, J.W., Dupont-Nivet, M., Quillet, E., Kaushik, S.J., Panserat, S., Médale, F., 2013. The positive impact of the early-feeding of a plant-based diet on its future acceptance and utilisation in rainbow trout. *PLoS One* 8, e83162.
- Geurden, I., Mennigen, J., Plagnes-Juan, E., Veron, V., Cerezo, T., Mazurais, D., Zambonino-Infante, J., Gatesoupe, J., Skiba-Cassy, S., Panserat, S., 2014. High or low dietary carbohydrate:protein ratios during first-feeding affect glucose metabolism and intestinal microbiota in juvenile rainbow trout. *Journal of Experimental Biology* 217, 3396–3406.

- Giguère, V., 2008. Transcriptional Control of Energy Homeostasis by the Estrogen-Related Receptors. *Endocr Rev* 29, 677–696.
- Gingras, A.-C., Raught, B., Sonenberg, N., 1999. eIF4 Initiation Factors: Effectors of mRNA Recruitment to Ribosomes and Regulators of Translation. *Annual Review of Biochemistry* 68, 913–963.
- Gomes, L.C., Benedetto, G.D., Scorrano, L., 2011. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nature Cell Biology* 13, 589–598.
- Gosmain, Y., Dif, N., Berbe, V., Loizon, E., Rieusset, J., Vidal, H., Lefai, E., 2005. Regulation of SREBP-1 expression and transcriptional action on HKII and FAS genes during fasting and refeeding in rat tissues. *J. Lipid Res.* 46, 697–705.
- Gu, X., Orozco, J.M., Saxton, R.A., Condon, K.J., Liu, G.Y., Krawczyk, P.A., Scaria, S.M., Harper, J.W., Gygi, S.P., Sabatini, D.M., 2017. SAMTOR is an S-adenosylmethionine sensor for the mTORC1 pathway. *Science* 358, 813–818.
- Guo, J., Yang, Z., Yang, X., Li, T., Liu, M., Tang, H., 2018. miR-346 functions as a pro-survival factor under ER stress by activating mitophagy. *Cancer Lett.* 413, 69–81.
- Gurkan, C., Koulov, A.V., Balch, W.E., 2007. An evolutionary perspective on eukaryotic membrane trafficking, in: *Eukaryotic Membranes and Cytoskeleton*. Springer, pp. 73–83.
- Gustafsson, Å.B., Dorn, G.W., 2018. Evolving and Expanding the Roles of Mitophagy as a Homeostatic and Pathogenic Process. *Physiological reviews* 99, 853–892.
- Hales, C.N., Barker, D.J., 1992. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35, 595–601.
- Han, J., Kaufman, R.J., 2016. The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity. *Journal of lipid research jlr*. R067595.
- Hansford, R.G., Hogue, B.A., Mildaziene, V., 1997. Dependence of H₂O₂ Formation by Rat Heart Mitochondria on Substrate Availability and Donor Age. *J Bioenerg Biomembr* 29, 89–95.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Ron, D., 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397, 271–274.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D.F., Bell, J.C., Hettmann, T., Leiden, J.M., Ron, D., 2003. An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress. *Molecular Cell* 11, 619–633.
- Hardy, R.W., Webster, C.D., Lim, C.E., 2002. Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. Book by Carl D. Webster.
- Hasek, B.E., Stewart, L.K., Henagan, T.M., Boudreau, A., Lenard, N.R., Black, C., Shin, J., Huypens, P., Malloy, V.L., Plaisance, E.P., Krajcik, R.A., Orentreich, N., Gettys, T.W., 2010. Dietary

methionine restriction enhances metabolic flexibility and increases uncoupled respiration in both fed and fasted states. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 299, R728–R739.

- Heightman, T.D., 2011. Chemical Biology of Lysine Demethylases. *Curr Chem Genomics* 5, 62–71.
- Heo, J.-M., Ordureau, A., Paulo, J.A., Rinehart, J., Harper, J.W., 2015. The PINK1-PARKIN Mitochondrial Ubiquitylation Pathway Drives a Program of OPTN/NDP52 Recruitment and TBK1 Activation to Promote Mitophagy. *Molecular Cell* 60, 7–20.
- Hewitt, V.L., Whitworth, A.J., 2017. Chapter 3 - Mitochondrial Fission and Fusion, in: Verstreken, P. (Ed.), *Parkinson's Disease*. Academic Press, San Diego, pp. 77–111.
- Ho, T.T., Warr, M.R., Adelman, E.R., Lansinger, O.M., Flach, J., Verovskaya, E.V., Figueroa, M.E., Passequé, E., 2017. Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells. *Nature* 543, 205–210.
- Hock, M.B., Kralli, A., 2009. Transcriptional Control of Mitochondrial Biogenesis and Function. *Annual Review of Physiology* 71, 177–203.
- Honrath, B., Metz, I., Bendridi, N., Rieusset, J., Culmsee, C., Dolga, A.M., 2017. Glucose-regulated protein 75 determines ER–mitochondrial coupling and sensitivity to oxidative stress in neuronal cells. *Cell Death Discovery* 3, 17076.
- Hunter, D.R., Haworth, R.A., 1979. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria: III. Transitional Ca²⁺ release. *Archives of biochemistry and biophysics* 195, 468–477.
- Husnjak, K., Elsasser, S., Zhang, N., Chen, X., Randles, L., Shi, Y., Hofmann, K., Walters, K.J., Finley, D., Dikic, I., 2008. Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature* 453, 481–488.
- Ibdah, J.A., Perlegas, P., Zhao, Y., Angdisen, J., Borgerink, H., Shadoan, M.K., Wagner, J.D., Matern, D., Rinaldo, P., Cline, J.M., 2005. Mice heterozygous for a defect in mitochondrial trifunctional protein develop hepatic steatosis and insulin resistance. *Gastroenterology* 128, 1381–1390.
- Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T., Mihara, K., 2006. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *The EMBO journal* 25, 2966–2977.
- Iurlaro, R., Muñoz-Pinedo, C., 2016. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *The FEBS Journal* 283, 2640–2652.
- Jackson, A.J., Capper, B.S., 1982a. Investigations into the requirements of the tilapia *Sarotherodon mossambicus* for dietary methionine, lysine and arginine in semi-synthetic diets. *Aquaculture* 29, 289–297.
- Jackson, A.J., Capper, B.S., 1982b. Investigations into the requirements of the tilapia *Sarotherodon mossambicus* for dietary methionine, lysine and arginine in semi-synthetic diets. *Aquaculture* 29, 289–297.
- Jefferies, H.B., Fumagalli, S., Dennis, P.B., Reinhard, C., Pearson, R.B., Thomas, G., 1997. Rapamycin suppresses 5' TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *The EMBO journal* 16, 3693–3704.

- Jewell, J.L., Kim, Y.C., Russell, R.C., Yu, F.-X., Park, H.W., Plouffe, S.W., Tagliabracci, V.S., Guan, K.-L., 2015. Differential regulation of mTORC1 by leucine and glutamine. *Science* 1259472.
- Jewell, J.L., Russell, R.C., Guan, K.-L., 2013. Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14, 133–139.
- Jhanwar-Uniyal, M., Gillick, J.L., Neil, J., Tobias, M., Thwing, Z.E., Murali, R., 2015. Distinct signaling mechanisms of mTORC1 and mTORC2 in glioblastoma multiforme: a tale of two complexes. *Adv Biol Regul* 57, 64–74.
- Jiang, H., Bian, F., Zhou, H., Wang, X., Wang, K., Mai, K., He, G., 2017. Nutrient sensing and metabolic changes after methionine deprivation in primary muscle cells of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *The Journal of nutritional biochemistry* 50, 74–82.
- Jin, S.M., Lazarou, M., Wang, C., Kane, L.A., Narendra, D.P., Youle, R.J., 2010. Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *The Journal of Cell Biology* 191, 933–942.
- Jong, C.J., Azuma, J., Schaffer, S., 2012. Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: prevention of mitochondrial oxidant production. *Amino Acids* 42, 2223–2232.
- Jurkowska, R.Z., Jurkowski, T.P., Jeltsch, A., 2011. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem* 12, 206–222.
- Kammoun, H.L., Chabanon, H., Hainault, I., Luquet, S., Magnan, C., Koike, T., Ferré, P., Foufelle, F., 2009. GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *The Journal of clinical investigation* 119, 1201–1215.
- Kaplowitz, N., Aw, T.Y., Ookhtens, M., 1985. The regulation of hepatic glutathione. *Annual review of pharmacology and toxicology* 25, 715–744.
- Kaufman, R.J., 2002. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 110, 1389–1398.
- Kausar, S., Wang, F., Cui, H., 2018. The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Generation and Its Implications for Neurodegenerative Diseases. *Cells* 7, 274.
- Kaushik, S., 2014. L’apport de la pisciculture à l’alimentation de l’homme. *Cah. Agric.* 23, 18–23.
- Kaushik, S., Hemre, G., Lie, Ø., 2008. Plant proteins as alternative sources for fish feed and farmed fish quality. Improving farmed fish quality and safety 300–327.
- Kilberg, M.S., Shan, J., Su, N., 2009. ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 20, 436–443.
- Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., 2006. Role of mitochondria as the gardens of cell death. *Cancer Chemother Pharmacol* 57, 545–553. <https://doi.org/10.1007/s00280-005-0111-7>.
- Kim, J., Kim, E., 2016. Rag GTPase in amino acid signaling. *Amino Acids* 48, 915–928.

- Kirino, Y., Yasukawa, T., Ohta, S., Akira, S., Ishihara, K., Watanabe, K., Suzuki, T., 2004. Codon-specific translational defect caused by a wobble modification deficiency in mutant tRNA from a human mitochondrial disease. *PNAS* 101, 15070–15075.
- Kissová, I., Deffieu, M., Manon, S., Camougrand, N., 2004. Uth1p Is Involved in the Autophagic Degradation of Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 39068–39074.
- Klatt, P., Molina, E.P., De Lacoba, M.G., Padilla, C.A., Martínez-galisteo, E., Bárcena, J.A., Lamas, S., 1999. Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathiolation. *The FASEB Journal* 13, 1481–1490.
- Klionsky, D.J., 2008. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. *Autophagy* 4, 740–743.
- Koehler, C.M., Jarosch, E., Tokatlidis, K., Schmid, K., Schweyen, R.J., Schatz, G., 1998. Import of Mitochondrial Carriers Mediated by Essential Proteins of the Intermembrane Space. *Science* 279, 369–373.
- Koh, E.H., Park, J.-Y., Park, H.-S., Jeon, M.J., Ryu, J.W., Kim, M., Kim, S.Y., Kim, M.-S., Kim, S.-W., Park, I.S., Youn, J.H., Lee, K.-U., 2007. Essential Role of Mitochondrial Function in Adiponectin Synthesis in Adipocytes. *Diabetes* 56, 2973–2981.
- Kohli, R.M., Zhang, Y., 2013. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* 502, 472.
- Koliaki, C., Szendroedi, J., Kaul, K., Jelenik, T., Nowotny, P., Jankowiak, F., Herder, C., Carstensen, M., Krausch, M., Knoefel, W.T., Schlensak, M., Roden, M., 2015. Adaptation of Hepatic Mitochondrial Function in Humans with Non-Alcoholic Fatty Liver Is Lost in Steatohepatitis. *Cell Metabolism* 21, 739–746.
- Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, J., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K., Chiba, T., 2005. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* 169, 425–434.
- Kozieł, R., Ruckstuhl, C., Albertini, E., Neuhaus, M., Netzberger, C., Bust, M., Madeo, F., Wiesner, R.J., Jansen-Dürr, P., 2014. Methionine restriction slows down senescence in human diploid fibroblasts. *Aging Cell* 13, 1038–1048.
- Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., Maleszka, R., 2008. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* 319, 1827–1830.
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhi, T., Mizushima, N., 2004. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432, 1032–1036.
- Kurihara, Y., Kanki, T., Aoki, Y., Hirota, Y., Saigusa, T., Uchiumi, T., Kang, D., 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.
- Lambert, I.H., Kristensen, D.M., Holm, J.B., Mortensen, O.H., 2015. Physiological role of taurine – from organism to organelle. *Acta Physiologica* 213, 191–212.

- Lansard, M., Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Dias, K., Seiliez, I., Skiba-Cassy, S., 2011. l-Leucine, l-Methionine, and l-Lysine Are Involved in the Regulation of Intermediary Metabolism-Related Gene Expression in Rainbow Trout Hepatocytes. *J. Nutr.* 141, 75–80.
- Lansard, M., Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Seiliez, I., Skiba-Cassy, S., 2010. Integration of insulin and amino acid signals that regulate hepatic metabolism-related gene expression in rainbow trout: role of TOR. *Amino Acids* 39, 801–810.
- Lassala, A., Bazer, F.W., Cudd, T.A., Datta, S., Keisler, D.H., Satterfield, M.C., Spencer, T.E., Wu, G., 2010. Parenteral Administration of L-Arginine Prevents Fetal Growth Restriction in Undernourished Ewes. *J Nutr* 140, 1242–1248.
- Lauressergues, E., Bert, E., Duriez, P., Hum, D., Majd, Z., Staels, B., Cussac, D., 2012. Does endoplasmic reticulum stress participate in APD-induced hepatic metabolic dysregulation? *Neuropharmacology, Post-Traumatic Stress Disorder* 62, 784–796.
- Lauridsen, C., Jensen, S.K., 2012. α -Tocopherol incorporation in mitochondria and microsomes upon supranutritional vitamin E supplementation. *Genes Nutr* 7, 475–482.
- Lazarou, M., Sliter, D.A., Kane, L.A., Sarraf, S.A., Wang, C., Burman, J.L., Sideris, D.P., Fogel, A.I., Youle, R.J., 2015. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* 524, 309–314.
- Lee, A.-H., Scapa, E.F., Cohen, D.E., Glimcher, L.H., 2008. Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science* 320, 1492–1496.
- Lee, J.-S., Mendez, R., Heng, H.H., Yang, Z., Zhang, K., 2012. Pharmacological ER stress promotes hepatic lipogenesis and lipid droplet formation. *Am J Transl Res* 4, 102–113.
- Lees, E.K., Król, E., Grant, L., Shearer, K., Wyse, C., Moncur, E., Bykowska, A.S., Mody, N., Gettys, T.W., Delibegovic, M., 2014. Methionine restriction restores a younger metabolic phenotype in adult mice with alterations in fibroblast growth factor 21. *Aging cell* 13, 817–827.
- Legault, J., Carrier, C., Petrov, P., Renard, P., Remacle, J., Mirault, M.-E., 2000. Mitochondrial GPx1 Decreases Induced but Not Basal Oxidative Damage to mtDNA in T47D Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 272, 416–422.
- Lemasters, J.J., 2005. Selective Mitochondrial Autophagy, or Mitophagy, as a Targeted Defense Against Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. *Rejuvenation Research* 8, 3–5.
- Lenaz, G., 2001. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB life* 52, 159–164.
- Levine, R.L., Berlett, B.S., Moskovitz, J., Mosoni, L., Stadtman, E.R., 1999. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mechanisms of Ageing and Development* 107, 323–332.
- Li, P., Burr, G.S., Wen, Q., Goff, J.B., Murthy, H.S., Gatlin, D.M., 2009. Dietary sufficiency of sulfur amino acid compounds influences plasma ascorbic acid concentrations and liver peroxidation of juvenile hybrid striped bass (*Morone chrysops*×*M. saxatilis*). *Aquaculture* 287, 414–418.

- Li, W., Li, X., Miller, R.A., 2014. ATF 4 activity: a common feature shared by many kinds of slow-aging mice. *Aging cell* 13, 1012–1018.
- Li, Z., Agellon, L.B., Allen, T.M., Umeda, M., Jewell, L., Mason, A., Vance, D.E., 2006. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. *Cell Metabolism* 3, 321–331.
- Liang, C., Lee, J., Inn, K.-S., Gack, M.U., Li, Q., Roberts, E.A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C., Jung, J.U., 2008. Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nature Cell Biology* 10, 776–787.
- Liu, J., Dias, K., Plagnes-Juan, E., Veron, V., Panserat, S., Marandel, L., 2017. Long-term programming effect of embryonic hypoxia exposure and high-carbohydrate diet at first feeding on glucose metabolism in juvenile rainbow trout. *Journal of Experimental Biology* 220, 3686–3694.
- Liu, L., van Groen, T., Kadish, I., Tollefsbol, T.O., 2009. DNA methylation impacts on learning and memory in aging. *Neurobiology of Aging* 30, 549–560.
- Liu, X., Weaver, D., Shirihai, O., Hajnóczky, G., 2009b. Mitochondrial ‘kiss-and-run’: interplay between mitochondrial motility and fusion–fission dynamics. *The EMBO Journal* 28, 3074–3089.
- Lu, P.D., Harding, H.P., Ron, D., 2004. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *The Journal of Cell Biology* 167, 27–33.
- Lucas, A., 1998. Programming by early nutrition: An experimental approach. *J. Nutr.* 128, 401S–406S.
- Lucas, A., 1991. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found. Symp.* 156, 38–50; discussion 50–55.
- Ma, X.M., Blenis, J., 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature reviews Molecular cell biology* 10, 307.
- Ma, C., Niu, R., Huang, T., Shao, L.-W., Peng, Y., Ding, W., Wang, Y., Jia, G., He, C., Li, C.-Y., 2019. N6-methyldeoxyadenine is a transgenerational epigenetic signal for mitochondrial stress adaptation. *Nature cell biology* 21, 319.
- Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., Kroemer, G., 2007. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 741–752.
- Mambrini, M., Roem, A.J., Carvèdi, J.P., Lallès, J.P., Kaushik, S.J., 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*. *Journal of animal science* 77, 2990–2999.
- Marcinkiewicz, J., 2010. Taurine bromamine (TauBr) - its role in immunity and new perspectives for clinical use. *Journal of Biomedical Science* 17, S3.

- Martin, C., Zhang, Y., 2005. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 838–849.
- Mathers, J.C., 2007. Early nutrition: impact on epigenetics. *Forum Nutr* 60, 42–48.
- Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., Isobe, T., Akira, S., Noda, T., Yoshimori, T., 2009. Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nature Cell Biology* 11, 385–396.
- Mattocks, D.A., Mentch, S.J., Shneyder, J., Ables, G.P., Sun, D., Richie Jr, J.P., Locasale, J.W., Nichenametla, S.N., 2017. Short term methionine restriction increases hepatic global DNA methylation in adult but not young male C57BL/6J mice. *Experimental gerontology* 88, 1–8.
- Mears, J.A., Lackner, L.L., Fang, S., Ingberman, E., Nunnari, J., Hinshaw, J.E., 2011. Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nature Structural & Molecular Biology* 18, 20–26.
- Médale, F., Kaushik, S., 2009. Les sources protéiques dans les aliments pour les poissons d'élevage. *Cahiers Agricultures* 18, 103–111 (1).
- Medale, F., Le Boucher, R., Dupont-Nivet, M., Quillet, E., Aubin, J., Panserat, S., 2013. Des aliments à base de végétaux pour les poissons d'élevage. *INRA Productions animales* 26, 303–315.
- Meijer, A.J., Dubbelhuis, P.F., 2004. Amino acid signalling and the integration of metabolism. *Biochemical and biophysical research communications* 313, 397–403.
- Mentch, S.J., Mehrmohamadi, M., Huang, L., Liu, X., Gupta, D., Mattocks, D., Gómez Padilla, P., Ables, G., Bamman, M.M., Thalacker-Mercer, A.E., Nichenametla, S.N., Locasale, J.W., 2015. Histone Methylation Dynamics and Gene Regulation Occur through the Sensing of One-Carbon Metabolism. *Cell Metabolism* 22, 861–873.
- Meissner, C., Lorenz, H., Weihofen, A., Selkoe, D.J., Lemberg, M.K., 2011. The mitochondrial intramembrane protease PARL cleaves human Pink1 to regulate Pink1 trafficking. *Journal of Neurochemistry* 117, 856–867.
- Métayer, S., Seilliez, I., Collin, A., Duchêne, S., Mercier, Y., Geraert, P.-A., Tesseraud, S., 2008. Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 19, 207–215.
- Métayer-Coustard, S., Mameri, H., Seilliez, I., Crochet, S., Crépieux, P., Mercier, Y., Geraert, P.-A., Tesseraud, S., 2010. Methionine deprivation regulates the S6K1 pathway and protein synthesis in avian QM7 myoblasts without activating the GCN2/eIF2 alpha cascade. *The Journal of nutrition* 140, 1539–1545.
- Mishra, P., Carelli, V., Manfredi, G., Chan, D.C., 2014. Proteolytic Cleavage of Opa1 Stimulates Mitochondrial Inner Membrane Fusion and Couples Fusion to Oxidative Phosphorylation. *Cell Metabolism* 19, 630–641.
- Mishra, P., Chan, D.C., 2016. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J. Cell Biol.* 212, 379–387.

- Moreno-Sánchez, R., Hernández-Esquivel, L., Rivero-Segura, N.A., Marín-Hernández, A., Neuzil, J., Ralph, S.J., Rodríguez-Enríquez, S., 2013. Reactive oxygen species are generated by the respiratory complex II—evidence for lack of contribution of the reverse electron flow in complex I. *The FEBS journal* 280, 927–938.
- Moskovitz, J., Bar-Noy, S., Williams, W.M., Requena, J., Berlett, B.S., Stadtman, E.R., 2001. Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *PNAS* 98, 12920–12925.
- Moskovitz, J., Berlett, B.S., Poston, J.M., Stadtman, E.R., 1997. The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant in vivo. *PNAS* 94, 9585–9589.
- Moskovitz, J., Flescher, E., Berlett, B.S., Azare, J., Poston, J.M., Stadtman, E.R., 1998. Overexpression of peptide-methionine sulfoxide reductase in *Saccharomyces cerevisiae* and human T cells provides them with high resistance to oxidative stress. *PNAS* 95, 14071–14075.
- Moskovitz, J., Rahman, M.A., Strassman, J., Yancey, S.O., Kushner, S.R., Brot, N., Weissbach, H., 1995. *Escherichia coli* peptide methionine sulfoxide reductase gene: regulation of expression and role in protecting against oxidative damage. *Journal of Bacteriology* 177, 502–507.
- Muñoz-Pinedo, C., Guío-Carrión, A., Goldstein, J.C., Fitzgerald, P., Newmeyer, D.D., Green, D.R., 2006. Different mitochondrial intermembrane space proteins are released during apoptosis in a manner that is coordinately initiated but can vary in duration. *PNAS* 103, 11573–11578.
- Naudí, A., Caro, P., Jové, M., Gómez, J., Boada, J., Ayala, V., Portero-Otín, M., Barja, G., Pamplona, R., 2007. Methionine restriction decreases endogenous oxidative molecular damage and increases mitochondrial biogenesis and uncoupling protein 4 in rat brain. *Rejuvenation research* 10, 473–484.
- Neupert, W., Herrmann, J.M., 2007. Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 723–749.
- Niculescu, M.D., Zeisel, S.H., 2002. Diet, Methyl Donors and DNA Methylation: Interactions between Dietary Folate, Methionine and Choline. *J Nutr* 132, 2333S–2335S.
- Novikoff, A.B., Beaufay, H., de Duve, C., 1956. Electron microscopy of lysosome-rich fractions from rat liver. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 2, 179.
- Ooi, H.K., Ma, L., 2013. Modeling heterogeneous responsiveness of intrinsic apoptosis pathway. *BMC Syst Biol* 7, 65.
- Orrenius, S., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., 2015. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications, Ca and Metabolism- A Tribute to Dr. Ernesto Carafoli* 460, 72–81.
- Palade, G.E., 1953. An electron microscope study of the mitochondrial structure. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1, 188–211.
- Palmieri, F., 2004. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 447, 689–709.

- Panserat, S., Kaushik, S., Médale, F., 2013. Rainbow trout as a model for nutrition and nutrient metabolism studies. *Trout: from physiology to conservation*. Nova Science Publishers 131–153.
- Panserat, S., Marandel, L., Seiliez, I., Skiba-Cassy, S., 2019. New Insights on Intermediary Metabolism for a Better Understanding of Nutrition in Teleosts. *Annual Review of Animal Biosciences* 7, null.
- Parzych, K.R., Klionsky, D.J., 2014. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 460–473.
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., Piemonte, F., 2003. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta* 333, 19–39.
- Patterson, R.E., Kalavalapalli, S., Williams, C.M., Nautiyal, M., Mathew, J.T., Martinez, J., Reinhard, M.K., McDougall, D.J., Rocca, J.R., Yost, R.A., Cusi, K., Garrett, T.J., Sunny, N.E., 2016. Lipotoxicity in steatohepatitis occurs despite an increase in tricarboxylic acid cycle activity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 310, E484–E494.
- Pessayre, D., 2007. Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of gastroenterology and hepatology* 22, S20–S27.
- Pessayre, D., Fromenty, B., 2005. NASH: a mitochondrial disease. *Journal of hepatology* 42, 928–940.
- Pfaffenbach, K.T., Lee, A.S., 2011. The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress. *Current Opinion in Cell Biology, Cell regulation* 23, 150–156.
- Pickles, S., Vigié, P., Youle, R.J., 2018. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Current Biology* 28, R170–R185.
- Pires Da Silva, J., Monceaux, K., Prola, A., Ventura-Clapier, R., Garnier, A., Lemaire, C., 2018. Mitophagy induced by endoplasmic reticulum stress in heart is modulated by the sirtuin 1. *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements* 10, 245–246.
- Prod'homme, M., Rieu, I., Balage, M., Dardevet, D., Grizard, J., 2004. Insulin and amino acids both strongly participate to the regulation of protein metabolism. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 7, 71–77.
- Pryde, K.R., Hirst, J., 2011. Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: a single, unified mechanism that applies during both forward and reverse electron transfer. *J. Biol. Chem.* 286, 18056–18065.
- Purohit, N.K., Robu, M., Shah, R.G., Geacintov, N.E., Shah, G.M., 2016. Characterization of the interactions of PARP-1 with UV-damaged DNA in vivo and in vitro. *Sci Rep* 6.
- Quinlan, C.L., Orr, A.L., Perevoshchikova, I.V., Treberg, J.R., Ackrell, B.A., Brand, M.D., 2012. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *Journal of Biological Chemistry* 287, 27255–27264.
- Rabanal-Ruiz, Y., Korolchuk, V.I., 2018. mTORC1 and Nutrient Homeostasis: The Central Role of the Lysosome. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 818.

- Radi, R., Turrens, J.F., Chang, L.Y., Bush, K.M., Crapo, J.D., Freeman, B.A., 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 266, 22028–22034.
- Redmann, M., Benavides, G.A., Berryhill, T.F., Wani, W.Y., Ouyang, X., Johnson, M.S., Ravi, S., Barnes, S., Darley-USmar, V.M., Zhang, J., 2017. Inhibition of autophagy with bafilomycin and chloroquine decreases mitochondrial quality and bioenergetic function in primary neurons. *Redox Biology* 11, 73–81.
- Reynolds, C.M., O'Sullivan, J.M., Segovia, S.A., Vickers, M.H., 2018. Chapter 10 - Early-Life Nutrition, Epigenetics, and Altered Energy Balance Later in Life, in: Moskalev, A., Vaiserman, A.M. (Eds.), *Epigenetics of Aging and Longevity*, Translational Epigenetics. Academic Press, Boston, pp. 213–227.
- Rodehutsord, M., Becker, A., Pack, M., Pfeffer, E., 1997. Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to supplements of individual essential amino acids in a semipurified diet, including an estimate of the maintenance requirement for essential amino acids. *The Journal of nutrition* 127, 1166–1175.
- Rottach, A., Leonhardt, H., Spada, F., 2009. DNA methylation-mediated epigenetic control. *Journal of Cellular Biochemistry* 108, 43–51.
- Rowland, A.A., Voeltz, G.K., 2012. Endoplasmic reticulum–mitochondria contacts: function of the junction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13, 607–625.
- Rumsey, G.L., Page, J.W., Scott, M.L., 1983. Methionine and Cystine Requirements of Rainbow Trout. *The Progressive Fish-Culturist* 45, 139–143.
- Rusten, T.E., Stenmark, H., 2009. How do ESCRT proteins control autophagy? *Journal of Cell Science* 122, 2179–2183.
- Saitoh, M., Pullen, N., Brennan, P., Cantrell, D., Dennis, P.B., Thomas, G., 2002. Regulation of an activated S6 kinase 1 variant reveals a novel mammalian target of rapamycin phosphorylation site. *Journal of Biological Chemistry* 277, 20104–20112.
- Salvi, M., Battaglia, V., Brunati, A.M., Rocca, N.L., Tibaldi, E., Pietrangeli, P., Marcocci, L., Mondovì, B., Rossi, C.A., Toninello, A., 2007. Catalase Takes Part in Rat Liver Mitochondria Oxidative Stress Defense. *J. Biol. Chem.* 282, 24407–24415.
- Sanchez-Roman, I., Barja, G., 2013. Regulation of longevity and oxidative stress by nutritional interventions: role of methionine restriction. *Experimental gerontology* 48, 1030–1042.
- Sanchez-Roman, I., Gomez, A., Gomez, J., Suarez, H., Sanchez, C., Naudi, A., Ayala, V., Portero-Otin, M., Lopez-Torres, M., Pamplona, R., Barja, G., 2011. Forty percent methionine restriction lowers DNA methylation, complex I ROS generation, and oxidative damage to mtDNA and mitochondrial proteins in rat heart. *J Bioenerg Biomembr* 43, 699–708.
- Sanyal, A.J., Campbell-Sargent, C., Mirshahi, F., Rizzo, W.B., Contos, M.J., Sterling, R.K., Luketic, V.A., Shiffman, M.L., Clore, J.N., 2001. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 120, 1183–1192.
- Sanz, A., Caro, P., Ayala, V., Portero-Otin, M., Pamplona, R., Barja, G., 2006. Methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical generation and leak as well as oxidative damage to mitochondrial DNA and proteins. *The FASEB Journal* 20, 1064–1073.

- Saotome, M., Safiulina, D., Szabadkai, G., Das, S., Fransson, Å., Aspenstrom, P., Rizzuto, R., Hajnóczky, G., 2008. Bidirectional Ca²⁺-dependent control of mitochondrial dynamics by the Miro GTPase. *PNAS* 105, 20728–20733.
- Sarewicz, M., Borek, A., Cieluch, E., Świerczek, M., Osyczka, A., 2010. Discrimination between two possible reaction sequences that create potential risk of generation of deleterious radicals by cytochrome bc₁: Implications for the mechanism of superoxide production. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1797, 1820–1827.
- Schuler, M.-H., Bartolomeo, F.D., Mårtensson, C.U., Daum, G., Becker, T., 2016. Phosphatidylcholine Affects Inner Membrane Protein Translocases of Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 291, 18718–18729. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.722694>.
- Sebastián, D., Hernández-Alvarez, M.I., Segalés, J., Sorianello, E., Muñoz, J.P., Sala, D., Waget, A., Liesa, M., Paz, J.C., Gopalacharyulu, P., Orešić, M., Pich, S., Burcelin, R., Palacín, M., Zorzano, A., 2012. Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *PNAS* 201108220.
- Seiliez, I., Vélez, E.J., Lutfi, E., Dias, K., Plagnes-Juan, E., Marandel, L., Panserat, S., Geurden, I., Skiba-Cassy, S., 2017. Eating for two: Consequences of parental methionine nutrition on offspring metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 471, 80–91.
- Senft, D., Ronai, Z.A., 2015. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends in Biochemical Sciences* 40, 141–148.
- Shi, X., Hong, T., Walter, K.L., Ewalt, M., Michishita, E., Hung, T., Carney, D., Peña, P., Lan, F., Kaadige, M.R., Lacoste, N., Cayrou, C., Davrazou, F., Saha, A., Cairns, B.R., Ayer, D.E., Kutateladze, T.G., Shi, Y., Côté, J., Chua, K.F., Gozani, O., 2006. ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* 442, 96–99.
- Shi, Yujiang, Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., Shi, Yang, 2004. Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1. *Cell* 119, 941–953.
- Shimobayashi, M., Hall, M.N., 2016. Multiple amino acid sensing inputs to mTORC1. *Cell research* 26, 7.
- Skiba-Cassy, S., Geurden, I., Panserat, S., Seiliez, I., 2016. Dietary methionine imbalance alters the transcriptional regulation of genes involved in glucose, lipid and amino acid metabolism in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 454, 56–65.
- Sobaniec-Lotowska, M.E., Lebensztejn, D.M., 2003. Ultrastructure of hepatocyte mitochondria in nonalcoholic steatohepatitis in pediatric patients: usefulness of electron microscopy in the diagnosis of the disease. *The American journal of gastroenterology* 98, 1664.
- Sperka-Gottlieb, C.D., Hermetter, A., Paltauf, F., Daum, G., 1988. Lipid topology and physical properties of the outer mitochondrial membrane of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 946, 227–234.

- Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K., Brewer, J.W., 2004. XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology* 167, 35–41.
- Stark, R., Kibbey, R.G., 2014. The mitochondrial isoform of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) and glucose homeostasis: Has it been overlooked? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, Frontiers of Mitochondrial Research* 1840, 1313–1330.
- Stein, R., Razin, A., Cedar, H., 1982. In vitro methylation of the hamster adenine phosphoribosyltransferase gene inhibits its expression in mouse L cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79, 3418–3422.
- Stolz, A., Ernst, A., Dikic, I., 2014. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nature Cell Biology* 16, 495–501.
- Stone, S.J., Vance, J.E., 2000. Phosphatidylserine synthase-1 and-2 are localized to mitochondria-associated membranes. *Journal of Biological Chemistry*.
- Suzuki, Takeo, Suzuki, Tsutomu, Wada, T., Saigo, K., Watanabe, K., 2002. Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases. *The EMBO Journal* 21, 6581–6589.
- Sveier, H., Nordas, H., Berge, G., Lied, E., 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.
- Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M., Samali, A., 2006. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports* 7, 880–885.
- Szymański, J., Janikiewicz, J., Michalska, B., Patalas-Krawczyk, P., Perrone, M., Ziółkowski, W., Duszyński, J., Pinton, P., Dobrzyń, A., Więckowski, M.R., 2017. Interaction of Mitochondria with the Endoplasmic Reticulum and Plasma Membrane in Calcium Homeostasis, Lipid Trafficking and Mitochondrial Structure. *Int J Mol Sci* 18.
- Taguchi, N., Ishihara, N., Jofuku, A., Oka, T., Mihara, K., 2007. Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *Journal of Biological Chemistry*.
- Tanaka, A., Cleland, M.M., Xu, S., Narendra, D.P., Suen, D.-F., Karbowski, M., Youle, R.J., 2010. Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *The Journal of Cell Biology* jcb.201007013.
- Tatsuta, T., Scharwey, M., Langer, T., 2014. Mitochondrial lipid trafficking. *Trends in Cell Biology, Special Issue: Membrane Trafficking* 24, 44–52.
- Teplova, V.V., Tonshin, A.A., Grigoriev, P.A., Saris, N.-E.L., Salkinoja-Salonen, M.S., 2007. Bafilomycin A1 is a potassium ionophore that impairs mitochondrial functions. *J Bioenerg Biomembr* 39, 321.
- Theurey, P., Rieusset, J., 2017. Mitochondria-Associated Membranes Response to Nutrient Availability and Role in Metabolic Diseases. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 28, 32–45.

- Tonazzi, A., Mantovani, C., Colella, M., Terenghi, G., Indiveri, C., 2013. Localization of Mitochondrial Carnitine/Acylcarnitine Translocase in Sensory Neurons from Rat Dorsal Root Ganglia. *Neurochem Res* 38, 2535–2541.
- Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* 552, 335–344.
- Tacon, A.G., Metian, M., 2008. Aquaculture feed and food safety. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1140, 50–59.
- Tang, X., Keenan, M.M., Wu, J., Lin, C.-A., Dubois, L., Thompson, J.W., Freedland, S.J., Murphy, S.K., Chi, J.-T., 2015. Comprehensive profiling of amino acid response uncovers unique methionine-deprived response dependent on intact creatine biosynthesis. *PLoS genetics* 11, e1005158.
- Taoka, S., Ohja, S., Shan, X., Kruger, W.D., Banerjee, R., 1998. Evidence for Heme-mediated Redox Regulation of Human Cystathionine β -Synthase Activity. *J. Biol. Chem.* 273, 25179–25184.
- Vagner, M., Infante, J.Z., Robin, J.H., Person-Le Ruyet, J., 2007. Is it possible to influence European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juvenile metabolism by a nutritional conditioning during larval stage? *Aquaculture* 267, 165–174.
- Vance, J.E., 2014. MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: Lipids and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1841, 595–609.
- Vance, J.E., 1990. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 265, 7248–7256.
- Vance, J.E., Tasseva, G., 2013. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, Phospholipids and phospholipid metabolism* 1831, 543–554.
- Vardimon, L., Kressmann, A., Cedar, H., Maechler, M., Doerfler, W., 1982. Expression of a cloned adenovirus gene is inhibited by in vitro methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79, 1073–1077.
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A., Veksler, V., 2008. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α . *Cardiovasc Res* 79, 208–217.
- Veron, V., Marandel, L., Liu, J., Vélez, E.J., Lepais, O., Panserat, S., Skiba, S., Seiliez, I., 2018. DNA methylation of the promoter region of *bnip3* and *bnip3l* genes induced by metabolic programming. *BMC genomics* 19, 677.
- Vickers, M.H., 2014. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. *Nutrients* 6, 2165–2178.
- Vigié, P., Camougrand, N., 2017. Mitophagie et contrôle qualité des mitochondries. *Med Sci (Paris)* 33, 231–237.
- Violante, S., IJlst, L., van Lenthe, H., de Almeida, I.T., Wanders, R.J., Ventura, F.V., 2010. Carnitine palmitoyltransferase 2: New insights on the substrate specificity and implications for

- acylcarnitine profiling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1802, 728–732.
- Wagner, M., Moore, D.D., 2011. Endoplasmic reticulum stress and glucose homeostasis. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 14, 367–373.
- Wai, T., Langer, T., 2016. Mitochondrial dynamics and metabolic regulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 27, 105–117.
- Wanders, D., Stone, K.P., Forney, L.A., Cortez, C.C., Dille, K.N., Simon, J., Xu, M., Hotard, E.C., Nikonorova, I.A., Pettit, A.P., Anthony, T.G., Gettys, T.W., 2016. Role of GCN2-Independent Signaling Through a Noncanonical PERK/NRF2 Pathway in the Physiological Responses to Dietary Methionine Restriction. *Diabetes* 65, 1499–1510.
- Wang, J., Han, S.-L., Li, L.-Y., Lu, D.-L., Limbu, S.M., Li, D.-L., Zhang, M.-L., Du, Z.-Y., 2018. Lipophagy is essential for lipid metabolism in fish. *Science Bulletin* 63, 879–882.
- Wang, S., Tsun, Z.-Y., Wolfson, R.L., Shen, K., Wyant, G.A., Plovanich, M.E., Yuan, E.D., Jones, T.D., Chantranupong, L., Comb, W., Wang, T., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Straub, C., Kim, C., Park, J., Sabatini, B.L., Sabatini, D.M., 2015. Lysosomal amino acid transporter SLC38A9 signals arginine sufficiency to mTORC1. *Science* 347, 188–194.
- Wang, Z., Mai, K., Xu, W., Zhang, Y., Liu, Y., Ai, Q., 2016. Dietary methionine level influences growth and lipid metabolism via GCN2 pathway in cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* 454, 148–156.
- Warskulat, U., Borsch, E., Reinehr, R., Heller-Stilb, B., Mönnighoff, I., Buchczyk, D., Donner, M., Flögel, U., Kappert, G., Soboll, S., Beer, S., Pfeffer, K., Marschall, H.-U., Gabrielsen, M., Amiry-Moghaddam, M., Ottersen, O.P., Dienes, H.P., Häussinger, D., 2006. Chronic liver disease is triggered by taurine transporter knockout in the mouse. *The FASEB Journal*.
- Waterland, R.A., 2006. Assessing the Effects of High Methionine Intake on DNA Methylation. *J Nutr* 136, 1706S-1710S.
- Wei, Y., Rector, R.S., Thyfault, J.P., Ibdah, J.A., 2008. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol* 14, 193–199.
- Westermann, B., 2010. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 872–884.
- Wolfson, R.L., Chantranupong, L., Saxton, R.A., Shen, K., Scaria, S.M., Cantor, J.R., Sabatini, D.M., 2016. Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway. *Science* 351, 43–48.
- Wu, J.J., Quijano, C., Chen, E., Liu, H., Cao, L., Fergusson, M.M., Rovira, I.I., Gutkind, S., Daniels, M.P., Komatsu, M., Finkel, T., 2009. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress mediate the physiological impairment induced by the disruption of autophagy. *Aging (Albany NY)* 1, 425–437.
- Wu, P., Tang, L., Jiang, W., Hu, K., Liu, Y., Jiang, J., Kuang, S., Tang, L., Tang, W., Zhang, Y., Zhou, X., Feng, L., 2017. The relationship between dietary methionine and growth, digestion, absorption, and antioxidant status in intestinal and hepatopancreatic tissues of sub-adult grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *J Anim Sci Biotechnol* 8, 63.

- Wu, W., Tian, W., Hu, Z., Chen, G., Huang, L., Li, W., Zhang, X., Xue, P., Zhou, C., Liu, L., 2014. ULK1 translocates to mitochondria and phosphorylates FUNDC1 to regulate mitophagy. *EMBO reports* e201438501.
- Wu, S.C., Zhang, Y., 2010. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 607.
- Xiao, B., Goh, J.-Y., Xiao, L., Xian, H., Lim, K.-L., Liou, Y.-C., 2017. Reactive oxygen species trigger Parkin/PINK1 pathway-dependent mitophagy by inducing mitochondrial recruitment of Parkin. *Journal of Biological Chemistry* 292, 16697–16708.
- Xiao, F., Huang, Z., Li, H., Yu, J., Wang, C., Chen, S., Meng, Q., Cheng, Y., Gao, X., Li, J., 2011. Leucine deprivation increases hepatic insulin sensitivity via GCN2/mTOR/S6K1 and AMPK pathways. *Diabetes* DB_101246.
- Xu, W., Liu, L., Charles, I.G., Moncada, S., 2004. Nitric oxide induces coupling of mitochondrial signalling with the endoplasmic reticulum stress response. *Nature Cell Biology* 6, 1129–1134.
- Yamano, K., Youle, R.J., 2013. PINK1 is degraded through the N-end rule pathway. *Autophagy* 9, 1758–1769.
- Yang, L., Li, P., Fu, S., Calay, E.S., Hotamisligil, G.S., 2010. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell metabolism* 11, 467–478.
- Yang, M., Vousden, K.H., 2016. Serine and one-carbon metabolism in cancer. *Nature Reviews Cancer* 16, 650–662.
- Yang, Z., Klionsky, D.J., 2010. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nature cell biology* 12, 814.
- Yin, J., Ren, W., Chen, S., Li, Y., Han, H., Gao, J., Liu, G., Wu, X., Li, T., Kim, S.W., Yin, Y., 2018. Metabolic Regulation of Methionine Restriction in Diabetes. *Molecular Nutrition & Food Research* 62, 1700951.
- Ying, Y., Yun, J., Guoyao, W., Kaiji, S., Zhaolai, D., Zhenlong, W., 2015. Dietary l-methionine restriction decreases oxidative stress in porcine liver mitochondria. *Experimental gerontology* 65, 35–41.
- Youle, R.J., Narendra, D.P., 2011. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 9–14.
- Yu, X., Long, Y.C., 2014. Autophagy modulates amino acid signaling network in myotubes: differential effects on mTORC1 pathway and the integrated stress response. *The FASEB Journal* 29, 394–407.
- Yuan, N., Song, L., Zhang, S., Lin, W., Cao, Y., Xu, F., Fang, Y., Wang, Zhen, Zhang, H., Li, X., Wang, Zhijian, Cai, J., Wang, Jian, Zhang, Y., Mao, X., Zhao, W., Hu, S., Chen, S., Wang, Jianrong, 2015. Bafilomycin A1 targets both autophagy and apoptosis pathways in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 100, 345–356.
- Zhang, X., Yuan, Y., Jiang, L., Zhang, J., Gao, J., Shen, Z., Zheng, Y., Deng, T., Yan, H., Li, W., Hou, W.-W., Lu, J., Shen, Y., Dai, H., Hu, W.-W., Zhang, Z., Chen, Z., 2014. Endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin and thapsigargin protects against transient ischemic brain injury. *Autophagy* 10, 1801–1813.

- Zhdanov, A.V., Dmitriev, R.I., Papkovsky, D.B., 2011. Bafilomycin A1 activates respiration of neuronal cells via uncoupling associated with flickering depolarization of mitochondria. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 903–917.
- Zhu, J.-K., 2009. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annual review of genetics* 43, 143–166.
- Zinser, E., Sperka-Gottlieb, C.D., Fasch, E.-V., Kohlwein, S.D., Paltauf, F., Daum, G., 1991. Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* 173, 2026–2034.



There is more to methionine than growth

by Sarah Séité and Karthik Masagounder,
Evonik and Stéphane Panserat and Iban Seilliez,
University of Pau and Pays de l'Adour, France

The sustainability of the aquaculture industry depends on how efficient we are in using available resources to supply an increasing population with affordable and nutritious protein. Put simply, we need to produce more and better, with less.

There is, therefore, an important opportunity for industry and academia to work together on the specifications of fish feed formulas that cost-efficiently optimise the nutrition and health of fish throughout their entire production cycle, for example, using methionine.

Changing diets

Modern aquaculture diets are produced with low or no fish meal and higher amounts of plant protein sources. This change in diet formulations results in methionine being typically the first limiting amino acid – one that is in insufficient amounts in a food – in the fish and shrimp diets.

Methionine has a central role as a building block in protein

synthesis, along with several other functions. Recent research shows it to be a key regulator of antioxidant defence, immune response, overall fish health status and carbohydrate and lipid metabolism. Additionally, as a precursor of S-adenosylmethionine (SAM) and S-adenosylhomocysteine (SAH), methionine can modulate the expression of genes related to the growth and health of animals by DNA methylation reactions.

Protein turnover

Inside the body of fish and shrimp, protein mass gain is the net gain of body protein deposition over protein loss, under the biological process called 'protein turnover'. This is a continuous process in all tissues, involving both protein synthesis and protein breakdown (proteolysis).

Protein turnover is affected by the nutritional composition of the diet and the nutritional status of animals. For a growing animal, it is important to keep the diet balanced for amino acids, while providing enough energy from non-protein energy sources.

Commercial feed producers have found that supplementing methionine levels in aqua feed results in better animal production. Recent studies in fish have demonstrated that methionine

deficiency modulates a key intracellular signalling pathway, resulting in increased expression of several genes involved in protein degradation and inhibition of protein synthesis.

For example, a methionine-deficient diet (formulated to supply 32 percent less methionine than the normal diet) in rainbow trout (40g, initial body weight) was demonstrated to affect the phosphorylation of translation initiation factor (eif2 α), and induce the expression of several factors involved in the two major muscle proteolytic pathways (proteasome and autophagy).

Overall, recent studies have improved our understanding of the role of methionine in fish growth at cellular level. This has provided important biomarkers to assess fish performance in methionine deficient diet.

Oxidative stress

Intensive farming is becoming more common to meet the growing demand for global fish consumption. Under this method, animals are often exposed to various biotics (e.g. high stocking density, pathogen exposure) and abiotics (e.g. poor water quality, transportation, imbalanced diet) stressors.

These lead to constant production of reactive oxygen species (ROS). ROS are basically chemical substances containing oxygen (e.g. superoxide, hydrogen peroxide, hydroxy radicals) and give rise to reactive free radicals (molecules with unpaired electrons). These free radicals participate in oxidative reactions that damage biological molecules such as lipids, proteins and the DNA of animals. Animals undergo oxidative stress when they don't have the capacity to detoxify the free radicals or to repair the resulting damage.

Methionine is an essential compound for host defence against oxidative stress. It assists in the formation of glutathione (GSH) and taurine; essential compounds for host defence against oxidative stress. Methionine is also easily oxidised by ROS, forming methionine sulphoxide, which can readily be repaired by methionine sulphoxide reductase. It therefore constitutes an important antioxidant defence mechanism that may play a role in redox signalling; a form of cellular communication.

Several studies have shown that dietary methionine deficiency may reduce reservoirs


ANDRITZ

Your global technology process supplier for the aqua feed industry



ANDRITZ is one of the world's leading suppliers of technologies, systems, and services relating to advanced industrial equipment for the aqua feed industry. With an in-depth knowledge of each key process, we can supply a compatible and homogeneous solution from raw material intake to finished feed bagging.

ANDRITZ Feed & Biofuel A/S

Europe, Asia, and South America: andritz-fb@andritz.com

USA and Canada: andritz-fb.us@andritz.com

www.andritz.com/ft

of GSH, the most important intracellular antioxidant, and thus, increase oxidative damages in several tissues. Yellow catfish fed a methionine deficient diet (formulated to supply 37 percent less methionine than the normal diet) displayed peroxidative damage by ROS, accompanied by an increase in antioxidant enzyme activities (SOD and GPX), indicating methionine deficient diet causing oxidative stress in the yellow catfish.

In contrast, a previous study showed that dietary methionine restriction (formulated to supply 45 percent less methionine than the control) does not affect the amount of total glutathione in the liver tissue of juvenile salmon under laboratory conditions.

Research has also demonstrated that dietary methionine deficiency (formulated to supply 55 percent less methionine than the control), decreased of the oxidative status in the liver of rainbow trout. This indicates that the negative effects of methionine deficiency on the oxidative status of fish depend on the factors, including level of methionine deficiency, in relation to the need of animal and the level of oxidative stress. Factors, including the life stage of fish, production intensity and growing conditions can all influence oxidative stress. Under intensive farming conditions, where animals are prone to oxidative stress, the methionine requirements of fish and shrimp can be higher than the values determined under favourable laboratory conditions.

Immune response

Deficiency of certain amino acids has been known to impair immune function and increase the susceptibility of animals to infectious disease. Amino acids affect the immune response of an animal, either directly or indirectly, through their metabolites.

Dietary methionine deficiency has been shown to decrease innate immune response and thus the protection against the infection of bacteria (*A. hydrophila*) in juvenile yellow catfish.

In addition, during infection or inflammation, fish fed the methionine-supplemented diet are better protected against micro-organisms (such as bacteria) and bactericidal activities. This response might be due to the role of methionine on cell proliferation.

Intermediary metabolism

The liver is the main site for intermediary metabolism (including, lipids and carbohydrate metabolism). Hepatic expression of genes involved in lipogenesis and gluconeogenesis have been shown to respond to dietary methionine imbalances in fish. These disturbances are also reflected in fish at the phenotype level. When salmonids were fed low-methionine diets, hepatic triglyceride (TAG) accumulation was recorded. It is believed that liver TAG accumulation, following low methionine diets, is due to the reduced availability of phosphatidylcholine involved in the transport of lipids from the liver to the peripheral organs.

Phosphatidylcholine is synthesised from phosphatidylethanolamine, where SAM, produced from methionine, acts as an important methyl donor. Therefore, methionine deficiency can affect the endogenous synthesis of phosphatidylcholine.

Another hypothesis is that methionine deficiency can decrease the availability of taurine, which is an important precursor in the synthesis of bile salt (taurocholic acid). Bile salt is highly important in the digestion and absorption of fat and fat-soluble vitamins.

In addition, bile acid synthesis is the major route of cholesterol metabolism, as about half of the cholesterol produced in the body is used for bile acid synthesis. Overall, methionine has important roles in the proper intermediary metabolism of nutrients, and

long-term deficiency of methionine may be detrimental to fish growth and health.

Nutritional programming

Early nutritional events exerted during critical developmental windows may result in permanent changes in the later life of animals, namely affecting their growth potential, health and metabolic status. Those events are the results of the so-called nutritional programming and open a new field of research and opportunities towards the optimisation of nutrition and health of farmed animals, with obvious economic implications.

Nutritional programming, through epigenetic mechanisms of methylation reactions, such as the DNA and histone methylation, is directly dependent on SAM, and thus of its major precursor: methionine. Dietary methionine levels and their adequacy in meeting animals' requirements at early stages, may therefore constitute a critical factor in modulating animals' phenotype throughout their production cycle.

Recent studies with rainbow trout show that feeding of brood stock with diets limiting methionine at 50 percent affect various traits in the offspring, some of which persisted during the first weeks of exogenous feeding. Whether epigenetic mechanisms are behind those effects, requires further investigation.

Overall health

Methionine deficiency can have different impacts on overall health. For example, methionine deficiency can lead to the development of cataracts in several fish species, e.g. rainbow trout, hybrid striped bass and Arctic charr. Although the mechanism behind this is not well understood, it is thought that glutathione synthesised endogenously from methionine or cysteine, is likely to play a role in preventing the formation of disulphide bonds which lead to the insolubility of lens protein and the development of ocular opacity.

Moreover, methionine has been shown to play a role in gut health in jian carp. Microbial populations in the digestive tract of fish (such as Firmicutes) have been shown to be closely correlated to fish health and nutrition.

Bacteria of the fish digestive tract could secrete digestive enzymes, which promote digestion of nutrient substances and synthesise nutrient substance that the fish need. It has also been demonstrated that methionine could influence the balance of intestinal microflora by promoting the growth of beneficial bacterium and depressing the growth of harmful bacterium.

Changing the way we look at methionine nutrition and fish health

Considering the number of metabolic pathways requiring methionine and/or its derivatives, it is not surprising that dietary methionine not only affects growth but also metabolism and the overall health status of fish.

Evidence of the functional role played by methionine in fish is growing and suggests we need to change the way we look at methionine nutrition and the health of fish. It has been proven that the first-feeding stage in fish is a critical window for nutritional programming and that there is a positive impact of the early-feeding of a plant-based diet on its future acceptance and utilisation.

Working together, industry and academia need to establish whether it is possible to programme the future growth and health of farmed fish through optimised nutrition. And, if so, the response criteria that should be (re)considered to define methionine (nutrient) recommendations that best optimised nutrition and health of fish.

corporate.evonik.com

RESUMÉ : ROLES DE LA METHIONINE SUR LE METABOLISME HEPATIQUE DE LA TRUITE ARC-EN-CIEL
(*Oncorhynchus mykiss*): FOCUS SUR LES MITOCHONDRIES

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. Toutefois, ce remplacement est souvent limité par des niveaux trop faibles en méthionine dans les matières premières végétales. Ainsi la supplémentation en méthionine de ces nouveaux régimes à base de végétaux est essentielle, mais requiert une bonne connaissance de son rôle pour adapter les apports aux conditions physiologiques des poissons tout en prenant en compte les contraintes économiques et environnementales de production. **Dans ce contexte, cette thèse avait pour principal objectif de caractériser les effets induits par une carence en méthionine sur le métabolisme mitochondrial de la truite arc en ciel.** Les résultats obtenus dans notre première étude montrent que l'alimentation de truites avec un régime déficient en méthionine entraîne une baisse des performances de croissance associée à une baisse de l'intégrité mitochondriale et une diminution du statut oxydatif dans le foie. Nous démontrons également que ces perturbations s'accompagnent de l'induction d'un processus de dégradation des mitochondries par autophagie (appelé mitophagie) ainsi que d'une augmentation du stress du Réticulum Endoplasmique (RE) et de l'apoptose. Ces données originales publiées dans le journal *Scientific Reports* mettent ainsi en évidence les liens étroits qui existent entre différentes fonctions cellulaires pour faire face à un déséquilibre nutritionnel en méthionine. Outre cet effet à court terme, nous démontrons également, dans une seconde étude, qu'une carence en méthionine alimentaire pendant une courte période (2 semaines) lors des premiers repas des alevins entraîne une induction à long terme de facteurs liés à la mitophagie. Ces résultats, soumis à publication dans *Journal of Experimental Biology*, démontrent ainsi pour la première fois la mise en place d'un processus de programmation de cette fonction cellulaire par une carence précoce en méthionine. L'enrichissement en H3K4me3 et H3K36me3 des foies des poissons issus d'alevins carencés en méthionine par rapport aux poissons témoins suggère une implication de mécanismes épigénétiques dans ces effets. Enfin, dans une troisième étude qui se détache de la thématique principale de la thèse et qui a fait l'objet d'une publication dans le journal *Frontiers in Physiology*, nous nous sommes attachés à préciser les interactions existantes entre l'autophagie, l'homéostasie du RE et le métabolisme intermédiaire. Dans l'ensemble, ces données approfondissent notre compréhension du rôle de la méthionine alimentaire au niveau cellulaire et soulignent le potentiel de cet acide aminé en tant que levier pour appliquer de nouvelles stratégies alimentaires, comme la programmation nutritionnelle, afin d'optimiser la nutrition et la santé des poissons d'élevage.

ABSTRACT: ROLES OF METHIONINE ON HEPATIC METABOLISM OF RAINBOW TROUT
(*Oncorhynchus mykiss*): FOCUS ON MITOCHONDRIA

The expansion of the aquaculture industry in combination with limited availability and high prices of fishmeal has prompted feed producers to include more plant proteins in the aquaculture feeds. However, replacement of fish meal with plant proteins is often limited by the level of methionine in the alternative plant protein sources. Understanding of the different roles of methionine in fish is therefore essential to develop new diets and/or feeding strategies that are in tune with optimal fish growth, environmental and economic constraints. **In this context, the main objective of this thesis was to characterize the effects induced by methionine deficiency on the hepatic mitochondrial metabolism in rainbow trout.** The results obtained in our first study show that feeding trout with a methionine deficient diet leads to a decrease in growth performance associated with a decrease in both mitochondrial integrity and oxidative stress in the liver. We also demonstrate that these defects are accompanied by the induction of an autophagy-dependent mitochondrial degradation process (called mitophagy) as well as an increase in Endoplasmic Reticulum (ER)-stress and apoptosis. These original data published in *Scientific Reports* thus highlight the existence of close interactions between different cellular functions to cope to a dietary methionine deficiency. In addition to this short-term effect, we also demonstrate in a second study (submitted for publication in the *Journal of Experimental Biology*), that early nutritional stimulus during two weeks with a methionine deficient diet resulted in a long term programming of mitophagy. The enrichment of H3K4me3 and H3K36me3 in the liver of fish from methionine-deficient fry compared to their control counterparts suggests that epigenetic mechanisms are involved in these effects. Finally, in a third and last study, recently accepted for publication in *Frontiers in Physiology*, we sought to clarify, in primary culture of trout hepatocytes, the existing interactions between autophagy, ER homeostasis and intermediate metabolism under amino acid deprived conditions. Together, the results obtained in the present thesis extended our understanding of the role of dietary methionine at cellular level and emphasize the potential of this amino acid to apply new feeding strategies, such as nutritional programming, to optimize the nutrition and health of farmed fish.