

N° d'ordre : 4069

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par Mlle Marine LANSARD

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : SCIENCES DES ALIMENTS ET NUTRITION

**ROLE DES ACIDES AMINES DANS LA REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES
HEPATIQUES DU METABOLISME INTERMEDIAIRE CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL
(*Oncorhynchus mykiss*)**

Soutenue le 30 Septembre 2010

Après avis de :

Mme Sophie TESSERAUD, Directrice de Recherches, INRA
Mr Pierre FAFOURNOUX, Directeur de Recherches, CNRS

Rapporteurs

Devant la commission d'examen formée de :

Mr Paul HIGUERET, Professeur Université de Bordeaux 1
Mme Dalila AZZOUT-MARNICHE, Maître de Conférences, Agroparistech
Mr Benoît FAUCONNEAU, Directeur de Recherches, INRA
Mr Jean-Charles GABILLARD, Chargé de Recherches, INRA
Mr Stéphane PANSERAT, Directeur de Recherches, INRA
Mme Sandrine SKIBA, Chargée de Recherches, INRA

**Président
Examineurs**

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été financé par le projet européen AQUAMAX. Il a été réalisé à l'INRA de Saint Pée-sur-Nivelle au sein de l'unité NuAGe dirigée par Sachi Kaushik puis par Françoise Médale que je remercie vivement pour leur accueil au sein du laboratoire.

Je remercie sincèrement le Professeur Paul Higuere, Sophie Tesseraud et Pierre Fafournoux ainsi que Dalila Azzout-Marniche, Benoit Fauconneau et Jean-Charles Gabillard qui ont accepté respectivement d'être président, rapporteurs et examinateurs de cette thèse.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse, Stéphane Panserat, pour la qualité de son encadrement scientifique et le partage de ses connaissances. Je souhaite aussi le remercier pour sa grande disponibilité, ses conseils et son soutien au quotidien.

Je remercie également très sincèrement, Sandrine Skiba, responsable scientifique de cette thèse, pour sa confiance, son dynamisme, ses conseils et son aide précieuse tout au long de ces années. Je la remercie de m'avoir accueillie dans son bureau me permettant ainsi de pouvoir rédiger cette thèse dans de bonnes conditions.

Un très grand merci à Elisabeth Plagnes-Juan qui, avec patience et enthousiasme, m'a initié à la culture cellulaire. Je la remercie aussi pour son aide et ses conseils en biologie moléculaire ainsi que pour son soutien et son écoute. Travailler avec Elisabeth a été un réel plaisir.

Je remercie aussi Iban Seilliez pour nos échanges concernant les manips et les résultats, ses conseils et sa bonne humeur. Je souhaite également remercier Sachi Kaushik et Inge Guerden pour leurs encouragements et la correction de l'anglais de mes articles.

Un merci tout particulier à Mélanie Larquier, Karine Dias et Charline Chauvin pour leur aide dans l'obtention des résultats, leur écoute et les moments de détente.

Je tiens à remercier Christiane Vachot pour son aide lors des prélèvements et dans la réalisation de certains dosages, Frédéric Terrier, Franck Sandres et Yves Hontang de la pisciculture de Donzacq ainsi que Peyo Aguirre et Yvan Mercier d'avoir patiemment pris soin de mes précieuses petites truites. Je remercie également Philippe Laborde de s'être occupé

de nombreuses fois d'un autre type de petites bêtes bien plus méchantes ayant infecté mon ordinateur.

Mes remerciements vont aussi à tous les membres de la station pour leur accueil chaleureux et notamment, Geneviève Corraze, Marie-Christine Artola, Marie-Josée Elissalde, Elisabeth Azcarraga, Maryse Pin, Marie-Josée Borthaire, Laurence Larroquet, Georges Choubert, Didier Bazin, Stéphanie Fontagné, Anne Surget, Pantxo Ostiz et Maïté Jorajuria pour leur soutien et leur sympathie. Un grand merci aussi à tous les étudiants que j'ai pu rencontrer et en particulier à Morgane, Cathy, Lénaïg, Emilie, Sergio, Thomas et Franco.

Enfin, mes profonds remerciements vont vers mes proches, famille et amis. Je tiens à remercier de tout cœur mes parents et mes frères pour leur affection et leur soutien indéfectible d'où qu'ils se trouvent à travers le monde. Une mention toute spéciale à Jérôme qui a accepté de me suivre dans cette aventure jusqu'à Bayonne, m'a soutenue tout au long de ces années et a toujours été présent y compris lors des moments de doute.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Liste des publications dans des journaux internationaux à comité de lecture

Lansard M., Panserat S., Seiliez I., Polakof S., Plagnes-Juan E., Geurden I., Médale F., Kaushik S., Corraze G., Skiba-Cassy S. (2009). Hepatic protein kinase B (Akt)- target of rapamycin (TOR)-signalling pathways and intermediary metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) are not significantly affected by feeding plant-based diets. *British Journal of Nutrition*; 102: 1564-1573

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

Lansard M., Panserat S., Plagnes-Juan E., Dias K., Seiliez I., Skiba-Cassy S. Effect of single amino acid leucine, methionine and lysine on carbohydrate and lipid metabolism-related gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Journal of Nutrition*, sous presse.

Plagnes-Juan E., **Lansard M.**, Seiliez I., Médale F., Corraze G., Kaushik S., Panserat S., Skiba-Cassy S. (2008). Insulin regulates the expression of several metabolism-related genes in the liver and primary hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology*; 211:2510-8.

Skiba-Cassy S, **Lansard M**, Panserat S., Médale F. (2009) Rainbow trout genetically selected for greater muscle fat content display increased activation of liver TOR signaling and lipogenic gene expression. *American Journal of Physiology*: 297: 1421-1429

Panserat S., Hortopan G. A., Plagnes-Juan E., Kolditz C., **Lansard M.**, Skiba-Cassy S., Esquerre D., Geurden I., Médale F., Kaushik S., Corraze, G. (2009) Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Aquaculture* : 294 : 123-131

Panserat, S., Skiba-Cassy, S., Seilliez, I., **Lansard, M.**, Plagnes-Juan, E., Vachot, C., Aguirre, P., Larroquet, L., Chavernac, G., Medale, F., Corraze, G., Kaushik, S., Moon, T. W. (2009) Metformin improves postprandial glucose homeostasis in rainbow trout fed dietary carbohydrates: a link with the induction of hepatic lipogenic capacities?. American Journal of Physiology: 297: 707-715

Liste des communications dans des congrès nationaux et internationaux :

Communication orales :

Lansard M., Panserat S., Seilliez I., Polakof S., Plagnes-Juan E., Geurden I., Médale F., Kaushik S., Corraze G., Skiba-Cassy S. Plant-based diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effect on hepatic insulin-TOR signalling pathways and intermediary metabolism. 13th international symposium on nutrition and feeding in fish. 1st-5th June 2008, Florianopolis, Brazil.

Lansard M., Panserat S., Seilliez I., Plagnes-Juan E., Skiba-Cassy S. Effets des acides aminés sur l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire dans des hépatocytes de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé. Arcachon, France. April 8, 2009.

Lansard M., Panserat S., Seilliez I., Plagnes-Juan E., Skiba-Cassy S. Hepatic Akt-TOR signaling pathway and intermediary metabolism: Regulation in trout fed with plant based diet and assessment of amino acids effect. European research project Aquamax "Sustainable aquafeeds to maximise the health benefits of farmed fish for consumers", Annual meeting. Budapest, Hungary. October 26-28, 2009.

Skiba-Cassy S., Plagnes-Juan E., **Lansard M.**, Seilliez I., Medale F., Corraze G., Kaushik S., Panserat S. (2008) Insulin regulates the expression of several metabolism-related genes in the liver and primary hepatocytes of rainbow trout. 13th international symposium on nutrition and feeding in fish. 1st-5th June, Florianopolis, Brazil.

Communication affichées :

Lansard M., Panserat S., Plagnes-Juan E., Seilliez I., Skiba-Cassy S. Caractérisation de la voie de signalisation de l'insuline dans le foie de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé. Arcachon, France. April 16, 2008.

Lansard M., Panserat S., Plagnes-Juan E., Seilliez I., Skiba-Cassy S. Amino acids regulate hepatic metabolism-related gene expression ». 19th International Congress of Nutrition. Bangkok, Thailand. October 4-9, 2009.

S Skiba-Cassy, **M Lansard**, C Vachot, S Panserat and F Médale (2009) Genetic selection on muscle fat content increased TOR signalling pathway and lipogenic gene expression. 9th International Congress of Nutrition 4th -9th October, Bangkok, Thailand.

Panserat S, Skiba-Cassy S, Seilliez I, **Lansard M**, Plagnes-Juan E, Vachot C, Aguirre P, Larroquet L, Charvegnac G, Medale F, Corraze G, Kaushik S & Moon TW (2009) Metformin improves postprandial glucose homeostasis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed high levels of dietary carbohydrates: a potential link with the induction of hepatic lipogenic capacities? 9th International Congress of Nutrition 4th -9th October, Bangkok, Thailand.

LISTE DES ABREVIATIONS

AAR : Amino acid response
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP : Adénosine diphosphate
Akt/PKB : protein kinase B related to AKR mouse T-cell lymphoma-derived oncogenic product
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ARNm 5'TOP : 5'terminal oligopyrimidine tract
ATP : Adénosine triphosphate
BM : Biomasse
BSA : Serum albumine bovine
C/EBP: CCAAT/enhancer binding protein
CoA : Coenzyme A
cPEPCK : phosphoénol carboxykinase cytosolique
CPT1 : Carnitine palmitoyltransferase 1
EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique
EF1a : Elongation factor 1 a
EGTA: acide éthylène glycol tétraacétique
FAS : Fatty acid synthase
FBPase : Fructose-1,6-bisphosphatase
Foxo : Forkhead transcription factor
G6Pase : Glucose-6-phosphatase
GCN2 : General control non-repressible 2
GK : Glucokinase
Glut : transporteur de glucose
HNF : Hepatic nuclear factor
HK : Hexokinase
IRS : Insuline receptor substrate
kDa : kilo Dalton
MAPK : Mitogen activated protein Kinase
mPEPCK : phosphoénol carboxykinase mitochondriale
MS : Matière sèche
mTOR : Mamalian target of rapamycin
NLS : Nuclear localisation signal
p70S6K : 70 kDa ribosomal protein S6 kinase
PCR : Polymerase chain reaction
PDK-1 : Phosphoinositide-dependent-kinase-1
PEPCK : Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PI3K : Phosphatidylinositol-3'Kinase
PK : Pyruvate kinase
PKC : Protein kinase C
Raptor : regulatory associated protein of mTOR
Rheb : Ras homologue enriched brain
Rictor : Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RNase : Ribonucléase

rpS6 : ribosomal protein S6

RT-PCR : Reverse transcription-PCR

SCAP : SREBP cleavage-activating protein

SDS : Sodium dodécyl sulfate

SDS-PAGE : Sodium dodécyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis

SH2 : Src homology 2

Shc : Src homology and collagen protein

SRE : Sterol response element

SREBP : Sterol regulatory element binding protein

SRI : Séquence de réponse à l'insuline

TOR : Target of rapamycine

TSC1-TSC2 : Tuberous sclerosis complexe 1/2 ou Hémartine/Tubérine

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
PARTIE A : DESCRIPTION DES VOIES DE SIGNALISATION CELLULAIRE DE L'INSULINE ET DES ACIDES AMINES CHEZ LES MAMMIFERES	7
I. L'insuline	7
I.1. Structure et sécrétion de l'insuline	7
I.2. Rôle de l'insuline dans la régulation du métabolisme	11
II. Signalisation de l'insuline	13
II.1. Récepteur de l'insuline	13
II.2. Les protéines IRS	15
II.3. La phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)	21
II.4. La phosphoinositide-dependent-kinase-1 (PDK-1)	24
II.5. Les protéines Kinases C atypiques (PKCa)	25
II.6. La protéine Akt (ou PKB)	26
II.7. Le complexe TSC1/TSC2	29
II.8. Rheb	29
II.9. La protéine kinase TOR, un senseur métabolique	31
II.9.1 TORC1	33
II.9.2. TORC2	34
II.10. Les effecteurs de TORC1	35
II.10.1 Les protéines 4E-BP, régulatrices de l'initiation de la traduction	35
II.10.2. La protéine S6 kinase	36
II.10.3. La protéine ribosomale S6	39
III. Les acides aminés : description et rôles	41
IV. Signalisation des acides aminés	42
IV.1. Acides aminés et activation de la voie de signalisation TOR	43
IV.1.1. Vps34	43
IV.1.2. MAP4K3	45
IV.1.3. Rag GTPases	45
IV.2. Carence en acides aminés et activation de la voie de signalisation impliquant GCN2	47
V. Interaction entre les acides aminés et l'insuline au niveau des voies de signalisation cellulaires.	51
PARTIE B. REGULATION NUTRITIONNELLE DU METABOLISME INTERMEDIAIRE HEPATIQUE : PRESENTATION DES ENZYMES ETUDIEES AU COURS DE LA THESE	53
I. Contrôle nutritionnel du métabolisme intermédiaire	53
I.1. Le foie, centre du métabolisme intermédiaire	53
I.2. Régulation nutritionnelle du métabolisme glucidique : glycolyse/néoglucogenèse	55
I.2.1. La glycolyse	57
I.2.2. La néoglucogenèse	58
I.3. Régulation nutritionnelle de la lipogenèse	63

I.4. Régulation nutritionnelle de la β -oxydation des lipides	65
I.5. Régulation nutritionnelle de deux enzymes du métabolisme protéique : AS et SD	66
II. Effets transcriptionnels de l'insuline sur la régulation des gènes codant les enzymes clés du métabolisme intermédiaire dans le foie	67
II.1 Les facteurs de transcriptions régulés par l'insuline	69
II.1.1. Les protéines FoxO	69
II.1.2. Les protéines SREBP	70
II.2. Exemples de régulation moléculaire par l'insuline	73
II.2.1 Inhibition de la transcription du gène G6Pase par l'insuline	73
II.2.2 Activation de la transcription du gène FAS par l'insuline	75
PARTIE C. LA TRUITE ARC-EN-CIEL : ESPECE MODELE EN NUTRITION (ESPECE « CARNIVORE »)	77
I. Nutrition protéique de la truite : utilisation efficace des acides aminés alimentaires	77
II. Nutrition glucidique de la truite : faible utilisation métabolique du glucose d'origine alimentaire	81
III. Existe-t-il un effet des acides aminés sur la régulation du métabolisme intermédiaire gluco-lipidique pouvant expliquer la faible utilisation des glucides chez la truite?	81
PARTIE D. OBJECTIFS DE LA THESE	82
MATERIELS ET METHODES	83
I. Matériel biologique : truite arc-en-ciel	85
II. Etude in vitro de l'effet des acides aminés sur la régulation des gènes du métabolisme intermédiaire : protocole expérimental de culture primaire d'hépatocytes de truite-arc-en-ciel (Articles 1 et 2)	85
II.1 Dissociation des hépatocytes et mise en culture	85
II.2. Stimulation et récupération des cellules	89
III. Etude de l'effet d'un remplacement conjoint des huiles et farines de poissons par des huiles et protéines végétales dans l'aliment pour truite-arc-en-ciel (Article n°3)	91
III.1. Aliments expérimentaux	91
III.2. Détermination analytique de la composition des aliments	93
III.2.1. Détermination de la matière sèche	93
III.2.2. Détermination de l'énergie brute	93
III.2.3. Détermination des lipides totaux	93
III.2.4. Détermination du taux d'amidon	95
III.2.5. Détermination des protéines brutes	95
III.3. Paramètres zootechniques	97
III.4. Prélèvement des échantillons	97
III.5. Détermination de la concentration en métabolites plasmatiques	98
IV. Analyse de l'expression différentielle des gènes par qRT-PCR	98
IV.1. Extraction des ARN totaux	98
IV.2. RT-PCR quantitative en temps réel	98
IV.2.1. Principe	98
IV.2.2. Choix et validation des amorces	99
IV.2.3. Transcription inverse des ARNm en ADNc	101

IV.2.4. PCR quantitative en temps réel	101
IV.2.5. Traitement des données	103
V. Analyse de la phosphorylation des protéines par Western blot	105
V.1. Extraction des protéines totales	105
V.2. Immunodétection des protéines par Western blot	105
VI. Analyse statistique des données	106
RESULTATS	107
I. Effet de l'insuline et des acides aminés sur la signalisation cellulaire et la régulation de l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire dans des hépatocytes de truite arc-en-ciel (Publication n°1)	111
II. Effets propres de la leucine, de la méthionine et de la lysine sur la régulation de l'expression des gènes des métabolismes glucidique et lipidique dans des hépatocytes de truite arc-en-ciel (Publication n°2)	125
III. Effet du remplacement partiel ou total des huiles et farines de poisson par des produits d'origines végétales dans l'aliment pour truite sur la signalisation cellulaire et l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire (Publication n°3)	131
DISCUSSION GENERALE	139
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	155
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	159
ANNEXES	203

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Evolution de la composition des aliments pour différentes espèces de poissons et crustacés élevés en aquaculture entre 2000 et 2010	2
Figure 2 : Schéma représentatif de la biosynthèse (A) et de la structure (B) de l'insuline	6
Figure 3 : Schéma représentatif du mécanisme de sécrétion de l'insuline par les cellules β du pancréas induit par le glucose	8
Figure 4 : Les différentes fonctions de l'insuline	10
Figure 5 : Représentation schématique des voies de signalisation de l'insuline et des acides aminés.	12
Figure 6 : Structure du récepteur à l'insuline	14
Figure 7 : Structures des quatre isoformes du substrat du récepteur à l'insuline, IRS-1, IRS-2, IRS-3 et IRS-4	16
Figure 8 : Représentation schématique de la structure de mTOR	30
Figure 9 : Représentation schématique de la structure des complexes TORC1 et TORC2	32
Figure 10 : Origine et devenir des acides aminés dans l'organisme	40
Figure 11 : Modèle présentant le rôle du complexe Ragulator – Rag dans l'activation de mTORC1	46
Figure 12 : Voie de réponse aux déficits en acides aminés impliquant la protéine kinase GCN2	48
Figure 13 : Rétrocontrôle négatif des acides aminés sur la voie de signalisation de l'insuline : Phosphorylation d'IRS1 sur résidus sérine par les kinases TOR et S6K1	50
Figure 14 : Représentation schématique des principales voies de contrôle de l'homéostasie glucidique chez les mammifères	54
Figure 15 : Représentation schématique des principales voies de régulation du métabolisme glucidique hépatique : enzymes clés de la glycolyse et de la néoglucogenèse	56
Figure 16 : Représentation schématique des différentes voies impliquées dans la lipogenèse	62
Figure 17 : Schéma représentatif de la voie de la β -oxydation	64
Figure 18 : Représentation schématique des séquences cibles de l'insuline dans le promoteur du gène codant pour la glucose-6-phosphatase (G6Pase)	72
Figure 19 : Représentation schématique des séquences cibles de l'insuline dans le promoteur du gène codant pour la fatty acid synthase (FAS)	74
Figure 20 : Comparaison schématique des glycémies postprandiales de l'homme et de la truite après un repas contenant des glucides digestibles	80
Figure 21 : Photos d'hépatocytes de truite arc-en-ciel après 4h (T4), 24h (T24), 48h (T48) et 72h	88
Figure 22 : Schéma représentatif de l'expérimentation <i>in vivo</i>	96
Figure 23 : A) Effet de la rapamycine (R) sur la phosphorylation des protéines Akt, TOR, S6K1 et S6 (résultats complémentaires) ; B) Effet de l'insuline (I), d'un mélange d'acides aminés (AA), et de leur combinaison (AAI) en présence ou absence de rapamycine sur la phosphorylation des protéines Akt, FoxO1, TOR, S6K1 et S6	114
Figure 24 : Résultats complémentaires : Effet de la wortmanine et du LY294004 sur A) la	116

phosphorylation d'Akt induite par l'insuline et B) la phosphorylation de TOR, S6K1 et S6 induite par la combinaison acides aminés/ insuline

Figure 25 : Effet de l'insuline et des acides aminés à la concentration 1X ou 4X sur l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire dans des hépatocytes de truite après 8h de stimulation	118
Figure 26 : Effet combiné de l'insuline et des acides aminés, après 24h de stimulation, sur l'expression des gènes G6Pase, GK et FAS dans des hépatocytes de truite	120
Figure 27 : Effet d'un mélange d'acides aminés (AA), de la leucine (Leu), de la méthionine (Met) et de la lysine (Lys) en présence ou absence d'insuline sur l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire	128
Figure 28 : Effet de l'incorporation conjointe des huiles et protéines végétales dans l'aliment pour truite sur les performances de croissance des animaux pendant 12 semaines d'alimentation	134
Figure 29 : Effet du remplacement conjoint, partiel ou total, de l'huile et de la farine de poisson par des matières premières d'origine végétale dans l'aliment pour truite sur A) la phosphorylation de la protéine TOR, B) l'expression du gène FAS	136
Figure 30 : Effet d'un mélange d'acides aminés (AA), de la leucine (Leu), de la méthionine (Met) et de la lysine (Lys) sur l'expression des gènes G6Pase, GK et FAS	142
Figure 31 : Hypothèse de régulation des l'expression des gènes glucose-6-phosphatase (G6Pase) et fatty acid synthase (FAS) par l'insuline et les acides aminés dans les hépatocytes de truite arc-en-ciel	146
Figure 32 : Effet d'une sélection divergente sur la teneur en lipides du muscle sur la phosphorylation des protéines TOR et S6 dans le foie de truite re-nourries	152
Figure 33 : Effet d'une sélection divergente sur la teneur en lipides du muscle sur l'expression des gènes ACLY et FAS dans le foie de truite à jeun ou re-nourries	152

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Sous-unités catalytiques et régulatrices des différentes classes de PI3K de mammifères	20
Tableau 2 : Régulation de l'expression du gène G6Pase et de l'activité de l'enzyme correspondante dans le foie de truite arc-en-ciel	60
Tableau 3 : Concentrations en acides aminés mesurées au niveau de la veine porte chez la truite et le rat à jeun et nourris	78
Tableau 4 : Composition du milieu de Hank modifié	86
Tableau 5 : Composition en acides aminé du milieu de culture (1X)	86
Tableau 6 : Composition du tampon de lyse	88
Tableau 7 : Composition des aliments expérimentaux	90
Tableau 8 : Composition théorique en acides aminés essentiels des quatre régimes	94
Tableau 9 : Séquences des couples d'amorces de PCR utilisées	100
Tableau 10 : Préparation des gels de polyacrylamide	104
Tableau 11 : Présentation des différents anticorps utilisés en Western blot	104

INTRODUCTION

L'essor de l'aquaculture

Les pêches de capture et l'aquaculture ont produit en 2006 environ 110 millions de tonnes de poissons destinés à l'alimentation (FAO 2008 ; <http://www.fao.org/fishery/fr>). La consommation humaine mondiale de poisson par habitant étant en constante progression, elle est passée, au cours des quatre dernières décennies, d'une moyenne de 9.9kg par personne et par an dans les années 60 à 16.7kg en 2006. Pour répondre à cette demande croissante, les pêches de capture ayant déjà atteint leur niveau maximal à la fin des années 80, la contribution de l'aquaculture à l'offre mondiale de poisson d'alimentation n'a cessé d'augmenter, passant de 6% en 1970 à un niveau record de 47% en 2006. Cette tendance devrait se poursuivre et la part de l'aquaculture devrait atteindre 60% en 2020. La pisciculture constitue ainsi le secteur de production vivrière à plus forte croissance au monde avec un taux moyen 8.7 % par an depuis 1970. Cependant, l'expansion de l'aquaculture pourrait être limitée si la formulation des aliments aquacoles reste aussi dépendante des produits de la pêche.

Evolution de la nutrition des poissons d'élevage

Les matières premières entrant principalement dans la composition des aliments piscicoles sont l'huile et la farine de poisson utilisées respectivement comme sources majeures de lipides et protéines. En effet, la composition de ces matières premières, hautement digestibles, est idéale pour couvrir les besoins des poissons en acides aminés et acides gras essentiels avec notamment la présence d'acides gras polyinsaturés (AGPI) n-3 à longue chaîne (acide eicosapentaénoïque (EPA) et acide docosahexaénoïque (DHA)) (NRC 1993). De plus, les poissons, tels que les salmonidés, utilisent préférentiellement les acides aminés comme source d'énergie, ce qui induit une forte dépendance vis-à-vis de la fourniture en protéines alimentaires. L'huile de poisson est également une source d'énergie digestible très bien utilisée par les animaux et qui leur permet d'épargner efficacement les protéines alimentaires. Cependant, l'emploi d'aliments à forte teneur en lipides conduit à une augmentation des dépôts lipidiques corporels qui peut avoir un effet négatif sur la qualité de la chair (Guillaume et al. 1999). La nutrition des poissons d'élevage est donc extrêmement dépendante de l'apport en huile et surtout en farine de poisson, qui deviennent de plus en plus convoitées, rares et onéreuses (Naylor et al. 2000; Naylor et al. 2009; Tidwell et al. 2001).

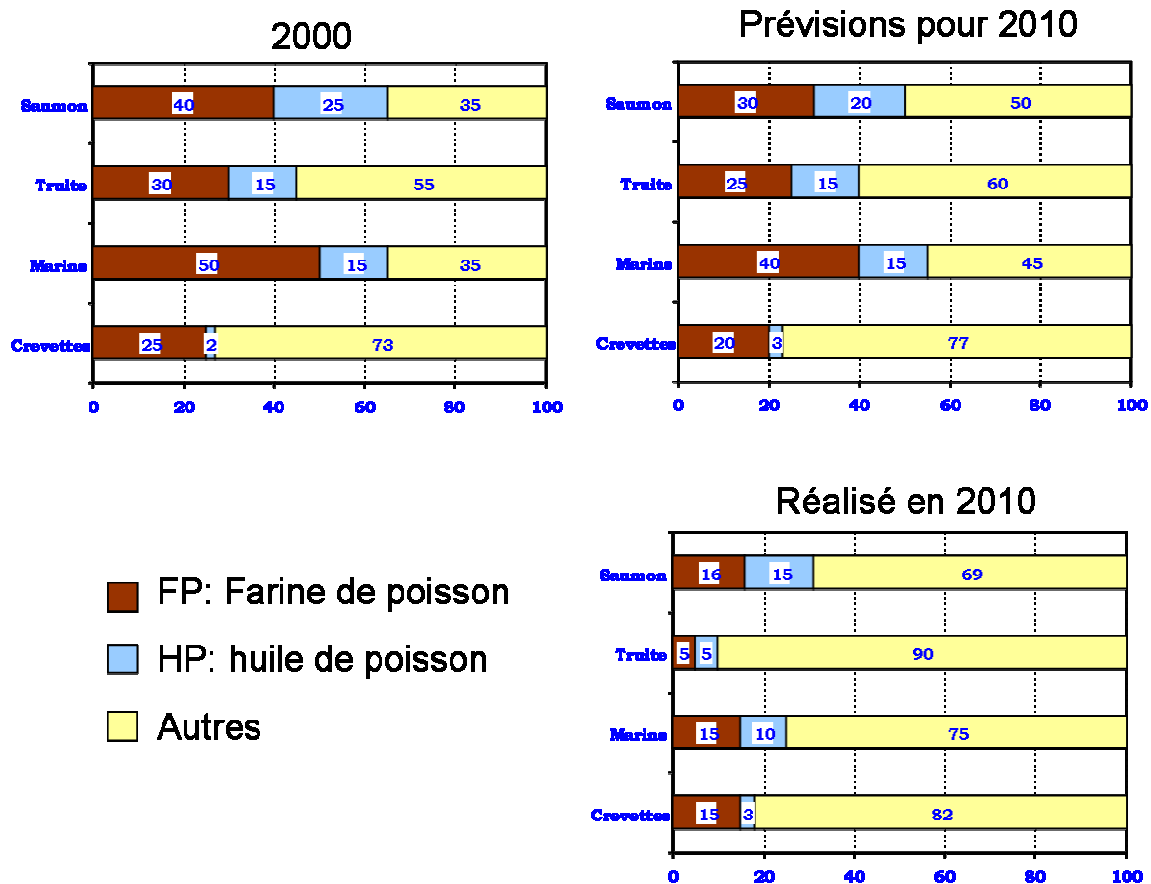


Figure 1 : Evolution de la composition des aliments pour différentes espèces de poissons et crustacés élevées en aquaculture entre 2000 et 2010.

Ces figures m'ont été communiquées par le Docteur Kaushik. Les données concernant l'année 2000 et les prévisions pour 2010 ont été présentées lors d'une conférence (Kaushik 2002) et les données du graphique « Réalisé en 2010 » proviennent des résultats obtenus dans le cadre du projet AQUAMAX : http://www.aquamaxip.eu/files/News_Aquamax_Issue_03.pdf

Au cours de ces dernières années, les recherches en nutrition des poissons se sont donc intensifiées afin d'identifier des alternatives à l'utilisation des huiles et farines de poissons dans les aliments piscicoles (Figure 1). Une des stratégies envisagées a été l'incorporation dans les aliments pour poissons de matières premières d'origine végétale (protéines et huiles) (Gatlin et al. 2007). Cependant, un certain nombre d'éléments limitent encore aujourd'hui leur incorporation en grande quantité et empêchent la suppression totale de la farine et de l'huile de poisson. En effet, les ingrédients d'origines végétales posent des problèmes d'appétence et apportent des facteurs antinutritionnels (polysaccharides non digestibles, oligosaccharides, alcaloïdes, composés antigéniques, anti-protéases etc...) (Francis et al. 2001). Par ailleurs, la chair de poisson est riche en AGPI de la série n-3, ce qui lui confère une valeur nutritionnelle et santé, dans la mesure où, ces types d'acides gras sont reconnus pour participer à la prévention des maladies cardio-vasculaires, inflammatoires, neurodégénératives et certains cancers (Moyad 2005; Psota et al. 2006; Simopoulos 2002). En revanche, les huiles végétales ont une composition en acides gras différente de celle de l'huile de poisson et sont en particulier pauvres voire dépourvues d'AGPI n-3. Ainsi, lorsque les poissons sont élevés avec des huiles végétales durant la majeure partie de leur cycle de vie, un régime dit de finition à base d'huile de poisson est nécessaire pour obtenir une chair présentant des teneurs en AGPI n-3 satisfaisantes (Bell et al. 2003; Glencross et al. 2003; Regost et al. 2003). Concernant les protéines alimentaires, le profil en acides aminés essentiels des produits végétaux diffère de celui des farines de poissons, nécessitant souvent l'ajout d'un ou plusieurs acides aminés, comme la méthionine ou la lysine, sous forme cristalline afin de satisfaire les besoins en acides aminés essentiels des poissons (Cheng et al. 2003; Davies et al. 1997; NRC 1993). Cependant, le principal inconvénient limitant l'utilisation des ingrédients d'origine végétale en plus forte proportion dans l'aliment est leur effet négatif sur les performances de croissance (diminution d'environ 15-20% de ces performances). Il semblerait que ce ralentissement de la croissance soit majoritairement dû aux protéines végétales (Gatlin et al. 2007; Kaushik et al. 1995; Webster et al. 2007). En effet, plusieurs études sur les salmonidés ont montré qu'il est possible de remplacer totalement l'huile de poisson par un mélange de plusieurs huiles végétales sans affecter la croissance et l'efficacité alimentaire (Bell et al. 2003; Richard et al. 2006; Sargent et al. 1999). En revanche, bien qu'une réduction substantielle de la farine de poisson puisse être réalisée sans conséquence sur la croissance, le remplacement total par des protéines végétales n'est toujours pas envisageable (Gatlin et al. 2007; Watanabe et al. 1998; Watanabe et al. 1997; Webster et al. 2007). En effet, il a été montré chez la truite qu'un remplacement total de la farine de poisson entraîne une diminution de la croissance, probablement liée à une modification d'un certain nombre de voies métaboliques hépatiques (Panserat et al. 2008; Vilhelmsson et al. 2004). L'origine exacte de la baisse de croissance observée chez les poissons nourris avec des produits végétaux reste donc à déterminer.

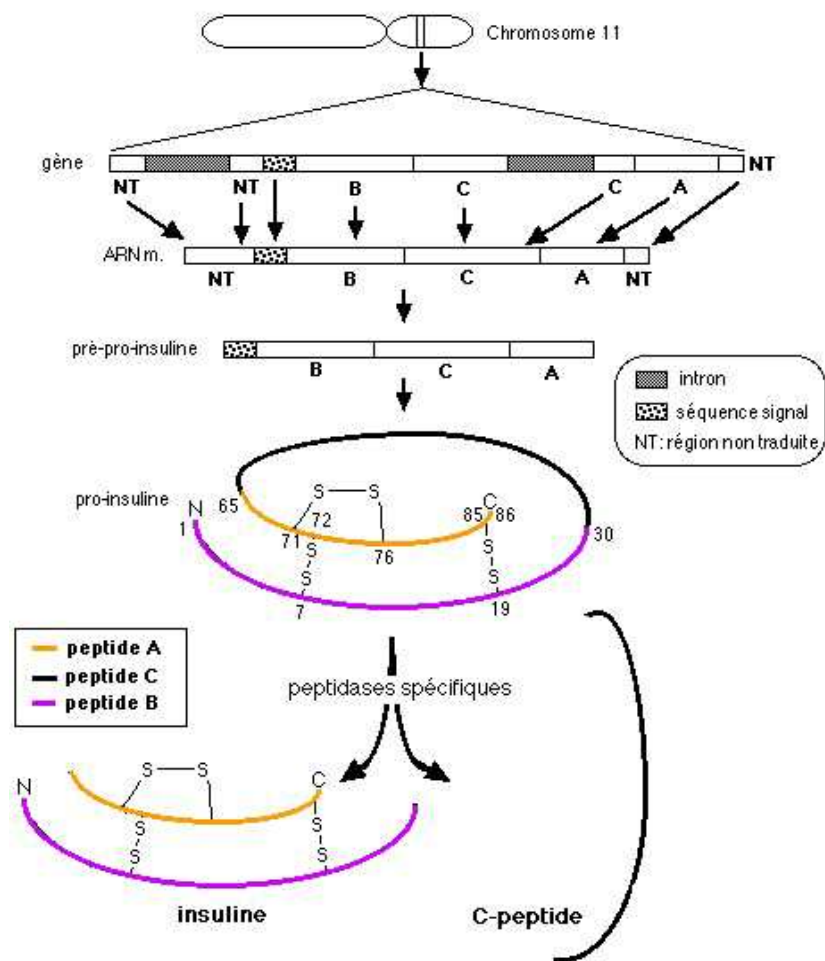
Enfin, contrairement aux produits d'origine halieutique, les végétaux présentent naturellement une forte proportion de glucides (sous forme d'amidon) connus pour être mal utilisés par les salmonidés. Ainsi, au-delà de 20% de glucides digestibles dans l'aliment, les performances de croissance diminuent significativement (Panserat 2009). L'incorporation de ces matières premières reste donc limitée dans les aliments piscicoles.

Objectif général de la thèse

Dans la nutrition des poissons d'élevage, les acides aminés, présents en forte quantité dans l'aliment, jouent un rôle clé dans la croissance et le métabolisme au regard des deux autres macronutriments (lipides et glucides). Le remplacement total des protéines issues de la farine de poisson par des protéines végétales reste problématique pour des raisons non encore élucidées. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse est de mieux comprendre le rôle joué par les acides aminés dans la régulation hépatique du métabolisme intermédiaire dans le foie de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*).

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A



B

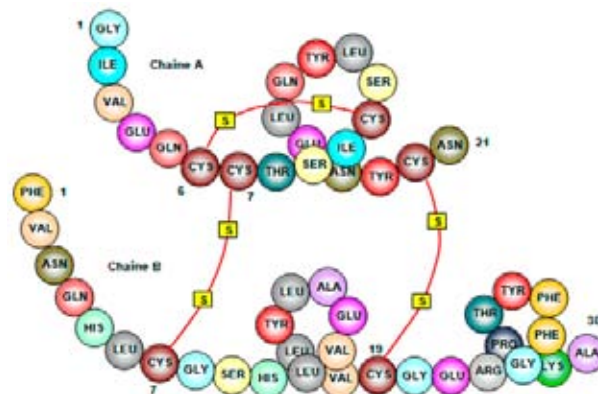


Figure 2 : Schéma représentatif de la biosynthèse (A) et de la structure (B) de l'insuline.

PARTIE A : DESCRIPTION DES VOIES DE SIGNALISATION CELLULAIRE DE L'INSULINE ET DES ACIDES AMINES CHEZ LES MAMMIFERES

La signalisation intracellulaire est l'intégration par la cellule des différents signaux extracellulaires. Les molécules dites « signales » (hormones, facteurs de croissance, nutriments, neurotransmetteurs etc...) ont pour rôle de réguler le métabolisme cellulaire et plus globalement la destinée de la cellule : différenciation, prolifération, quiescence, apoptose. La signalisation cellulaire est donc l'ensemble des processus biochimiques qui se déroulent à l'intérieur de la cellule depuis la fixation de la molécule « signale » ou ligand sur son récepteur, qui peut être membranaire à la surface de la cellule ou nucléaire, jusqu'à la réaction cellulaire proprement dite. La propagation du signal fait intervenir une cascade de réactions entre plusieurs protéines de signalisation engendrant des mécanismes de phosphorylation ou la formation de complexes protéiques. Au bout de ces voies, une ou plusieurs protéines de signalisation interagissent avec une protéine cible responsable de la régulation de différentes fonctions comme, par exemple, la régulation de la transcription d'un gène cible lorsqu'il s'agit de facteurs de transcription.

L'insuline et les acides aminés ont été décrits comme des molécules dites « signales » intervenant respectivement dans la régulation du métabolisme intermédiaire et le contrôle de la synthèse protéique. Au cours de ce chapitre nous présenterons certains effets connus de ces deux molécules sur différentes fonctions cellulaires et nous décrirons précisément les voies de signalisation intracellulaires mises en jeu dans la propagation du signal insulinaire et des acides aminés.

I. L'insuline

I.1. Structure et sécrétion de l'insuline

L'insuline, est un polypeptide pancréatique de 51 acides aminés (poids moléculaire 6 kDa) sécrété par les cellules β des îlots de Langerhans (Figure 2B). Le gène de l'insuline code pour une protéine appelée pré-pro-insuline comprenant un peptide signal de 23 acides aminés et deux chaînes, A et B, constituées respectivement de 21 et 30 acides aminés et reliées entre elles par le peptide de connexion C. Le clivage rapide du peptide signal lors de l'adressage de la protéine vers le réticulum endoplasmique permet l'obtention de la pro-insuline. La structure de la pro-insuline est conditionnée par la présence de 3 ponts disulfures, l'un interne à la chaîne A, les deux autres reliant entre elles les chaînes A et B. L'élimination du peptide de connexion C permet l'obtention de l'insuline proprement dite (Figure 2A).

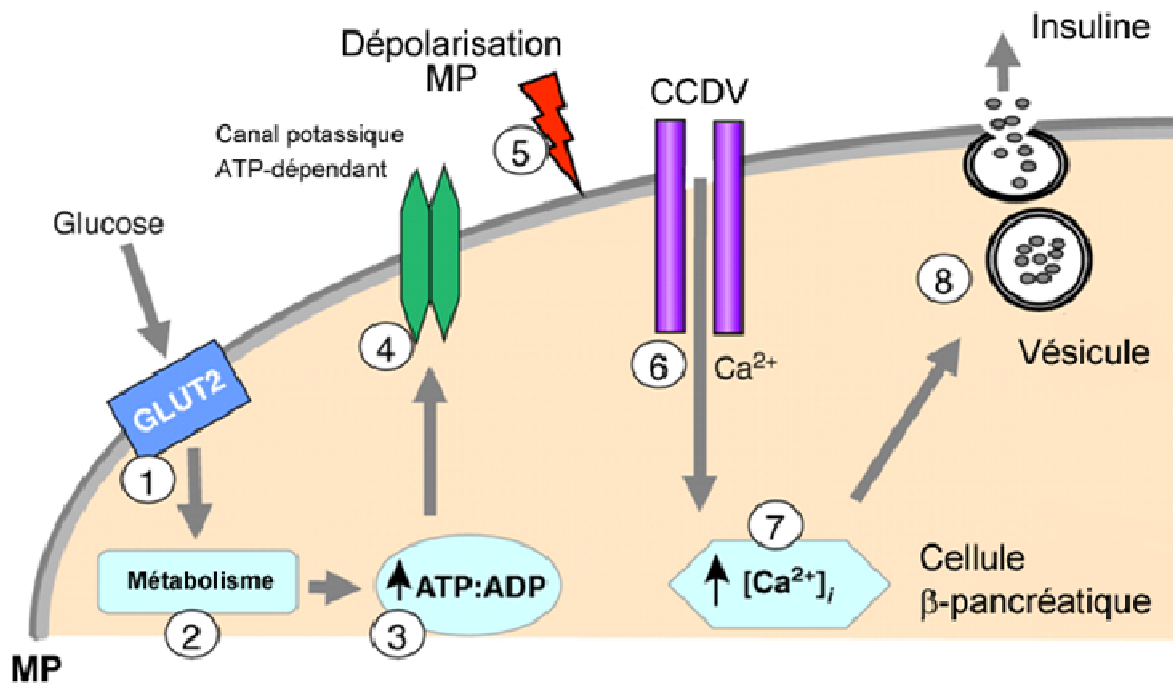


Figure 3 : Schéma représentatif du mécanisme de sécrétion de l'insuline par les cellules β du pancréas induit par le glucose (d'après Wang et al, 2009).

Le glucose entre dans la cellule via le transporteur GLUT2 (1). Il est ensuite métabolisé par la voie de la glycolyse et le métabolisme mitochondrial (2) qui ont pour effet d'augmenter le rapport cytosolique ATP/ADP (3). Cette augmentation du ratio ATP/ADP induit la fermeture des canaux potassiques dépendants de l'ATP (4) et la dépolérisation de la membrane plasmique (MP) (5), ce qui entraîne alors l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage (CCDV) (6). Il en résulte une augmentation de la concentration intracellulaire du Ca^{2+} (7) qui induit la fusion des granules contenant l'insuline avec la membrane plasmique et la libération de l'insuline dans le milieu extracellulaire (8).

L'insuline présente une demi-vie d'environ 3 minutes et est sécrétée selon deux modes : l'un pulsatile environ toutes les dix minutes et dont le but est de maintenir un taux basal d'insuline circulante et l'autre stimulé en réponse à un signal tel que la prise alimentaire. Ce deuxième mode de sécrétion est biphasique. Il comprend une phase précoce liée à la libération de l'insuline stockée dans les granules de sécrétion puis une phase tardive correspondant à la libération de l'insuline nouvellement synthétisée. La sécrétion de l'insuline est étroitement contrôlée par différents facteurs, parmi lesquels le glucose joue un rôle prépondérant. Ainsi, le mécanisme majeur de régulation est le suivant : le métabolisme oxydatif du glucose dans la cellule β -pancréatique, en augmentant la production d'ATP et le rapport cytosolique ATP/ADP, va permettre la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants (couplés à la protéine G) (Tarasov et al. 2004). Ce mécanisme provoque la dépolarisation de la cellule et l'ouverture des canaux calciques dépendant du voltage. L'augmentation de la concentration intracellulaire du calcium de concert avec d'autres seconds messagers comme l'AMP cyclique va permettre la libération de l'insuline à partir des granules sécrétoires matures, réalisant ainsi la première phase de sécrétion de l'insuline (Figure 3) (Rorsman et al. 2003; Wang et al. 2009). Un système oscillatoire lié au cycle fermeture/ouverture des canaux potassiques dépendant du Ca^{2+} se met secondairement en place, ce qui correspond à la deuxième phase de la sécrétion de l'insuline (réponse insulino-sécrétoire biphasique du glucose) (pour revue (Henquin 2009)).

D'autres sécrétagogues comme des agonistes β -adrénergiques, des peptides intestinaux à effet insulinothépe, et le glucagon interviennent indépendamment de la voie glycolytique, dans la stimulation de la sécrétion de l'insuline. De plus, plusieurs acides aminés (par exemple l'arginine, l'alanine et la glutamine), semblent jouer un rôle dans la régulation de la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas. En effet, dans certaines conditions, les acides aminés augmentent la sécrétion d'insuline comme le démontrent diverses études réalisées *in vivo* (Floyd et al. 1966) et *in vitro* (Brennan et al. 2002; Charles et al. 1983; Dixon et al. 2003). Parmi tous les acides aminés, l'arginine, la glutamine et la leucine sont les acides aminés les mieux caractérisés pour leur effet sécrétagogue (Newsholme et al. 2005; Wu 2009). Les mécanismes entrant en jeu sont variés : par exemple, la L-arginine est capable d'induire de façon directe la dépolarisation de la membrane plasmique (Smith et al. 1997). D'autres acides aminés, co-transportés avec le Na^+ , peuvent également induire la dépolarisation de la membrane cellulaire, entraînant ainsi la libération de l'insuline suite à l'ouverture des canaux calciques dépendant du voltage. L'alanine et la glutamine sont également des acides aminés clés dans la régulation des fonctions des cellules β du pancréas et la sécrétion d'insuline. Cependant les mécanismes intervenant dans ces régulations sont complexes et impliquent des effets transcriptionnels et des signaux mitochondriaux (pour revue (Newsholme et al. 2007)).

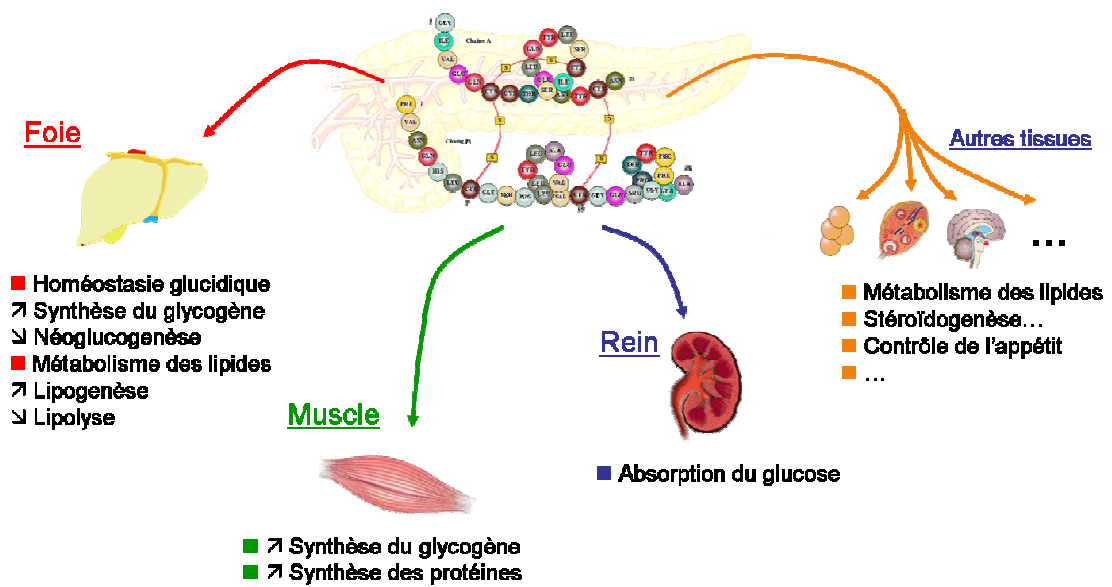


Figure 4 : Les différentes fonctions de l'insuline.

I.2. Rôle de l'insuline dans la régulation du métabolisme

L'insuline, hormone hypoglycémisante par excellence, intervient dans la régulation des métabolismes glucidique, lipidique et protéique et joue un rôle anabolique majeur au sein de l'organisme pour la mise en réserve et l'utilisation des substrats énergétiques (Saltiel et al. 2001). Elle agit sur une grande majorité des tissus de l'organisme dont le foie et le muscle mais également le rein, les ovaires ou encore le cerveau (Figure 4).

L'insuline est plus particulièrement connue pour son implication dans le contrôle de la glycémie. Le maintien de l'homéostasie glucidique implique l'action simultanée de plusieurs tissus : le foie, le pancréas, le muscle et le tissu adipeux. Suite à l'ingestion d'un repas, la concentration élevée de sucre et d'acides aminés circulant dans le sang induit une sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas dans le flux sanguin. Dans la plupart des tissus, le glucose traverse passivement la membrane à travers des pores formés de transporteurs de glucose (GLUT). En revanche, la captation du glucose par les cellules du muscle et du tissu adipeux est contrôlée par l'insuline. Dans ces tissus, le transport de glucose est assuré par le transporteur de glucose GLUT4 qui est transloqué à partir de compartiments intracellulaires vers la membrane plasmique suite à une stimulation par l'insuline.

L'insuline favorise également la synthèse de glycogène. Elle inhibe la glycogénolyse et la néoglucogenèse hépatiques c'est-à-dire la synthèse du glucose à partir de précurseurs non glucidiques. De plus, elle favorise la réabsorption active du glucose au niveau des reins. L'insuline stimule aussi la lipogenèse (conversion des substrats non lipidiques en acides gras) en vue de leur stockage dans le tissu adipeux et s'oppose à la lipolyse par inhibition de la libération des acides gras par le tissu adipeux. L'insuline a par ailleurs des effets importants sur le métabolisme des protéines, elle favorise la captation des acides aminés par les cellules, stimule la synthèse protéique et inhibe la protéolyse. L'insuline exerce donc des effets à court terme sur la régulation des flux de substrats métaboliques mais elle a également des effets à long terme sur la croissance, le contrôle de l'apoptose et le développement via l'activation de sa voie de signalisation.

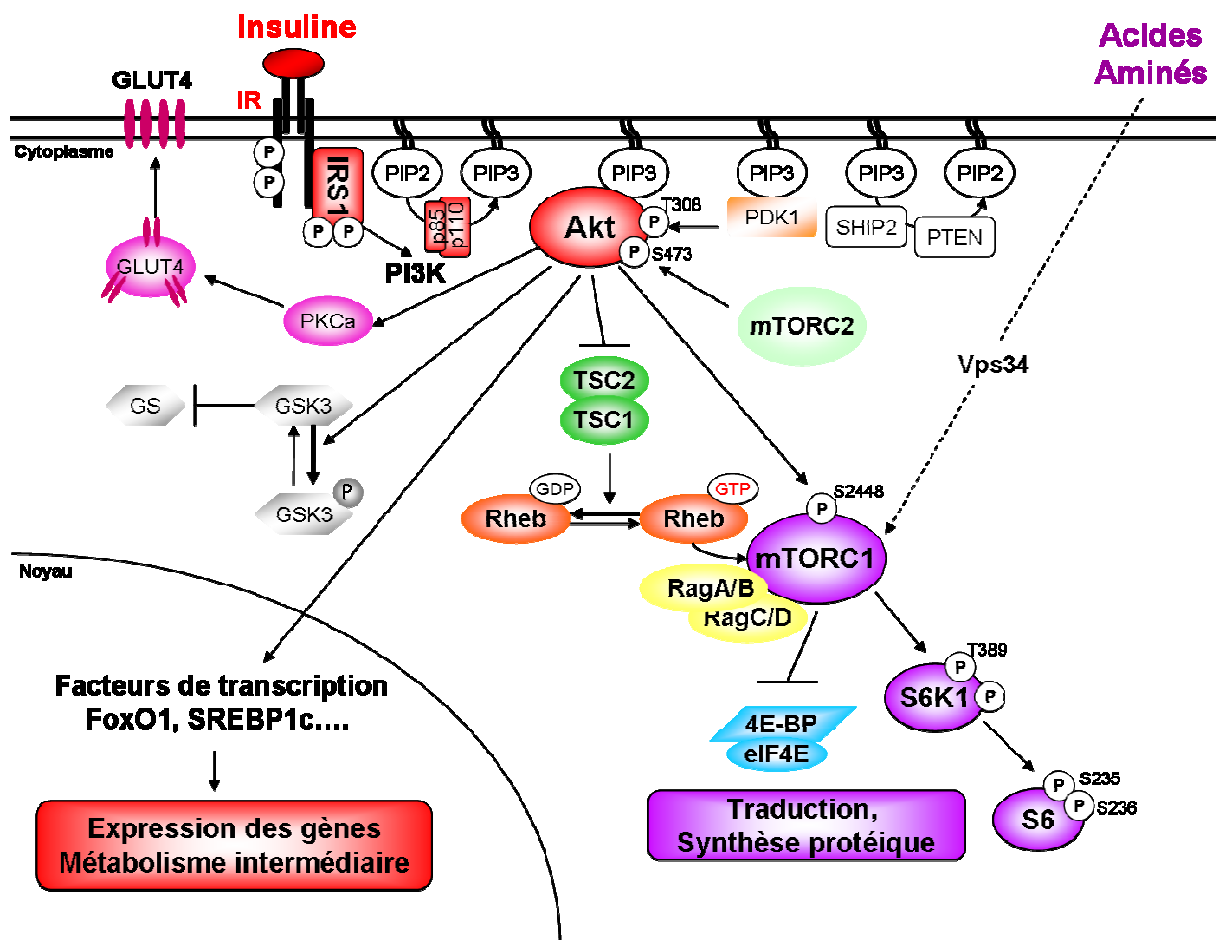


Figure 5 : Représentation schématique des voies de signalisation de l'insuline et des acides aminés.

Suite à la liaison de l'insuline, le récepteur de l'insuline (IR) s'autophosphoryle et initie la propagation du signal insulinaire en phosphorylant son substrat (IRS1) sur résidus tyrosine. IRS1 active ensuite la Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) formée de deux sous-unités, l'une régulatrice (p85) et l'autre catalytique (p110). La PI3K phosphoryle les lipides inositol sur la position 3 du groupe de tête inositol. Les lipides ainsi formés sont localisés au niveau membranaire et attirent les protéines PDK1 et Akt (protéine kinase B). Akt est ensuite phosphorylée par PDK1 et le complexe mTORC2 et phosphoryle à son tour plusieurs protéines kinases et facteurs de transcription impliqués dans les principaux effets métaboliques de l'insuline. Akt phosphoryle et inactive la glycogène synthase kinase-3 (GSK3) ce qui permet l'activation de la glycogène synthase (GS) et donc l'augmentation de la synthèse de glycogène. Akt est également à l'origine de la translocation du transporteur de glucose GLUT4 vers la membrane plasmique permettant ainsi la captation du glucose extracellulaire par les cellules (musculaires et adipocytes). Akt via l'activation ou l'inactivation de différents facteurs de transcription (par exemple SREBP1c et FoxO1) régule l'expression de plusieurs gènes du métabolisme intermédiaire (par exemple G6Pase et FAS). Enfin, Akt participe au contrôle de la synthèse protéique par l'activation de la voie mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1). En effet, Akt d'une part, phosphoryle mTOR en sérine 2448 et d'autre part, via la phosphorylation et l'inactivation de TSC1/2 (tuberous sclerosis complex) permet à la forme active de Rheb (Ras homologue enriched brain) d'activer mTORC1. L'activation de mTORC1 nécessite également l'intervention des acides aminés via la protéine Vps34 et l'activation des protéines Rag qui servent de point d'ancrage à mTORC1 au niveau du lysosome où se trouve également Rheb, son activateur. Une fois activé, mTORC1 initie la synthèse protéique en inhibant 4EBP et activant S6K1 impliquée dans la phosphorylation de la protéine ribosomale S6.

II. Signalisation de l'insuline

Les deux principales voies de signalisation stimulées en réponse à l'insuline sont : la voie PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)-Akt (aussi appelée PKB pour protéine kinase B) et la voie MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Avruch 1998). La voie PI3K-Akt conduit aux effets métaboliques de l'insuline, régulant en particulier l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire et la synthèse protéique (Figure 5). La voie MAPK est plus impliquée dans la régulation de la croissance, de la différenciation et de la prolifération cellulaire. Mon travail de thèse ayant principalement porté sur les effets de l'insuline véhiculés par la voie PI3K-Akt, la voie des MAPK ne sera pas détaillée dans cette introduction.

II.1. Récepteur de l'insuline

L'insuline agit en se fixant sur un récepteur membranaire spécifique. Le récepteur de l'insuline appartient à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase qui comprend également les récepteurs de différents facteurs de croissance tels que l'EGF (epidermal growth factor), le PDGF (platelet-derived growth factor) et l'IGF-1 (insulin-like growth factor-1).

Le récepteur de l'insuline est un hétérodimère composé de deux sous-unités α extracellulaires reliées par des ponts disulfures à deux sous-unités β transmembranaires possédant le domaine tyrosine kinase (White 1997) (Figure 6). L'insuline active son récepteur en se liant à l'une des deux sous-unités α et induit des modifications de conformation responsables de l'activation du domaine tyrosine kinase d'une des deux sous-unités β . Cette activation résulte en une série de réactions d'autophosphorylations des résidus tyrosine présents dans la partie intracellulaire des sous-unités β . Ainsi, l'activation du récepteur de l'insuline par son ligand induit la phosphorylation de la tyrosine 960 (Tyr960) située dans le domaine juxtamembranaire, des tyrosines 1146, 1150 et 1151 (Tyr1146, Tyr1150 et Tyr1151) dans le domaine tyrosine kinase et des tyrosines 1316 et 1322 (Tyr1316 et Tyr1322) à proximité de l'extrémité C-terminale (White 1997).

L'autophosphorylation du récepteur de l'insuline va permettre le recrutement de protéines à domaine SH2 (Src Homology domain 2) ou à domaine de liaison des phosphotyrosines PTB (Phosphotyrosine binding domain) pouvant interagir avec des tyrosines phosphorylées (Taniguchi et al. 2006).

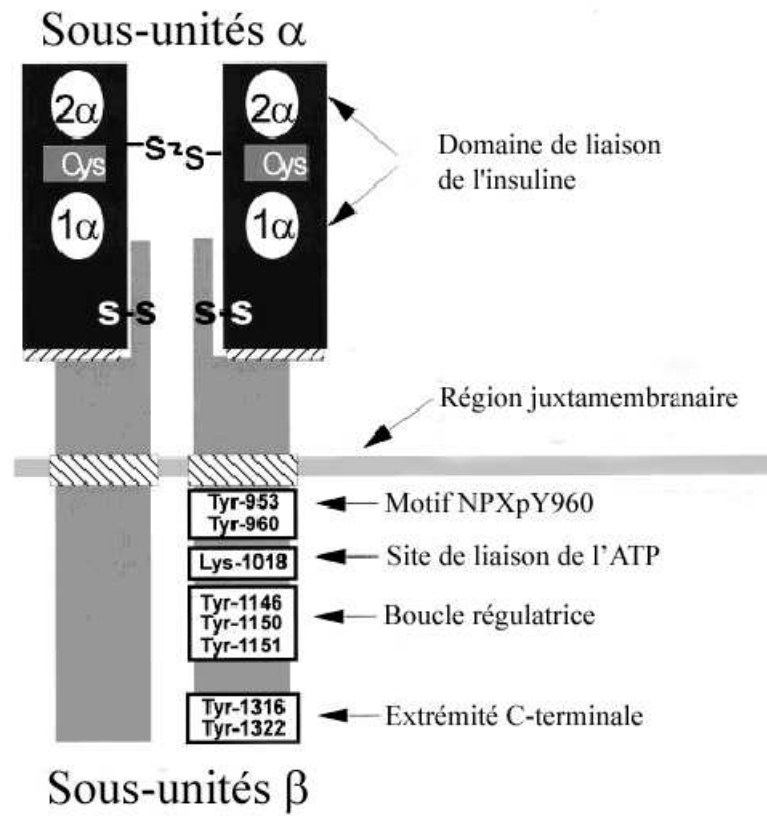


Figure 6 : Structure du récepteur de l'insuline (White et al, 1997).

Ainsi, la phosphorylation de la Tyr960 est essentielle à la liaison des substrats du récepteur de l'insuline IRS (Insulin Receptor Substrate) qui présentent un domaine de liaison aux phosphotyrosines (PTB) selon le motif reconnu NPXpY960 (Figure 5). Une mutation de ce résidu inhibe la phosphorylation des substrats du récepteur de l'insuline et entraîne une absence de réponse biologique induite par l'insuline malgré une activation normale du récepteur (Czech et al. 1999; Garvey et al. 1998). La phosphorylation des résidus contenus dans le domaine tyrosine kinase (Tyr1146, Tyr1150 et Tyr1151) servirait pour sa part à moduler l'ampleur de l'activité tyrosine kinase du récepteur (Shepherd et al. 1998). En effet, la mutation d'un, deux ou trois de ces résidus entraîne une diminution progressive de l'activité du récepteur envers ses substrats (Shepherd et al. 1998).

Une fois activé par la liaison de son substrat, le récepteur de l'insuline initie la propagation du signal insulinique en phosphorylant plusieurs substrats intracellulaires sur des résidus tyrosine. Chez les mammifères, au moins onze substrats intracellulaires du récepteur à l'insuline ont pu être identifiés (Taniguchi et al. 2006). Six d'entre eux appartiennent à la famille des IRS et conduisent à l'activation de la voie PI3K-Akt. D'autres substrats ont également été identifiés comme Gab1 (Grb2-associated binder-1), Cbl (Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence homologue) et différentes isoformes de Shc (Src-homology-2-containing protein) en amont de la voie des MAPK (Taniguchi et al. 2006).

II.2. Les protéines IRS

Il existe aujourd'hui au moins six isoformes IRS : quatre isoformes IRS nommées IRS-1 à IRS-4 connues chez différents mammifères (Fantin et al. 1999; Lavan et al. 1997a; Lavan et al. 1997b) et deux autres protéines détectées chez l'homme et nommées IRS5/DOK4 et IRS6/DOK5 (Cai et al. 2003). Avec des poids moléculaires compris entre 60 et 180 kDa, la distribution tissulaire varie en fonction des différentes protéines IRS. IRS-1 et IRS-2 sont exprimés dans la majorité des tissus (Sun et al. 1991; Sun et al. 1995) incluant le muscle, le foie et les cellules β du pancréas. IRS-1 jouerait un rôle majeur dans le muscle squelettique, alors qu'IRS-2 agirait plus particulièrement dans le foie et les cellules β du pancréas. IRS-3 pour sa part, n'est exprimé que dans le cerveau, le foie, les adipocytes et les fibroblastes (Lavan et al. 1997b; Sciacchitano et al. 1997). IRS-4 voit son expression limitée aux tissus embryonnaires et aux muscles chez l'adulte (Schreyer et al. 2003). Enfin, IRS-5 est particulièrement présent dans le foie et les reins alors qu'IRS-6 s'exprime principalement dans les muscles squelettiques (Cai et al. 2003).

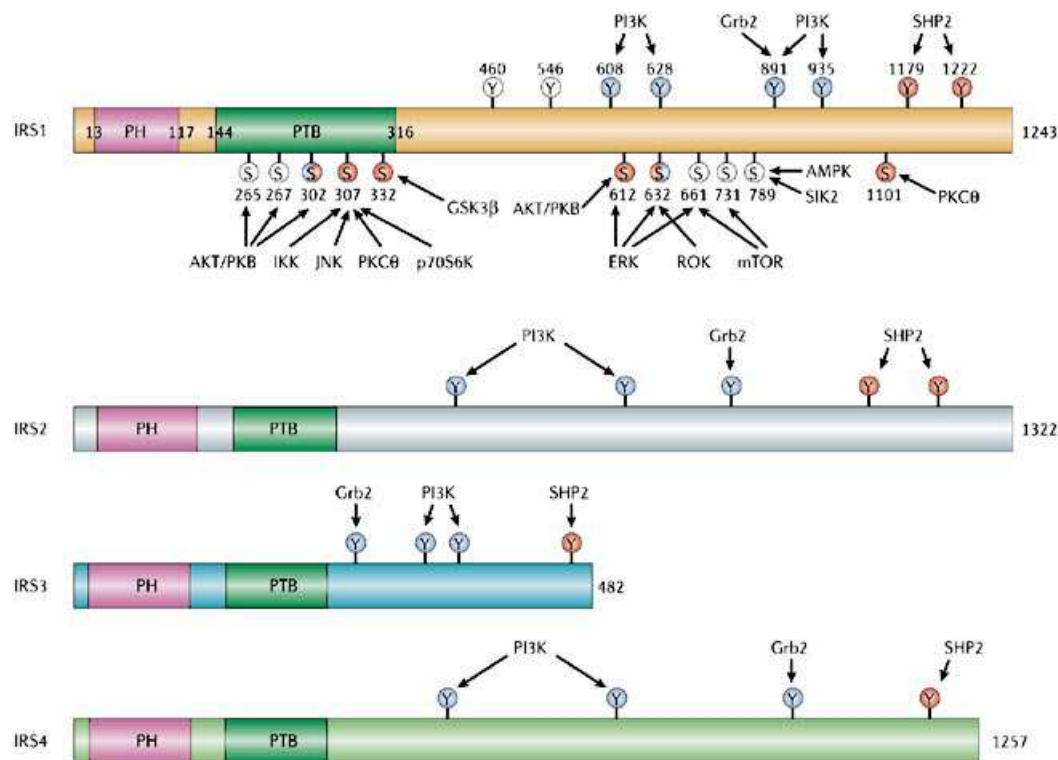


Figure 7 : Structures des quatre isoformes du substrat du récepteur de l'insuline, IRS-1, IRS-2, IRS-3 et IRS-4 (d'après Taniguchi et al, 2006).

Le domaine PH (pleckstrin homology domain) permet la fixation à la membrane plasmique. Le domaine PTB (Phosphotyrosine binding domain) confère aux protéines IRS une forte affinité pour le récepteur de l'insuline. Les résidus tyrosine (Y) et sérine (S) ainsi que les kinases responsables de leur phosphorylation sont indiqués. Les cercles bleus représentent des sites de régulations positives tandis que les cercles rouges représentent des sites de régulations négatives. Les cercles blancs représentent des sites dont l'effet de la phosphorylation n'est pas encore connu.

D'un point de vue structurel, les protéines IRS présentent dans leur partie N-terminale un domaine PTB ainsi qu'un domaine PH (pleckstrin homology domain). Ces domaines sont particulièrement importants pour l'interaction des protéines IRS avec le récepteur de l'insuline (Figure 7). En effet, le domaine PTB confère à ces protéines une forte affinité pour le récepteur de l'insuline et le domaine PH ce qui favorise la localisation de ces protéines à proximité des récepteurs de l'insuline (Yenush et al. 1996). La partie C-terminale des protéines IRS présente pour sa part de multiples résidus tyrosine soumis à phosphorylation par le récepteur de l'insuline et qui serviront de site d'ancrage à d'autres protéines présentant des domaines SH2. Ainsi, lorsque le récepteur de l'insuline est activé, les protéines IRS, attirées grâce à leur domaine PTB qui fonctionne comme un site de fixation au motif NPXY de la région juxtamembranaire du récepteur de l'insuline, sont phosphorylées par le récepteur de l'insuline et attirent d'autres molécules de signalisation.

IRS-1 est le substrat du récepteur à l'insuline le plus étudié. Il a été identifié comme une phosphoprotéine de 185 kDa à l'aide d'un anticorps antiphosphotyrosine, immunoprécipité à partir de foie de rat, puis détecté dans le muscle squelettique et le tissu adipeux (Rothenberg et al. 1991). Il joue un rôle central dans la transduction du signal insulinaire. En effet, la surexpression de IRS-1 dans les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) ou dans des cellules 32D (lignée cellulaire « myeloid progenitor » invalidée pour IRS-1 et IRS-2) augmente les divisions cellulaires stimulée par l'insuline (Chen et al. 1995; Sawka-Verhelle et al. 1996; Wang et al. 1993). La micro-injection d'IRS-1 recombinant dans des ovocytes de Xénope provoque une augmentation significative de leur sensibilité à l'insuline (Chuang et al. 1993). De plus, lors de la différenciation des fibroblastes 3T3-L1 en adipocytes sensibles à l'insuline, l'expression d'IRS-1 augmente de façon coordonnée avec le récepteur de l'insuline et le transporteur de glucose GLUT4 (Sun et al. 1993). La surexpression de IRS-1 dans des lignées L6 de myocytes de rat induit une augmentation de la sensibilité à l'insuline, du transport du glucose et de la synthèse de glycogène (Hribal et al. 2000). L'importance du rôle joué par IRS-1 dans la signalisation insulinaire a été confirmée par la suite par des études utilisant des cellules ou des tissus provenant de souris IRS-1^{-/-} (Araki et al. 1994; Tamemoto et al. 1994). En effet, le transport de glucose ainsi que la translocation de GLUT 4, en réponse à l'insuline, sont diminués dans des adipocytes de souris dont IRS-1 a été invalidé (Tamemoto et al. 1994).

IRS-1 contient une vingtaine de sites potentiels de phosphorylation sur résidus tyrosine, dont huit sont phosphorylés par le récepteur de l'insuline chez les mammifères. Ces sites sont inclus dans des séquences consensus de type YMXM ou YXXM (M=méthionine, Y=tyrosine,

X=acide aminé indifférent) pouvant être reconnues par des protéines contenant des domaines SH2 telles que la molécule adaptatrice Grb2 qui, associée à SOS (Son Of Sevenless), stimule la voie MAPK ou la sous unité régulatrice p85 de la PI3K responsable de l'activation de la voie Akt permettant ainsi la propagation du signal émanant du récepteur de l'insuline (Virkamäki et al. 1999).

La capacité des protéines IRS à induire la signalisation de l'insuline peut également être régulée par le biais de tyrosine phosphatases. Ainsi la phosphatase SHP2 (SH2-domain-containing tyrosine phosphatase-2) est capable de se lier à deux résidus tyrosine phosphorylés situés dans la partie C-terminale d'IRS1 et induire la déphosphorylation d'autres résidus tyrosine impliqués dans la liaison des protéines PI3K et Grb2 (Myers et al. 1998).

Les protéines IRS peuvent également être phosphorylées sur des résidus sérine en réponse à l'insuline et à d'autres stimuli tels que les cytokines et les acides gras libres (Zick 2005) (Figure 7). La protéine IRS1 possède plus de 70 sites potentiels de phosphorylation sur sérine. En effet, la protéine Akt (protéine située en aval d'IRS-1 qui sera décrite plus loin) peut entraîner la phosphorylation d'IRS-1 sur différents résidus sérine. Il s'agit d'un contrôle positif visant à protéger les phosphorylations sur tyrosine nécessaires à la transmission du signal de l'insuline d'éventuelles déphosphorylations par des phosphatases (Zick 2001). Cependant, généralement, la phosphorylation sur sérine semble jouer un rôle négatif sur la voie de signalisation insulinaire. Le mécanisme exact par lequel la phosphorylation sur sérine altère les fonctions d'IRS1 n'est pas clair. Un mécanisme possible serait que les serines phosphorylées interagiraient avec les domaines fonctionnels dans lesquels elles résident. Par exemple, la phosphorylation d'IRS1 sur Ser307, résidu situé dans le domaine PTB, a été corrélée à une régulation négative de la signalisation de l'insuline (Hirosumi et al. 2002). De plus, la phosphorylation, *in vitro*, de ce résidu est suffisante pour perturber l'interaction du récepteur de l'insuline avec son substrat (Aguirre et al. 2000). La phosphorylation du résidu Ser270, situé également dans le domaine PTB, favoriserait l'interaction d'IRS1 avec les protéines 14-3-3, ce qui perturberait la signalisation en empêchant IRS-1 de se lier au récepteur insulinaire et en bloquant l'accès aux protéines de signalisation situées en aval (Craparo et al. 1997). De plus, des études *in vivo* récentes ont montré que la diminution de la phosphorylation de la Ser612 par la voie MAPK était corrélée à une augmentation de la phosphorylation sur Tyr608. Enfin, la phosphorylation d'IRS1 sur résidus sérine serait fortement corrélée à la résistance à l'insuline, nous en reparlerons plus loin au cours de cette introduction.

Tableau 1 : Sous-unités catalytiques et régulatrices des différentes classes de PI3K de mammifères (d'après Kok et al, 2009).

Classe	Type de sous-unité	Protéine	Gène
IA	Catalytique	p110 α	<i>PIK3CA</i>
		p110 β	<i>PIK3CB</i>
		p110 δ	<i>PIK3CD</i>
	Régulatrice	p85 α	<i>PIK3R1</i>
		p55 α	<i>PIK3R1</i>
		p50 α	<i>PIK3R1</i>
		p85 β	<i>PIK3R2</i>
		p55 γ	<i>PIK3R3</i>
IB	Catalytique	p110 γ	<i>PIK3CG</i>
	Régulatrice	p101	<i>PIK3R5</i>
		p84/87	<i>PIK3R6</i>
II	Catalytique	PI3K-C2 α	<i>PIK3C2A</i>
		PI3K-C2 β	<i>PIK3C2B</i>
		PI3K-C2 γ	<i>PIK3C3G</i>
III	Catalytique	Vps34	<i>PIK3C3</i>
	Régulatrice	Vps15	<i>PIK3R4</i>

II.3. La phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)

Les phosphoinositide 3-kinases (PI3-K) représentent une famille de protéines kinases impliquées dans la régulation de divers processus cellulaires liés à la prolifération cellulaire, à la survie, au métabolisme ou au cancer. **L'activité enzymatique principale des PI3K consiste à phosphoryler les lipides inositol sur la position 3 du groupe de tête inositol** (pour revue (Shepherd et al. 1998)).

Différents produits peuvent être générés par les différents membres de la famille des PI3K. Ainsi, quatre lipides inositol phosphorylés en position 3 ont été identifiés *in vivo*. Il s'agit du phosphatidylinositol 3-phosphate (PI(3)P), des phosphatidylinositol 3,4-biphosphate (PI(3,4)P₂) et 3,5-bisphosphate (PI(3,5)P₂) et du phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PI(3,4,5)P₃ ou PIP3). Ces lipides localisés au niveau membranaire sont capables d'attirer des protéines contenant un module de reconnaissance approprié comme le domaine PH et agissent comme des effecteurs ou transmetteurs du signal de la PI3K (Stein 2001) (Figure 5).

Les PI3K sont constituées d'une sous-unité adaptatrice/régulatrice et d'une sous-unité catalytique, chacune présente sous la forme de différentes isoformes. Il existe au total huit PI3K chez les mammifères, qui ont été divisées en trois classes I, II et III sur la base de leurs homologues de séquences, de leur préférence au substrat *in vitro* et de leur mode d'activation et de régulation (Vanhaesebroeck et al. 1999) (Tableau 1).

Les PI3K de classe I

Les PI3K de classe I sont les PI 3-kinases les mieux caractérisées à ce jour. *In vitro*, elles sont capables de phosphoryler le phosphatidylinositol (PI), le phosphatidylinositol 4-phosphate (PI(4)P) et le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PI(4,5)P₂) mais *in vivo* leur substrat préférentiel est le PI(4,5)P₂ générant ainsi le PIP3, médiateur clé de la signalisation de l'insuline. Les PI3K de classe I sont des hétérodimères composés d'une sous-unité catalytique de 110 kDa (p110) associée de manière non covalente à une des différentes sous-unités adaptatrices/régulatrices (Foster et al. 2003). De façon succincte, lorsque la sous-unité régulatrice interagit avec une tyrosine phosphorylée, la sous-unité catalytique p110 se fixe à la sous-unité régulatrice et induit l'activité enzymatique du dimère. Les PI3K de classe I sont divisées en deux groupes : la classe IA et la classe IB.

➤ Les PI3K de classe IA

Les PI3K de classe IA seraient majoritairement recrutées par la signalisation issue du récepteur de l'insuline et des protéines IRS. Chez les mammifères, différentes sous-unités régulatrices de la PI3K de classe IA ont été décrites. Elles sont codées par trois gènes distincts (Kok et al. 2009). On compte le gène *PIK3R1* codant pour la p85 α et qui en raison d'épissages alternatifs différents s'exprime également sous deux autres formes (p55 α et p50 α), le gène *PIK3R2* codant pour la p85 β et le gène *PIK3R3* codant pour la p55 γ (Kok et al. 2009). Une forme mutée de sous-unité régulatrice a été mise en évidence dans une lignée cellulaire de lymphome de thymus (CMN-5). Cette lignée n'exprime pas la sous-unité p85 α mais seulement une protéine de 65 KDa, nommée p65 qui correspond à une forme tronquée dans la partie C-terminale de p85 α . Les sous-unités régulatrices ne possèdent pas d'activité catalytique intrinsèque mais comprennent plusieurs domaines, à partir de leur extrémité N-terminale : un domaine SH3, deux fragments riches en prolines (PRD) séparés par un domaine BCR-homologue (breakpoint cluster region) et deux domaines SH2 séparés par une séquence inter SH2 (iSH2) responsable de la fixation de la sous unité catalytique p110 à la sous-unité régulatrice p85 (Kok et al. 2009). Le motif SH3, permet l'interaction de la PI3K avec des séquences d'acides aminés riches en résidus proline. Les domaines SH2 de la p85, quant à eux, sont capables d'interagir avec différentes tyrosines d'IRS phosphorylées par le récepteur de l'insuline. Cette interaction entre phosphotyrosines et domaines SH2 entraîne le déplacement de la PI3K sous la membrane plasmique, ce qui la rapproche de son substrat et lève l'action inhibitrice de la sous-unité régulatrice p85 sur la sous-unité catalytique p110. Cette sous-unité catalytique peut alors convertir les phosphoinositides et générer un second messager au niveau de la membrane. Enfin, le motif BCR s'associe avec une petite protéine G, cdc42hs, de la famille Rho pour activer la PI3K (Zheng et al. 1994).

Les cellules de mammifères possèdent trois isoformes de la sous-unité catalytique p110 de classe IA : p110 α , p110 β et p110 δ , codées par trois gènes différents (*PIK3CA*, *PIK3CB* et *PIK3CD*) présentant des distributions tissulaires différentes. Les sous unités catalytiques s'expriment dans un grand nombre de tissus, exception faite de la p110 δ qui n'est exprimée que dans les leucocytes (Kok et al. 2009). Les 3 sous-unités catalytiques des PI3K de classe IA possèdent un domaine de liaison à la p85 et un domaine kinase. L'isoforme p110 δ se distingue des deux autres isoformes par la présence d'un domaine supplémentaire, un domaine PH situé dans la partie N-terminale de la molécule.

Les sous-unités catalytiques de la PI3K présentent une double activité kinase : elles phosphorylent les phosphoinositides en position D3 du cycle inositol et possèdent également une activité sérine kinase capable de phosphoryler la sous unité régulatrice p85 sur la serine 608 ainsi que la protéine

IRS-1 (Carpenter et al. 1993). Cette activité de sérine phosphorylation est connue pour limiter l'activité de la PI3K.

➤ Les PI3K de classe IB

Chez les mammifères, les PI3K de classe IB sont constituées de l'unique sous-unité catalytique connue p110 γ (codée par le gène PIK3CG) associée à l'une des deux protéines régulatrices p101 et p84 codées par deux gènes distincts, respectivement PIK3R5 et PIK3R6 (Kok et al. 2009). La PI3K de classe IB est retrouvée essentiellement dans les leucocytes et est activée par les récepteurs couplés aux protéines G (Kok et al. 2009).

Le rôle crucial des PI3K de classe I dans la médiation des effets métaboliques de l'insuline a été révélé par l'usage de deux inhibiteurs structurellement différents, la wortmannine (C₂₃H₂₄O₈) et le LY294002 {2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one : C₁₉H₁₇NO₃}. En effet, utilisé à 50 μ M, le LY294002 abolit l'activité de la PI3K et bloque la phosphorylation et l'activation d'Akt dépendante de la PI3K dans plusieurs types de cellules cancéreuses (Panka et al. 2001) ainsi que dans des hépatomes et hépatocytes de rat (Alexia et al. 2006; Shoba et al. 2001). En revanche, elle n'inhibe pas les autres lipides et protéines kinases telles que les PI4 Kinases, la protéine kinase C (PKC), les MAPK ou c-Src (Vlahos et al. 1994). De plus, l'usage séparé de ces inhibiteurs a montré qu'ils inhibaient le transport du glucose stimulé par l'insuline dans des préparations *in vitro* de cellules adipeuses et de muscles squelettiques (Shepherd et al. 1998). L'effet biologique de la PI3K qui conduit à la formation de PIP₃ peut être également contrôlé par des phosphatases endogènes telles que PTEN (phosphatase and tensin homologue) et SHIP2 (SH2-containing 5'-phosphatase-2) qui déphosphorylent et inactivent respectivement le PIP₃ en position 3' et 5' (Maehama et al. 1999; Tang et al. 2005).

Les autres classes de PI3K

Les autres classes de la famille de la PI3-kinase auraient un rôle moindre à jouer dans les actions métaboliques de l'insuline.

➤ Les PI3K de classe II

La seconde classe de PI3K implique des enzymes phosphorylant préférentiellement le PI et le PI(4)P pour générer du PI(3)P et du PI(3,4)P₂. Cependant, cette conversion n'a pu être démontrée qu'*in vitro* et cette synthèse reste mal connue *in vivo*. Chez les mammifères, les PI3K de classe II sont des monomères existant sous la forme de trois isoformes PI3K C2 α , C2 β et C2 γ codées par trois gènes

distincts (*PIK3C2A*, *PIK3C2B* et *PIK3C2G*) (Kok et al. 2009). Les formes C2 α et β sont ubiquitaires, contrairement à l'isoforme C2 γ qui est exprimée préférentiellement dans le foie (Kok et al. 2009). Les PI3K de classe II sont des enzymes de haut poids moléculaire (de l'ordre de 200kDa) caractérisées par un domaine C2 en C-terminal, indispensable à leur activité catalytique. Ce domaine lie les phospholipides de façon calcium indépendante *in vitro* (Arcaro et al. 1998; Misawa et al. 1998). Les PI3K de classe 2 sont activées par l'insuline *in vitro* dans les cellules connues pour répondre à l'insuline (Brown et al. 1999; Brown et al. 2001), mais également *in vivo* dans le muscle (Soos et al. 2001). Cependant, elles sont incapables, *in vivo*, d'utiliser le PI(4,5)P₂ comme substrat les rendant ainsi inaptés à produire du PI(3,4,5)P₃ (PIP3), médiateur clé de la signalisation de l'insuline. De plus, ces enzymes présentent une résistance aux inhibiteurs classiques des PI3K comme la wortmannine et le LY294002 (Falasca et al. 2007).

➤ PI3K de classe III

L'unique PI3K de classe III connue à ce jour présente une ressemblance structurelle et fonctionnelle avec l'analogue PI3K de levure Vps34 (vacuolar protein-sorting-associated protein 34) et possède une fonction spécifique additionnelle de transfert de protéine (Backer 2008). La protéine Vps34 (codée par le gène *PIK3C3*) constitue la sous-unité catalytique de l'hétérodimère qu'elle forme avec la sous-unité régulatrice Vps15 (codée par le gène *PIK3R4*) (Kok et al. 2009). La protéine Vps34 ne peut produire de PI(3,4,5)P₃ puisqu'elle n'utilise que le PI comme substrat pour former du PI(3)P (Shepherd et al. 1998). Chez les mammifères, hVps34 est exprimée de façon ubiquitaire. Les Vps34 ont été impliquées dans les mécanismes d'endocytose, d'autophagie et récemment dans la transduction des signaux émis par les nutriments et en particulier par les acides aminés (Byfield et al. 2005) (voir Chapitre III.4. Signalisation des acides aminés).

En résumé, l'activation du récepteur de l'insuline conduit à la phosphorylation d'IRS1 qui est ensuite responsable du recrutement et de l'activation de la PI3K. Le PIP3 formé par l'action enzymatique de la PI3K de classe I, permet alors le recrutement au niveau de la membrane plasmique des protéines à domaine PH capables de lier le PIP3, comme les protéines PDK-1 (3-phosphoinositide-dependant protein kinase-1) et Akt, en vue de leur activation.

II.4. La phosphoinositide-dependant-kinase-1 (PDK-1)

En réponse à une stimulation insulinique, la production de PIP3 par la PI3-kinase permet le recrutement au niveau de la membrane plasmique de l'enzyme PDK-1 (Toker et al. 2000; Vanhaesebroeck et al. 2000) par le biais du domaine PH situé à proximité de son extrémité C-terminale (Cantrell 2001; Park et al. 2001) (Toker et al. 2000; Vanhaesebroeck et al. 2000) (Figure 5).

PDK-1 est une protéine d'environ 60-65kDa (556 acides aminés) considérée comme constitutivement active. En effet, son activité kinase mesurée *in vitro*, n'est affectée à la différence de celle de ses substrats Akt et S6K1 (p70 S6 kinase), ni par des traitements par des facteurs de croissance ni par des inhibiteurs pharmacologiques de la PI3K. Cependant, il a été démontré que l'activité de PDK1 pouvait être stimulée par l'insuline mais les mécanismes responsables de l'activation de PDK1 restent à éclaircir. La protéine PDK1 possède toutefois de multiples sites de phosphorylation (Casamayor et al. 1999; Wick et al. 2002). En réponse à l'insuline et de façon dépendante de la PI3K, PDK1 est phosphorylée sur la sérine 241 (Ser241) de la boucle d'activation de la kinase et sur la sérine 163 (Ser163) (Riojas et al. 2006) du domaine catalytique. Les tyrosines 9 (Tyr9) et 373/376 (Tyr 373/376) sont également phosphorylées en réponse à l'insuline (Park et al. 2001).

Les phosphoinositides ayant lié PDK1 au niveau de la membrane plasmique par le biais du domaine PH (Pleckstrin homology) de son extrémité C-terminale (Cantrell 2001; Park et al. 2001) attirent également Akt, une autre kinase à domaine PH impliquée dans la signalisation de l'insuline. Ce mécanisme co-localise les deux kinases au niveau de la membrane et rend ainsi possible la phosphorylation d'Akt par PDK-1 (Riojas et al. 2006; Toker et al. 2000).

II.5. Les protéines Kinases C atypiques (PKCa)

Les PKC forment une grande famille regroupée selon trois classes : les PKCs classiques (regroupant les isoformes α , β et γ), les nouvelles PKCs (regroupant les isoformes δ , ϵ , η , θ et μ) et les PKCs atypiques (regroupant les isoformes ζ , λ et ι) (Schmitz-Peiffer 2002). Alors que les formes classiques et nouvelles des PKC requièrent le diacylglycérol et/ou le calcium pour leur activation, les formes atypiques, insensibles au diacylglycérol et au calcium, nécessitent plutôt les PI(3,4,5)P3 (Farese 2002; Schmitz-Peiffer 2002). L'activation des PKCa par l'insuline, dépendante de la PI3K et induite par PDK-1, permet la stimulation du transport du glucose dans le muscle squelettique et les adipocytes (Farese 2002) (Figure 5). À l'état inactif, les PKC atypiques existent sous une forme repliée où la séquence du pseudo-substrat auto-inhibiteur de l'extrémité régulatrice N-terminale s'aligne avec le site de liaison au substrat de l'extrémité catalytique C-terminale (Farese 2002). Cette conformation prévient la phosphorylation de substrats mais également de la protéine elle-même (Farese 2002). L'activation des PKC atypiques requiert, en premier lieu, la liaison de PI(3,4,5)P3 sur certaine(s) région(s) non-définie(s) de l'extrémité régulatrice permettant ainsi un dépliement de la protéine. Ce changement de conformation des PKC atypiques les rend alors aptes à être phosphorylées par PDK-1 dans la boucle d'activation du domaine catalytique (Thr410 pour PKC- ζ et Thr403 pour PKC- λ) tout en permettant l'autophosphorylation et/ou la transphosphorylation de certains résidus thréonine à l'intérieur du domaine catalytique, dont Thr560 (Standaert et al. 2000; Standaert et al. 1999). Des travaux ont aussi suggéré que les PKC- ζ et λ interviendraient dans la

stimulation de S6K1, enzyme responsable de la stimulation de la synthèse protéique (Akimoto et al. 1998; Romanelli et al. 1999)

II.6. La protéine Akt (ou PKB)

La protéine Akt ou protéine kinase B est une sérine thréonine kinase de 57 kDa qui représente un nœud essentiel de la signalisation de l'insuline (Figure 5). C'est en effet à partir de cet élément que les voies de signalisation vont bifurquer pour permettre à l'insuline d'assurer ses différentes fonctions dans le transport du glucose, la synthèse du glycogène, la synthèse protéique, l'expression des gènes, etc... Les mammifères possèdent trois gènes Akt : Akt1, Akt2 et Akt3 (aussi nommés PKB α , PKB β et PKB γ) (Whiteman et al. 2002) codant pour trois isoformes d'Akt. Ces trois isoformes présentent toutefois une forte identité de séquence en acides aminés (Brazil et al. 2004) puisque Akt2 et Akt3 possèdent respectivement 81% et 83% d'homologie avec Akt1. Ces trois isoformes présentent une répartition tissulaire, une localisation sub-cellulaire et des cibles différentes et sont impliquées dans la régulation de différents processus biologiques. En effet, la délétion d'Akt1, présent dans la plupart des tissus, induit un retard de croissance et une réduction de l'espérance de vie (Chen et al. 2001), mais n'engendre pas d'anomalie métabolique (Cho et al. 2001b). Akt2 en revanche, est particulièrement présent dans les tissus sensibles à l'insuline comme le foie et le tissu adipeux (Chan et al. 1999). Ainsi, des souris déficientes en protéine Akt2 présentent une insulino-résistance et développent un diabète dû, au moins en partie, à l'incapacité de l'insuline à stimuler l'utilisation du glucose et à réprimer la production endogène de glucose par le foie (Cho et al. 2001a). De même, des adipocytes, issus d'animaux dont Akt2 a été invalidé, présentent une forte réduction de l'assimilation du glucose stimulée par l'insuline qui ne peut être compensée par une surexpression d'Akt1 (Bae et al. 2003). Enfin, Akt3, exprimé principalement au niveau du système nerveux, ne semble pas jouer de rôle majeur dans l'homéostasie glucidique mais exerce un effet sur le développement neuronal (Tschopp et al. 2005).

Les protéines Akt sont constituées d'un domaine PH situé à l'extrémité N-terminale de la protéine et d'un domaine catalytique présent dans la partie C-terminale. En situation d'inactivation, la protéine Akt se trouve principalement au niveau du cytosol mais elle est mobilisée vers la membrane plasmique lors d'une stimulation insulinique (Vanhaesebroeck et al. 2000). Ce processus requiert l'activation de la PI3K et la production de PI(3,4)P₂ et PI(3,4,5)P₃ nécessaire au recrutement de la protéine Akt au niveau de la membrane plasmique *via* son domaine PH, à l'instar de la PDK-1 (cf ci-dessus). Cette interaction entre le domaine PH d'Akt et les lipides membranaires conduit à un changement de conformation de la protéine Akt, permettant ainsi la phosphorylation de la thréonine 308 (Thr308) présente dans la boucle d'activation du domaine kinase, par la kinase PDK-1 (Vanhaesebroeck et al. 2000). Afin d'être pleinement active, Akt requiert également la

phosphorylation d'un autre résidu , la sérine 473 (Ser473) située dans l'extrémité régulatrice C-terminale , par le complexe TORC2 (target of rapamycin complex 2) {Sarbasov , 2005 #1755) dont nous reparlerons plus tard au cours de cette introduction.

Une fois activée, Akt participe à la régulation de nombreux processus biologiques en phosphorylant différents substrats (protéines kinases, protéines de signalisation et facteurs de transcription) impliqués dans de multiples cascades de signalisation, régulant le transport de glucose, la synthèse de glycogène, la prolifération et la survie cellulaire, ainsi que la synthèse protéique. En effet, Akt en phosphorylant AS160 (Akt Substrate of 160kDa), est à l'origine de la translocation du transporteur de glucose GLUT4 vers la membrane plasmique et permet la captation du glucose extracellulaire par les cellules musculaires et les adipocytes (Sano et al. 2003).

Sous stimulation insulinique, Akt induit également la phosphorylation de la protéine GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3), ce qui inactive l'enzyme dont le rôle est d'inhiber la glycogène synthase (enzyme impliquée dans la synthèse du glycogène), conduisant ainsi à l'augmentation de la synthèse de glycogène (Cross et al. 1995; Frame et al. 2001).

Akt est également impliquée dans la régulation de l'expression de nombreux gènes comme ceux de la néoglucogénèse et de la lipogénèse. Pour ce faire, Akt contrôle l'activité de différents facteurs de transcription et notamment ceux de la classe des forkhead (FOX) qui compte plus de 100 membres dont plusieurs sont cruciaux pour la médiation des effets de l'insuline (Taniguchi et al. 2006). Brièvement, sous forme non phosphorylée, FoxO1 (forkhead box 01) est localisé au niveau nucléaire et se fixe sur des séquences d'ADN situées sur les promoteurs des gènes cibles pour participer au contrôle de leur transcription. Une fois activé par l'insuline, le rôle d'Akt est de phosphoryler FoxO1 sur la sérine 256 (Ser 256), entraînant ainsi l'exclusion nucléaire de ce facteur et sa séquestration dans le cytoplasme (Taniguchi et al. 2006). L'inactivation de FoxO1 conduit ainsi à une diminution de l'expression des gènes cibles. Les mécanismes de régulation de l'expression des gènes du métabolisme par l'insuline, impliquant différents facteurs de transcriptions dont FoxO1 seront détaillés plus tard au cours de cette introduction (Partie B).

Enfin, en réponse à l'insuline, Akt active la voie TOR (target of rapamycine) qui joue un rôle central dans la régulation de la croissance cellulaire et de la synthèse protéique. Pour ce faire, **Akt phosphoryle et inactive le complexe TSC1-TSC2 (tuberous sclerosis complex 1 et 2) (Taniguchi et al. 2006) menant ainsi à l'activation de TOR et phosphoryle également directement TOR sur le résidu Ser2448 comme cela a été démontré *in vitro* (Nave et al. 1999).**

II.7. Le complexe TSC1/TSC2

Le complexe TSC1/TSC2 est un hétérodimère composé des protéines TSC1 (ou hamartine) et TSC2 (ou tubérine). Les gènes codant pour ces protéines ont été identifiés chez des patients souffrant du syndrome de sclérose tubéreuse (TSC - tuberous sclerosis), caractérisé par une croissance désordonnée de type dysembryoplasique dans de nombreux organes (Cheadle et al. 2000). TSC1 est une protéine de 130 kDa sans domaine catalytique et dont le rôle est de stabiliser le complexe formé par TSC1 et TSC2. TSC2 pour sa part, code pour une protéine de 200 kDa comprenant dans son extrémité C-terminale un domaine d'activation des protéines à activité GTPasique (GAP) (Maheshwar et al. 1997) comme la petite GTPase Rheb (Ras homologue enriched brain). Le complexe TSC1/TSC2 fonctionne comme un inhibiteur de TOR (Figure 5). **Lors d'une stimulation par l'insuline, TSC2 est directement phosphorylée par Akt. Cette phosphorylation perturbe l'interaction entre TSC2 et TSC1, déstabilise la protéine TSC2 et conduit à son inactivation. Ainsi, l'inactivation du complexe TSC1/TSC2 permet de lever l'inhibition infligée par ce complexe sur TOR.** En effet, le facteur d'initiation de la traduction 4E-BP1, phosphorylé par TOR, est hyper-phosphorylé dans les cellules déficientes en TSC1 (Kwiatkowski et al. 2002) ou TSC2 (Jaeschke et al. 2002) tandis que la surexpression de TSC2 inhibe l'activité de TOR et diminue la phosphorylation de 4E-BP1 (Inoki et al. 2002).

II.8. Rheb

Le complexe TSC1-TSC2 favorise l'activité GTPasique de la petite GTPase Rheb (Ras homologue enriched brain) et permet la transformation de Rheb GTP en Rheb GDP (Inoki et al. 2003; Tee et al. 2003). Rheb-GTP, la forme active de Rheb, permet l'activation directe de TOR (Long et al. 2005; Sancak et al. 2007) (Figure 5). En effet, la surexpression de la protéine Rheb dans des cellules de mammifères favorise l'activation de la voie TOR en absence de facteurs de croissance (Castro et al. 2003; Garami et al. 2003; Inoki et al. 2002; Tee et al. 2003), tandis que l'expression d'un ARN interférent diminuant l'expression de Rheb conduit à la diminution, dans les mêmes proportions, de la phosphorylation des protéines S6 kinases (Garami et al. 2003). Le mécanisme exact par lequel Rheb active TOR reste à élucider. **La protéine Rheb est donc un régulateur positif de TOR, agissant en aval du complexe TSC1-TSC2.**

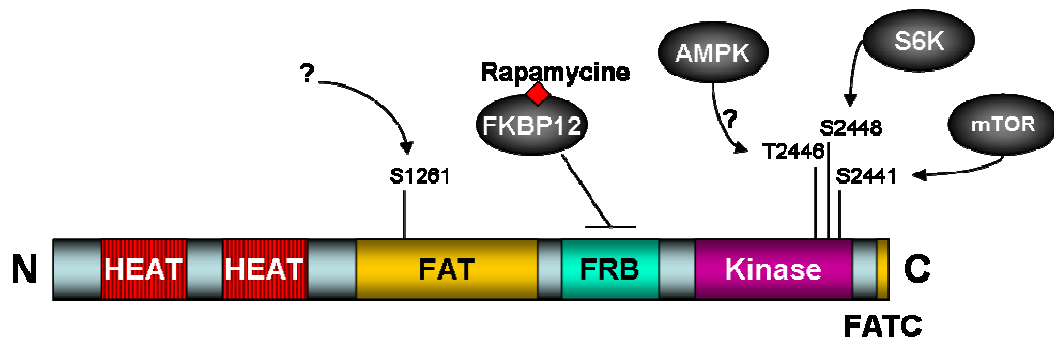


Figure 8 : Représentation schématique de la structure de mTOR (d'après Bai et al, 2010).

La partie N-terminale de la protéine se compose de plusieurs répétitions du motif HEAT, suivies du domaine FAT, du domaine FRB, du domaine kinase et finalement en C-terminal du domaine FATC. Le complexe FKBP12-Rapamycine se lie directement à TOR *via* le domaine FRB et inhibe la signalisation cellulaire qui se trouve en aval de TOR.

II.9. La protéine kinase TOR, un senseur métabolique

La protéine kinase TOR (abréviation anglaise de « target of rapamycin » ou cible de la rapamycine, en français) est une serine/thréonine kinase apparentée à la famille des protéines kinases reliées aux phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K) (PIKK, phosphatidylinositol kinase related protein kinase) mais à la différence des PI3K celle-ci ne phosphoryle pas les lipides (Abraham 2010). Chez la levure comme chez les mammifères, la voie de signalisation passant par TOR intègre les informations provenant de multiples signaux intra et extracellulaires et régule au niveau cellulaire, le métabolisme, la croissance, la prolifération, la survie, la synthèse protéique et la transcription.

La protéine TOR fût initialement identifiée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* lors d'un criblage pour la résistance à la rapamycine, une drogue isolée à partir de la bactérie du sol *Streptomyces hygroscopicus* aux propriétés immunosuppressives largement utilisées en médecine. En effet, le fait que des mutations sur les gènes TOR1 et TOR2 de cette levure confère une résistance aux effets toxiques de la rapamycine a permis d'identifier les protéines TOR comme des cibles potentielles de la rapamycine (Helliwell et al. 1994; Kunz et al. 1993; Lorenz et al. 1995). La rapamycine agit par la formation d'un complexe inhibiteur avec son récepteur intracellulaire FKBP12 (FK506-binding protein), qui se fixe à la région C-terminale de la protéine TOR au niveau du domaine FRB (FKB12-rapamycin binding), conduisant ainsi à l'inactivation de TOR (pour revue (Guertin et al. 2007)) (Figure 8).

Chez la levure, les gènes TOR1 et TOR2 codent pour les protéines TOR1 et TOR2 qui présentent 70% d'homologie de séquence en acides aminés. Le génome des métazoaires code en revanche pour une seule protéine TOR dont l'identité de séquence en acides aminés est respectivement d'environ 42 et 45% avec les protéines TOR1 et TOR2 des levures.

Chez les mammifères, la protéine mTOR (mammalian Target of rapamycin) est responsable de l'activité catalytique des deux complexes protéiques mTORC1 et mTORC2 qui seront décrits plus loin. mTOR est une protéine de haut poids moléculaire (environ 289 kDa) composée de 2549 acides aminés, qui comprend différents domaines très conservés (Figure 8). L'extrémité N-terminale de mTOR contient une répétition (jusqu'à 20 tandems) des motifs HEAT (Huntingtin, Elongation factor 3, A subunit of protein phosphatase 2A and TOR). Chaque répétition HEAT consiste en deux hélices α d'environ 40 acides aminés présentant chacune un patron spécifique de résidus hydrophobes et hydrophiles. Les répétitions HEAT en tandem sont présentes dans diverses protéines et seraient impliquées dans la médiation des interactions protéine-protéine. La partie C-terminale de mTOR porte le domaine kinase et contient également le domaine FRB (FKBP12-rapamycin binding) servant à la liaison du complexe FKBP12-rapamycine. De plus, mTOR comprend un domaine FAT (pour

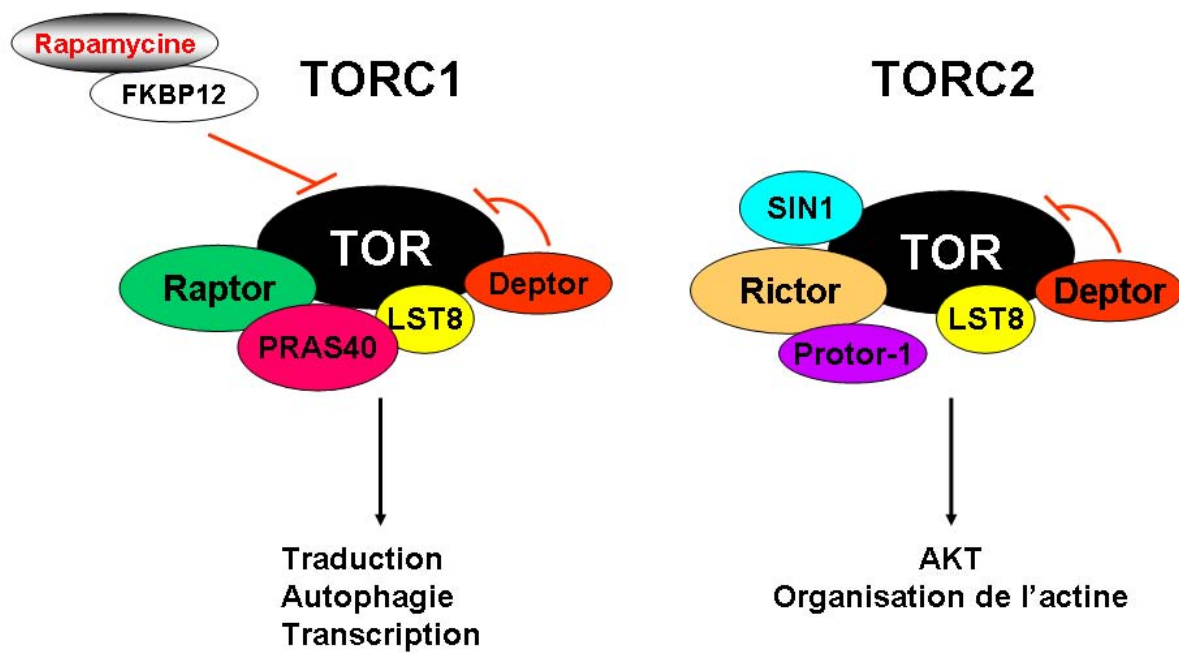


Figure 9 : Représentation schématique de la structure des complexes TORC1 et TORC2.

FRAP, ATM, TRAP) et un domaine FATC (domaine FAT en position C-terminale) (Jiang et al. 2006) composé des 30 derniers résidus de la protéine. Le domaine FATC est absolument nécessaire à l'activité de mTOR car la délétion d'un seul acide aminé de ce domaine abolit son activité (Peterson et al. 2000; Takahashi et al. 2000). Les domaines FAT et FATC interagiraient en induisant une conformation de la protéine qui expose le domaine catalytique à ses substrats. Enfin, mTOR contient un domaine régulateur négatif putatif (NRD) situé entre le domaine kinase et le domaine FATC (Hay et al. 2004).

La protéine TOR peut être phosphorylée sur de multiples sites incluant les résidus sérine 2448 (Ser2448) et 2481 (Ser2481), la thréonine 2446 (Thr2446) et la sérine 1261 (Ser1261) (Bai et al. 2010). La phosphorylation de la sérine 2448 est induite par la protéine Akt en réponse à l'insuline (Hay et al. 2004; Nave et al. 1999) mais également par la p70 protéine S6 kinase 1 (S6K1). Cette phosphorylation du site Ser2448 se produit essentiellement sur mTOR au sein du complexe mTORC1 (Chiang et al. 2005; Copp et al. 2009; Holz et al. 2005). Le résidu Ser2481 est un site d'autophosphorylation. La phosphorylation de ce site intervient principalement sur mTOR au sein du complexe TORC2 et est insensible à un traitement à la rapamycine (Copp et al. 2009; Peterson et al. 2000). La Thr2446 semble être phosphorylée par la protéine AMPK (cAMP activated protein kinase). Le niveau de phosphorylation de ce résidu augmente lors d'un retrait des nutriments et diminue lors d'une stimulation par l'insuline (Cheng et al. 2004). Enfin, la Ser1261, identifiée récemment, est un site dont la phosphorylation semble promouvoir l'activité de mTORC1 et être requise pour l'autophosphorylation de mTOR sur la Ser2481 (Acosta-Jaquez et al. 2009).

Chez la levure, les protéines TOR 1 et TOR 2 sont respectivement impliquées dans les complexes TORC1 et TORC2. Le complexe protéique TORC1 contrôle la masse cellulaire en régulant notamment la biosynthèse des ribosomes. Le complexe TORC2 est responsable du contrôle spatial et de la croissance cellulaire par l'intermédiaire de la voie de signalisation dépendant des Rho GTPase qui contrôle la formation du cytosquelette d'actine. Chez les mammifères, il existe l'équivalent de ces deux complexes communément nommés mTORC1 et mTORC2. Ces complexes sont formés de l'unique protéine mTOR associée à différents partenaires.

II.9.1 TORC1

Le complexe TORC1, est la forme dite sensible à la rapamycine. Il est composé de cinq éléments : TOR qui correspond à la sous unité catalytique du complexe, Raptor (regulatory-associated protein of TOR), LST8 (lethal with Sec13 protein 8, aussi connu sous le nom de GβL), PRAS 40 (proline-riche Akt substrate 40kDa) et Deptor (DEP-domain-containing TOR-interacting protein) (Peterson et al. 2009) (Figure 9). Raptor est indispensable à l'activité de TOR (Hara et al. 2002). Il intervient dans

l'assemblage du complexe TORC1 et le recrutement des différentes protéines cibles de TOR (Kim et al. 2003; Kim et al. 2002). L'inactivation de Raptor par knock-down conduit à l'inhibition de l'activité de TOR, suggérant une régulation positive de Raptor sur TOR (Hara et al. 2002; Kim et al. 2002). Raptor est également soumis à une phosphorylation sur de multiples sites. En effet, une étude récente (Foster et al. 2010) démontre l'importance de ces phosphorylations en réponse à une stimulation par l'insuline mais également par les acides aminés. Ainsi, l'activation de la voie PI3K induit la phosphorylation de raptor sur le résidu Ser863 de façon sensible à la rapamycine. Cette phosphorylation entraîne ensuite la phosphorylation séquentielle de raptor sur d'autres sites (Ser859 et Ser855). Cette phosphorylation complexe de raptor fonctionnerait comme un modulateur de la signalisation TORC1. En effet, dans le cas d'un complexe TORC1 où raptor présente des sites de phosphorylation défectueux, une réduction de l'activité kinase de TOR envers son effecteur 4E-BP1 a été observée. Le rôle de la protéine LST8 au sein du complexe TORC1 reste flou. En effet, LST8 interagit spécifiquement avec le domaine kinase de TOR et induit son activité kinase (Kim et al. 2003) mais, *in vivo*, la perte de cette protéine n'affecte pas l'activité de TORC1 (Guertin et al. 2006). Enfin, PRAS40 et Deptor ont été caractérisés comme des régulateurs négatifs de TORC1 (Peterson et al. 2009; Sancak et al. 2007; Vander Haar et al. 2007). Lorsque l'activité de TORC1 est réduite, PRAS40 et Deptor sont recrutés par le complexe, et l'inhibent. De plus, il a été suggéré que PRAS40 pouvait réguler l'activité kinase de TORC1 en inhibant la liaison des substrats (Wang et al. 2007). Lorsqu'il est activé, TORC1 phosphoryle directement PRAS40 et Deptor, réduisant ainsi leur interaction physique avec le complexe, ce qui entraîne l'activation de la voie de signalisation TOR (Peterson et al. 2009; Wang et al. 2007).

Comme décrit précédemment, l'activation de la voie de signalisation de l'insuline conduit à l'activation de la protéine Akt qui d'une part, phosphoryle et inactive le complexe TSC1/TSC2, et d'autre part, phosphoryle mTOR sur le résidu Ser2448 (Hay et al. 2004; Nave et al. 1999). Une fois activé, TORC1 initie la synthèse protéique en phosphorylant deux effecteurs majeurs impliqués dans la régulation de la traduction protéique : une protéine inhibitrice de l'initiation de la traduction 4E-BP1 (Eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1) et la protéine S6K1 (p₇₀ ribosomal S6 kinase 1) impliquée dans la phosphorylation de la protéine ribosomale S6. L'état de phosphorylation des protéines S6K1 et 4E-BP1 est considéré comme un bon indicateur de l'activité de TORC1.

II.9.2.TORC2

Le complexe TORC2 comprend six protéines différentes, dont certaines sont communes à TORC1 : TOR, Rictor (rapamycin-insensitive companion of TOR), SIN1 (stress-activated protein kinase-interacting protein 1), PRR5 (proline-rich repeat protein-5, aussi connu sous le nom de protor), LST8

et Deptor (Figure 9). L'association entre Rictor et TOR est requise pour l'induction de l'activité kinase de TORC2. De plus, cette association nécessite la présence de LST8 et SIN1, rendant ces deux protéines indispensables au fonctionnement de TORC2 (Guertin et al. 2006; Jacinto et al. 2006; Sarbassov et al. 2005; Yang et al. 2006). Rictor interagit également avec PRR5, mais la fonction physiologique de cette interaction est mal connue (Thedieck et al. 2007; Woo et al. 2007). Comme pour TORC1, Deptor inhibe l'activité de TORC2 (Peterson et al. 2009). Jusqu'à présent, Deptor est le seul inhibiteur endogène connu de TORC2. Enfin, LST8 est essentiel pour le fonctionnement de TORC2. En effet, l'invalidation de LST8 par knockout réduit drastiquement la stabilité et l'activité du complexe TORC2 (Guertin et al. 2006).

Contrairement à son effet sur TORC1, le complexe FKBP12-rapamycine ne peut interagir directement avec le complexe TORC2 pour l'inhiber (Jacinto et al. 2004; Sarbassov et al. 2004). TORC2 est donc communément caractérisé comme insensible à la rapamycine. Cependant, un traitement prolongé (de l'ordre de 24h) avec de la rapamycine inhibe l'activité de TORC2 en empêchant probablement l'assemblage du complexe (Sarbassov et al. 2006).

Deux fonctions majeures sont reconnues pour TORC2. Ce complexe régule Akt, mais également la croissance cellulaire en agissant sur le cytosquelette (Jacinto et al. 2004). Comme mentionné précédemment, TORC2 phosphoryle Akt sur la sérine 473 (Ser473) située dans l'extrémité régulatrice C-terminale de la protéine. Cette phosphorylation sur Ser473, couplée à la phosphorylation sur Thr308 par PDK1 conduit à l'activation totale de la protéine Akt (Sarbassov et al. 2005). L'inactivation de différents composants de TORC2, tels que Rictor et SIN1, bloque la phosphorylation d'Akt sur Ser473 et de certains substrats d'Akt (Guertin et al. 2006; Jacinto et al. 2006).

II.10. Les effecteurs de TORC1

Les deux principales cibles de TORC1 sont des régulateurs de l'activité traductionnelle : les protéines 4E-BP1 et S6K1, mais d'autres cibles intervenant dans les mécanismes de régulation de la croissance ont aussi été décrites. **En réponse à l'insuline et aux acides aminés, la protéine kinase TOR phosphoryle ces deux substrats induisant l'inhibition de 4E-BP1 et l'activation de S6K1.**

II.10.1 Les protéines 4E-BP, régulatrices de l'initiation de la traduction

Chez les mammifères, la famille des protéines de liaisons 4E-BP compte trois protéines de faible poids moléculaire, 4E-BP1, 4E-BP2 et 4E-BP3 codées par trois gènes distincts (Yoshizawa 2004). Seul 4E-BP1 est bien caractérisé et agit comme un inhibiteur compétitif de la formation du complexe

eIF4G et eIF4E, deux facteurs impliqués dans la phase d'initiation de la traduction des protéines (Hay et al. 2004). En effet, la première étape de la traduction correspond à la fixation du facteur d'initiation de la traduction eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) sur l'extrémité 5' des ARNm. Ce facteur d'initiation de la traduction permet le recrutement des ribosomes sur l'ARNm, *via* d'autres facteurs tels que eIF4G, eIF4A, et eIF3 (Gingras et al. 1999). Cette première étape de la traduction est réprimée par 4E-BP1. Les protéines 4E-BP1 et eIF4G entrent en compétition pour leur association avec eIF4E (Ptushkina et al. 1999). L'activité de 4E-BP1 est régulée par son état de phosphorylation induit par la protéine mTOR. Ainsi, lorsque l'activité de TOR est faible, les formes hypophosphorylées de 4E-BP1 se lient avec une forte affinité à eIF4E. A l'inverse, lorsque l'activité de TOR augmente, 4E-BP1 est alors phosphorylé voire hyperphosphorylé empêchant son interaction avec eIF4. **Ainsi, suite à la phosphorylation de la protéine 4E-BP1 par mTOR, le facteur d'initiation de la traduction eIF4E libéré peut se fixer à eIF4G et permettre alors l'initiation de la traduction *via* la formation du complexe eIF4F actif, puis du complexe de pré-initiation 48S.**

II.10.2. La protéine S6 kinase

La protéine S6 kinase (S6K) est une sérine/thréonine kinase qui appartient au groupe des AGC (protéines kinases A, G et C, cAMP-dependent protein kinase, cGMP-dependent protein kinase and protein kinase C) (Hanks et al. 1995). **Elle est impliquée dans la phosphorylation de la protéine ribosomale S6.** Chez la drosophile comme chez les mammifères, les protéines S6 kinases, cibles directes de TOR sont des enzymes clés de la régulation de la croissance cellulaire.

Deux homologues de S6K, codés par deux gènes différents, ont été identifiés : S6K1 et S6K2 (Shima et al. 1998). Le gène S6K1 code pour deux isoformes nommées p_{70} S6K1 (couramment nommée S6K1) et la p_{85} S6K1 générées à partir d'un même transcrit par l'utilisation alternative de deux codons d'initiation de la traduction différents (pour revue (Pullen et al. 1997)). Les deux isoformes sont identiques dans leurs séquences en acides aminés à l'exception d'une extension de 23 acides aminés à l'extrémité N-terminale de la p_{85} S6K. Cette extension contient une séquence signal de localisation nucléaire (NLS, nucleus localisation signal) qui permet la localisation de la protéine p_{85} S6K au niveau du noyau alors que l'isoforme p_{70} S6K1 (S6K1) est cytoplasmique (Grove et al. 1991; Reinhard et al. 1994). Il existe deux isoformes de S6K2, p_{60} S6K2 β 1 (495 acides aminés) et p_{54} S6K2 β 2 (482 acides aminés) codées par un gène unique S6K2 (Phin et al. 2003). Comme pour S6K1, les deux isoformes protéiques de S6K2 sont issues de l'utilisation alternative de deux sites d'initiation de la traduction différents (Phin et al. 2003). Ces deux isoformes sont détectées essentiellement dans le noyau du fait de la présence du signal de localisation nucléaire dans la région C-terminale des deux protéines (Koh et al. 1999; Valovka et al. 2003). Au cours de ce travail

de thèse, nous nous sommes intéressés à l'isoforme $p70$ S6K1 que nous appellerons tout au long du manuscrit S6K1.

Les protéines S6K ont en commun quatre domaines principaux. Le motif TOS (pour TOR signalling motif) situé dans l'extrémité N-terminale est essentiel pour l'interaction avec TOR (Schalm et al. 2002). En effet, la perte ou la mutation de ce motif TOS inhibe significativement l'activation et la phosphorylation sur la Thr389 de S6K1 par TOR. La mutation du motif TOS mime les effets de la rapamycine, c'est à dire l'inhibition de l'activité de TOR et donc celle de S6K1 (Schalm et al. 2002). Les S6K contiennent également un domaine catalytique, incluant le site de phosphorylation Thr229/Thr228 (S6K1/S6K2) dans la boucle d'activation puis un site de liaison qui relie le domaine catalytique à l'extrémité C-terminale de la protéine. Ce site de liaison contient les sites de phosphorylation Ser371/Ser370, Thr389/Thr388 (S6K1/S6K2) et Ser404 (S6K1). Enfin, la région C-terminale de la protéine S6K comporte un domaine pseudo-substrat, similaire à la région contenant les sites de phosphorylation de la protéine ribosomale S6. Ce domaine pseudo-substrat possède une propriété d'auto-inhibition et supporte plusieurs sites groupés de phosphorylation Ser411/Ser410, Ser418/Ser417, Ser 424/Ser 423 (S6K1/S6K2) et Thr421 (S6K1) (Phin et al. 2003; Pullen et al. 1997). Les phosphorylations de S6K1 sur le résidu Thr229 dans le domaine catalytique ainsi que sur les résidus Ser371 et Thr389 dans le domaine de liaison sont considérées comme critiques pour l'activation de la fonction kinase (Pullen et al. 1997; Saitoh et al. 2002). En effet, le remplacement de chacun de ces trois sites par un résidu alanine abolit l'activité de la kinase (Saitoh et al. 2002).

Les mécanismes d'activation de la S6K1 sont très complexes et impliquent de multiples étapes de phosphorylation sur résidus sérine et thréonine par les kinases en amont. Le modèle communément admis est le suivant : les quatre résidus Ser411, Ser418, Thr421 et Ser424 situés dans le domaine pseudosubstrat autoinhibiteur sont phosphorylés en premier (Phin et al. 2003). Ces phosphorylations induisent alors des changements de conformation de la protéine qui permettent l'accès des sites Ser371 et Thr389 et leur phosphorylation par des kinases en amont impliquées dans la voie TOR (Phin et al. 2003; Saitoh et al. 2002). La Ser371 régule la phosphorylation de la Thr389 (Saitoh et al. 2002). Ces phosphorylations et changements de conformation permettent l'accès à la Thr 229, située dans la boucle d'activation, qui est alors phosphorylée par PDK1, rendant ainsi la kinase totalement active (Phin et al. 2003; Pullen et al. 1997).

La phosphorylation et l'activité de la S6K1 sont contrôlées par l'insuline et les acides aminés *in vitro* et *in vivo*. L'activité de la $p70$ SK6 peut être abolie par déphosphorylation de sites spécifiques soit par traitement à la rapamycine (qui va se lier à TOR et ainsi inhiber son activité kinase), soit par privation en acides aminés (Dufner et al. 1999). Un autre mécanisme conduisant à la déphosphorylation de la S6K1 est l'activation d'une sérine/thréonine phosphatase qui déphosphoryle la S6K1 au niveau de

ses sites régulateurs. Il a été montré que la surexpression de SHIP2 dans des adipocytes 3T3-L1 conduisait à l'inhibition de la phosphorylation d'Akt et de S6K1 ainsi que de la synthèse protéique (Murakami et al. 2004). De ce fait, la phosphatase SHIP2 pourrait jouer un rôle important dans la régulation de la voie de signalisation de l'insuline conduisant à la synthèse protéique.

II.10.3. La protéine ribosomale S6

La protéine ribosomale S6 (S6), de faible poids moléculaire (30-32 kDa), est l'une des 33 protéines de la petite sous unité 40S du ribosome. **Cette protéine est l'un des substrats de S6K1.** La phosphorylation de la protéine ribosomale S6 par S6K1 a été longtemps associée à l'induction de la traduction préférentielle d'une famille d'ARNm, nommés ARNm 5'TOP qui possèdent une région terminale riche en pyrimidine (TOP : terminal oligopyrimidine tract). Les ARNm 5'TOP codent pour des protéines impliquées dans la machinerie traductionnelle, comme les protéines ribosomales et les facteurs d'élongation. L'activation de la traduction des ARNm 5'TOP pourrait donc résulter en une augmentation de la capacité à synthétiser les protéines. Ce rôle de la protéine S6 est aujourd'hui controversé (Proud 2007). En effet, les résultats obtenus à partir de cellules invalidées pour les gènes S6K (Pende et al. 2004) ou exprimant une protéine ribosomale S6 présentant une mutation en alanine de ses cinq sites de phosphorylation (Ruvinsky et al. 2005) démontrent que ni la phosphorylation des protéines S6K ni celle de la protéine ribosomale S6 n'est indispensable au contrôle de la traduction des ARNm 5'TOP.

La phosphorylation de la protéine S6 est stimulée par les signaux mitogéniques, l'insuline et les acides aminés. La protéine ribosomale S6 est séquentiellement phosphorylée sur 5 à 7 résidus sérine carboxy terminaux, Ser 235/Ser236, Ser 240, Ser 242, Ser 244, Ser 246, Ser 247 (Ferrari et al. 1991; Krieg et al. 1988). Son état de phosphorylation est modulé par les activités opposées des protéines kinases et protéines phosphatases. Les protéines S6 kinases ne sont cependant pas les seules kinases responsables de la phosphorylation de la protéine S6. En effet, dans des cellules déficientes pour les deux gènes S6 kinases, la protéine S6 conserve deux sites phosphorylés en présence d'insuline (Pende et al. 2004), suggérant l'existence d'une S6 kinase indépendante de S6K1 et S6K2. La kinase p_{90} RSK, dépendante de la voie MAPK (mitogens activated protein kinase), et responsable de la phosphorylation de la protéine S6 au cours de la maturation des oocytes de *Xenopus laevis* en réponse à la progestérone (Erikson et al. 1989), pourrait permettre la phosphorylation résiduelle de S6 (Pende et al. 2004). Ces résultats révèlent une redondance entre les voies S6 kinase et MAP kinases, pour la médiation de la phosphorylation de la S6.

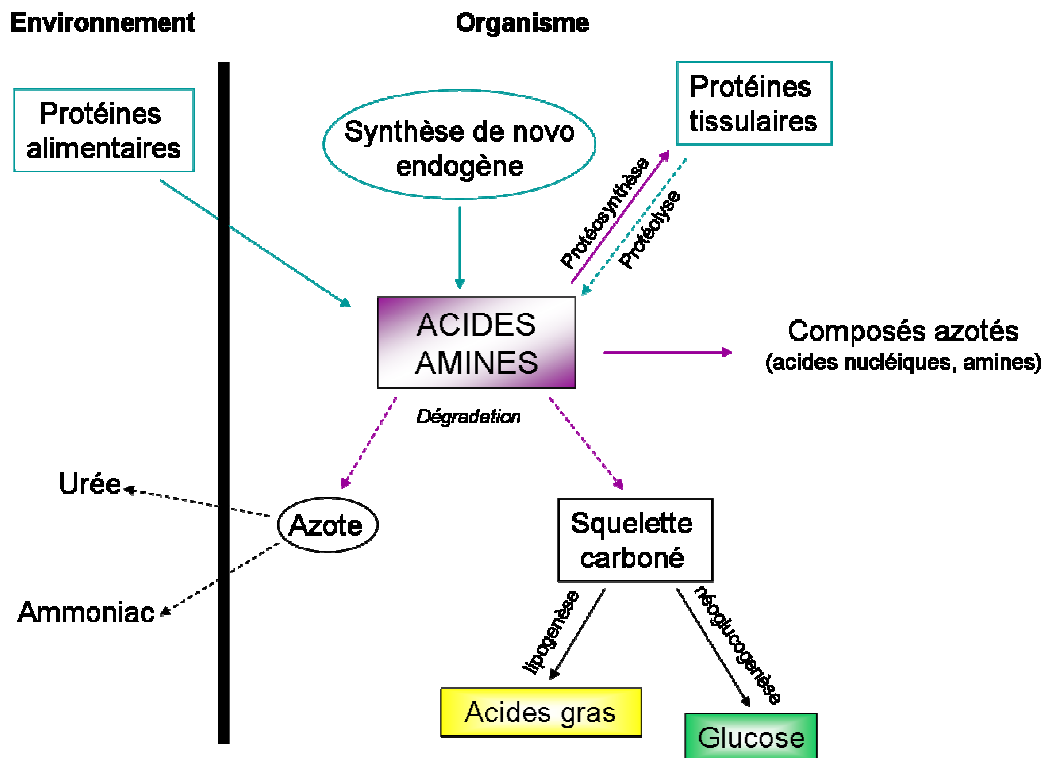


Figure 10 : Origine et devenir des acides aminés dans l'organisme.

III. Les acides aminés : description et rôles

Les acides aminés sont des molécules organiques possédant un squelette carboné et deux fonctions : une amine (-NH_2) et un acide carboxylique (-COOH). Les acides aminés peuvent être classés selon leur structure, selon leur devenir métabolique (gluconéogénique ou céto-génique) ou selon leur capacité à être synthétisés par l'organisme.

Par rapport aux autres macronutriments (lipides, glucides), les acides aminés présentent deux caractéristiques qui rendent leur équilibre dans l'organisme dépendant des apports nutritionnels. D'une part, du point de vue métabolique, on distingue les acides aminés non essentiels qui peuvent être synthétisés *de novo* par l'organisme, des acides aminés essentiels qui ne peuvent être synthétisés par les cellules et doivent donc être apportés par l'alimentation. Chez l'espèce humaine, huit acides aminés sont essentiels : la méthionine, la lysine, la phénylalanine, la thréonine, le tryptophane et les trois acides aminés à chaînes ramifiées, c'est-à-dire la leucine, l'isoleucine et la valine. La nature des acides aminés essentiels peut néanmoins varier selon les espèces. D'autre part, les acides aminés libres ne peuvent pas être stockés dans les tissus contrairement au glucose qui peut être conservé sous forme de glycogène dans le foie et le muscle ou aux acides gras qui peuvent être stockés sous forme de triglycérides dans le foie et le tissu adipeux principalement. L'ingestion régulière d'un apport protéique équilibré en acides aminés est donc indispensable.

Le pool des acides aminés et celui des protéines sont en équilibre dynamique. Les facteurs conditionnant cet équilibre sont le flux d'acides aminés à partir des protéines alimentaires, la synthèse des acides aminés *de novo* (acides aminés non et semi-essentiels), la synthèse et l'hydrolyse (protéolyse) des protéines corporelles (turn-over protéique) et enfin l'oxydation des acides aminés à des fins énergétiques. Les acides aminés sont également impliqués dans le métabolisme intermédiaire. En effet, lors du catabolisme des acides aminés, leur squelette carboné peut servir à la synthèse d'autres composés azotés, comme les nucléotides ou les amines, mais aussi à la synthèse d'acides gras (lipogénèse) ou de glucose (néoglucogénèse). Chez les poissons comme chez les mammifères, le foie est le site principal de la dégradation des acides aminés (Figure 10).

Les acides aminés sont donc les substrats de la synthèse protéique et stimulent la synthèse protéique *in vitro* et *in vivo* (Balage et al. 2001; Kimball et al. 2002). Parmi l'ensemble des acides aminés, ceux à chaîne ramifiée, et plus particulièrement la leucine, sont les plus impliqués dans la régulation de la synthèse protéique (Crozier et al. 2005; Kimball et al. 2006b; Proud 2004). En effet l'injection d'un mélange contenant tous les acides aminés sauf ceux à chaîne ramifiée n'a aucun effet sur la synthèse protéique (Kimball et al. 2006b). En revanche, la leucine seule active *in vivo* la

synthèse protéique et l'initiation de la traduction des protéines aussi efficacement qu'un repas complet, sans augmentation de la concentration plasmatique de l'insuline (Proud 2002).

Récemment, les acides aminés ont également été impliqués dans la régulation de l'expression génique et le contrôle de certaines fonctions physiologiques *via* l'activation de différentes voies de signalisation cellulaire. Il existe différents mécanismes permettant de répondre aux variations de l'apport alimentaire. Les cellules sont en effet capables d'estimer la disponibilité de certains nutriments et d'y répondre en déclenchant différents mécanismes cellulaires. Dans le cas particulier des acides aminés, deux voies essentielles de réponse aux variations de concentration en acides aminés sont connues. Il s'agit des voies impliquant respectivement les protéines kinases mTOR et GCN2 (General Control Non-repressible 2) ; ces deux voies étant capables de réguler la synthèse des protéines de façons opposées (Figure 5). Ainsi, lorsque les acides aminés sont en quantité suffisante, ceux-ci contrôlent positivement la phase d'initiation de la traduction des ARNm en activant la voie de signalisation TOR, commune à l'insuline (Avruch et al. 2009; Kim 2009; Laplante et al. 2009). Le deuxième mécanisme détecte spécifiquement les déficits en acides aminés, ce qui stimule la voie de réponse aux acides aminés (AAR, amino acid response) par le biais de la protéine GCN2 (Kilberg et al. 2009; Zhang et al. 2002).

IV. Signalisation des acides aminés

Les cellules eucaryotes possèdent une large gamme de transporteurs d'acides aminés qui permettent de moduler la concentration et la composition du pool intracellulaire d'acides aminés libres. Certains d'entre eux permettent de faire entrer les acides aminés à l'intérieur de la cellule et d'autres facilitent la sortie des acides aminés par des mécanismes de contre-échanges (Palacin et al. 1998). Par exemple, il a été récemment démontré que la leucine serait transportée dans la cellule de façon dépendante de la glutamine (Nicklin et al. 2009). Les transporteurs d'acides aminés étaient initialement classés sur la base de différentes caractéristiques telles que la spécificité de substrat, le mécanisme de transport (dépendant de certains ions) et leur mode de régulation (Hyde et al. 2003). Cependant, au cours de la dernière décennie, des progrès significatifs quant à l'identification moléculaire des protéines de transporteur ont été réalisés et ont mené à une meilleure connaissance de leur rôle fonctionnel dans des cellules où elles sont exprimées. Les transporteurs d'acides aminés qui ont maintenant été clonés ont été re-classifiés et organisés dans plusieurs familles appartenant au groupe des protéines de transport membranaire solute-linked carrier (SLC) (Hyde et al. 2007).

A ce jour aucun récepteur des acides aminés à proprement parlé n'a été identifié. En effet, il semblerait que les transporteurs des acides aminés exercent en fait une double fonction de transporteur et de récepteur des acides aminés (Hundal et al. 2009; Taylor 2009). Ce type de

transporteur/récepteur à été décrit chez les eucaryotes inférieurs tels que la levure (Donaton et al. 2003) et la drosophile (Goberdhan et al. 2005). Il semblerait également que, chez les mammifères, certains récepteurs aux acides aminés (par exemple, SNAT2, sodium-coupled neutral amino acids transporter 2) soient capables de réguler les voies de signalisation des acides aminés non seulement par leur capacité à modifier la concentration des acides aminés intracellulaires, mais également grâce à leur sensibilité aux changements de disponibilité des acides aminés extracellulaires (Hyde et al. 2007).

IV.1. Acides aminés et activation de la voie de signalisation TOR

Les acides aminés régulent la synthèse protéique par un effet signal participant à l'activation du complexe TORC1 et de ses effecteurs 4E-BP1 et S6K1 (pour revue (Guertin et al. 2007)) (Figure 5). L'activation de mTORC1 par les acides aminés, à la différence de l'insuline, est connue pour être indépendante du complexe TSC1/TSC2. En effet, dans des cellules dépourvues de TSC1 ou TSC2, la voie de signalisation mTORC1 reste sensible aux acides aminés (Nobukuni et al. 2005). En revanche, Rheb est nécessaire à l'activation de mTORC1 par les acides aminés (Kim et al. 2008; Sancak et al. 2008). Le mécanisme par lesquels les acides aminés intracellulaires activent mTORC1 est resté obscur pendant de nombreuses années. Plusieurs mécanismes d'activation de la voie de signalisation mTORC1 par les acides aminés sont aujourd'hui connus impliquant différentes protéines telles que Vps34, MAP4K3 et Rag.

IV.1.1. Vps34

La protéine Vps34 est une PI3K de classe III (décrite dans le paragraphe III.2.3.) qui, associée à une autre kinase, la Vps15, forme un complexe actif qui génère du PI3P à partir du phosphoinositol (pour revue (Backer 2008)). La protéine Vps34 fût la première protéine décrite comme véhiculant l'effet signal des acides aminés jusqu'au complexe TORC1 (Nobukuni et al. 2005) (Figure 5). Il a été démontré que la surexpression de Vps34, ou de sa protéine associée Vps15, entraînait l'activation de S6K1, un des effecteurs de mTORC1, cet effet étant indépendant d'une stimulation insulinique (Byfield et al. 2005; Nobukuni et al. 2005). De plus, l'activité de la Vps34 est inhibée dans le cas d'une privation en acides aminés ou glucose, mais n'est cependant pas modifiée par un traitement à la rapamycine (Byfield et al. 2005). Ces données suggèrent que la protéine Vps34 jouerait le rôle d'un centre intégrateur des différents signaux en amont de TORC1. Cependant, il semble que les acides aminés ne régulent pas directement l'activité de Vps34. En effet, des travaux récents ont montré que l'activation de TORC1 par les acides aminés coïncidait avec une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium Ca^{2+} (Gulati et al. 2008). Gulati et ses collaborateurs ont

montré que cette augmentation de Ca^{2+} était en fait nécessaire et suffisante pour induire l'activation de TORC1. De façon intéressante, l'activation de TORC1 dépendante du calcium intracellulaire est diminuée lorsque les niveaux d'expression de Vps34 sont réprimés par siRNA knockdown, suggérant que cette activation nécessite Vps34 (Gulati et al. 2008). Puisque Vps34 contient un domaine putatif de liaison au Ca^{2+} /CaM (calmoduline), il est possible que le Ca^{2+} et CaM puissent se lier à Vps34 et réguler ainsi son activité. De plus, Gulati et al ont montré que CaM se lie directement à Vps34 en présence de Ca^{2+} , et cette liaison est nécessaire à l'activité lipide kinase de Vps34. **Ces résultats compilés supportent le modèle selon lequel les acides aminés stimulent l'activité de TORC1 par l'activation de Vps34 dépendante du Ca^{2+} .**

IV.1.2. MAP4K3

Findlay et ses collaborateurs (2007), ont identifié la protéine kinase MAP4K3 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3) comme étant une protéine intracellulaire importante dans la voie de signalisation mTORC1 sensible aux acides aminés (Figure 5). En effet, l'inactivation de la MAP4K3 supprime la phosphorylation de S6K1 et 4E-BP1 alors que sa surexpression augmente la phosphorylation de S6K1 de façon PI3K-indépendante mais sensible à la rapamycine (Findlay et al. 2007). L'activité de la MAP4K3 est réduite lors d'une privation en acides aminés puis est restaurée par l'ajout d'acides aminés. L'activité de la MAP4K3 est insensible à l'insuline et à la rapamycine. Le site d'action de la MAP4K3 et son rôle physiologique dans la régulation de mTORC1 restent à élucider.

IV.1.3. Rag GTPases

Récemment, deux équipes ont démontré que les petites GTPase Rag (Ras-related GTPase) jouaient un rôle important dans la voie signalisation des acides aminés conduisant à l'activation de mTORC1 (Kim et al. 2008; Sancak et al. 2008). Quatre protéines Rag ont été identifiées chez les mammifères, RagA, RagB, RagC et RagD (Sekiguchi et al. 2001). Ces protéines présentent de très fortes homologues entre elles et plus exactement entre RagA et RagB d'une part et RagC et RagD d'autre part (Bun-Ya et al. 1992; Hirose et al. 1998; Schürmann et al. 1995). Les Rag GTPase fonctionnent comme des hétérodimères composés d'une première sous unité formée de RagA ou RagB liée au GTP (RagA/B GTP) et d'une seconde formée de RagC ou de RagD liée au GDP (RagC/DGDP) (Sancak et al. 2008). Les protéines Rag peuvent interagir avec raptor mais pas avec rictor, ce qui les associe plus particulièrement au complexe mTORC1 (Sancak et al. 2008). Dans les cellules mammifères, en l'absence d'acides aminés, mTORC1 est localisé dans le cytoplasme (Sancak et al. 2008). Sancak et al (2008), ont démontré, dans un premier temps, que les

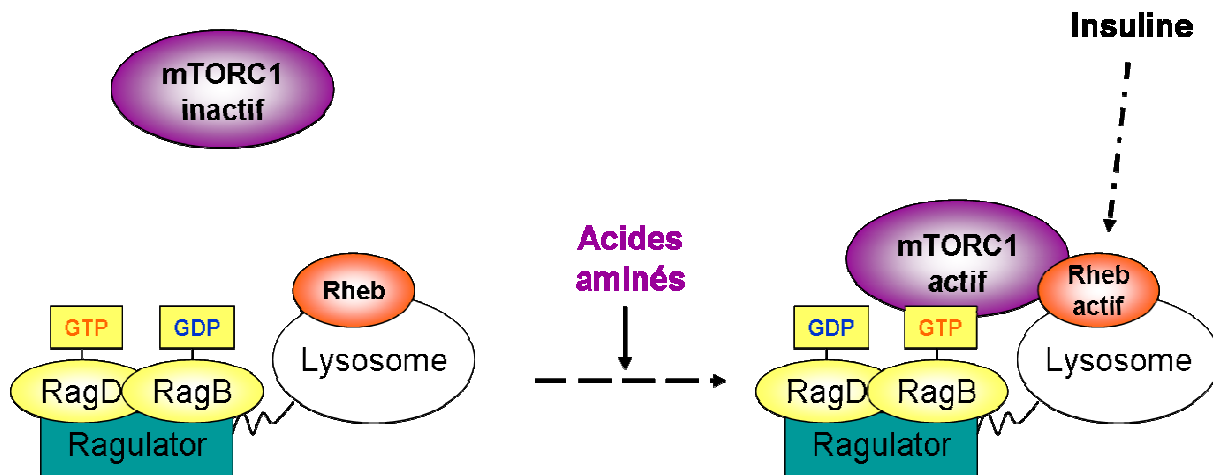


Figure 11 : Modèle présentant le rôle du complexe Ragulator – Rag dans l'activation de mTORC1 (adapté de Sancak et al, 2010).

acides aminés sont capables de stimuler la liaison de RagA/B au GTP permettant ainsi son interaction avec la protéine raptor au sein du complexe mTORC1. Ils démontrèrent également que l'activation de la voie mTORC1 par les acides aminés était associée à la relocalisation de mTORC1 au niveau des compartiments endosomaux et lysosomaux (Sancak et al. 2008) où est localisé Rheb, protéine activatrice du complexe mTORC1 (Buerger et al. 2006; Takahashi et al. 2005). Plus récemment, cette même équipe, a montré que les acides aminés entraînent la relocalisation de mTORC1 au niveau de la surface des lysosomes qui se trouve être également le lieu de résidence des protéines Rag (Sancak et al. 2010). Les protéines Rag sont recrutées à la surface du lysosome par un complexe de trois protéines nommé Ragulator (Sancak et al. 2010). Ainsi, un modèle concernant le rôle des acides aminés et du complexe Ragulator-Rag a été proposé : en présence d'acides aminés, les Rag GTPase, attachées à la surface du lysosome par le complexe Ragulator, serviraient de point d'encrage à mTORC1, qui deviendrait alors accessible à son activateur Rheb (Figure 11).

Ainsi, l'insuline et les acides aminés présenteraient des rôles spécifiques et complémentaires dans l'activation de mTORC1. L'insuline par inhibition du complexe TSC1/TSC2 induirait l'activation de Rheb et les acides aminés par l'intermédiaire des protéines Rag présenteraient mTORC1 à la protéine Rheb activée. Ce modèle expliquerait pourquoi mTORC1 ne peut être activé par l'insuline ou les acides amines séparément.

IV.2. Carence en acides aminés et activation de la voie de signalisation impliquant GCN2

Chez les mammifères, un déficit en protéines alimentaires ou un déséquilibre en acides aminés essentiels entraîne l'activation de la voie de signalisation de réponse aux acides aminés (AAR, amino acid response) et conduit à la régulation de la traduction cellulaire. Cette voie de signalisation implique la protéine kinase GCN2, définie comme le senseur du déficit en acides aminés (Hao et al. 2005; Maurin et al. 2005). GCN2 est exprimée dans de très nombreux tissus mais avec des niveaux d'expression variables (Berlanga et al. 1999). Cette protéine détecte spécifiquement les déficits en acides aminés, ce qui stimule son activité enzymatique (Qiu et al. 2001). En effet, GCN2 possède un domaine homologue à l'histidyl-tRNA synthétase lui permettant de se lier aux ARN de transfert non chargés, dont la concentration augmente à l'intérieur de la cellule lors d'une carence en acides aminés (Dong et al. 2000). De cette liaison résulte un changement de conformation permissif conduisant à l'autoactivation de GCN2 (Figure 12).

Le seul substrat connu de GCN2 est la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction eIF2 (eukaryotic initiation factor 2)(Zhang et al. 2002). Une fois activée, GCN2 phosphoryle eIF2 α sur la Serine 51 (Ser51). Cette phosphorylation a pour conséquence d'inhiber la formation du complexe

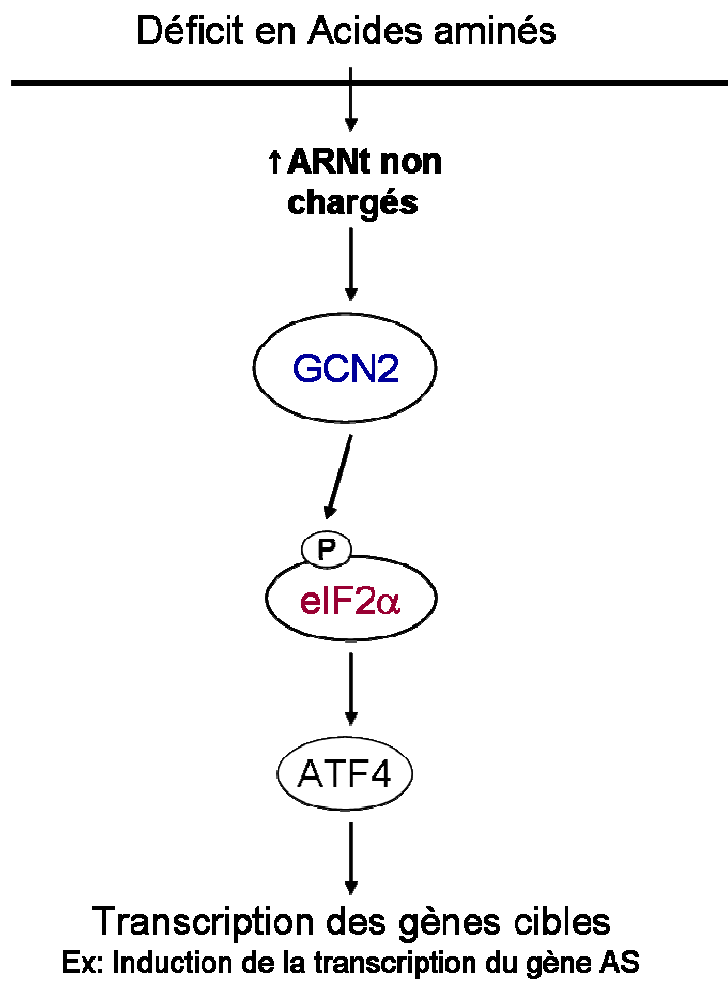


Figure 12 : Voie de réponse aux déficits en acides aminés impliquant la protéine kinase GCN2.
GCN2, General Control Non-repressible 2 ; eIF2, eucaryotique initiation factor 2 ; ATF4, activating transcription factor 4

d'initiation de la traduction, entraînant une forte inhibition de la synthèse protéique et paradoxalement, une augmentation de la traduction d'ARN messagers spécifiques comme par exemple le facteur de transcription ATF4 (activating transcription factor 4) grâce à une structure particulière de sa région 5' non traduite (Lu et al. 2004). ATF4 peut alors induire la transcription de gènes cibles possédant dans leur promoteur des éléments de réponse aux acides aminés, AARE (amino acid response element) (Averous et al. 2004; Bruhat et al. 2000).

Ainsi en couplant la détection d'un déficit en un acide aminé essentiel à la phosphorylation d'eIF2 α , GCN2 ne régule pas seulement les taux de synthèse protéique mais contrôle également l'expression de nombreux gènes spécifiques, impliqués dans l'adaptation des cellules à cette situation de carence. C'est le cas du gène codant par exemple pour l'enzyme asparagine synthétase (AS). L'asparagine synthétase est une enzyme qui catalyse la biosynthèse d'asparagine à partir de l'aspartate et de la glutamine. Elle est exprimée de façon ubiquitaire dans la plupart des cellules mammifères. Au cours de cette thèse, nous avons utilisé le gène AS comme gène marqueur de la présence ou l'absence d'acides aminés.

Peu de données sont actuellement publiées sur les rôles physiologiques de GCN2 chez les mammifères. Cependant récemment, sont apparues quelques perspectives intéressantes qui laissent suggérer un rôle très large de GCN2 dans la régulation du métabolisme. En effet, un travail récent met en évidence le rôle de GCN2 dans la régulation du métabolisme lipidique suite à une carence en acides aminés essentiels (Guo et al. 2007). Cette étude montre qu'une carence nutritionnelle prolongée en leucine induit une répression de l'expression et de l'activité de certaines enzymes de la lipogenèse au niveau hépatique de façon dépendante de GCN2.

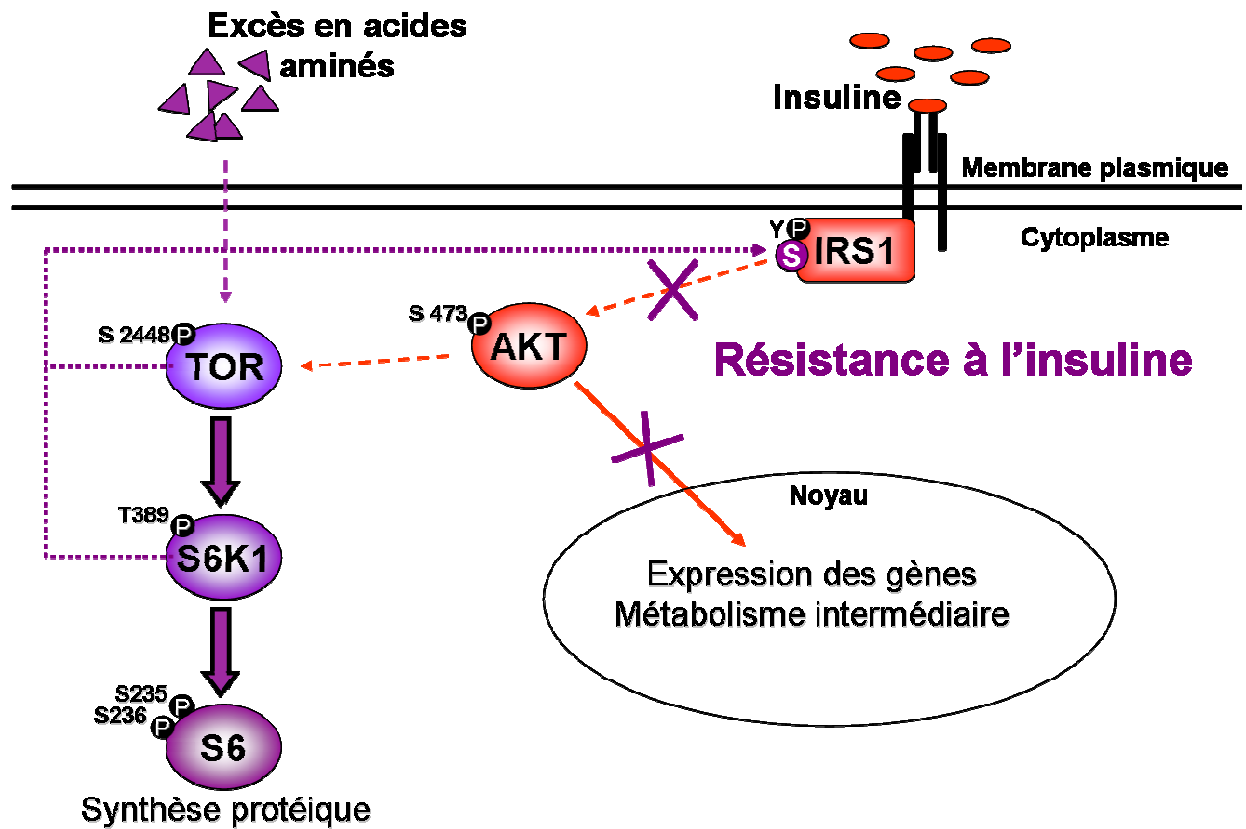


Figure 13 : Rétrocontrôle négatif des acides aminés sur la voie de signalisation de l'insuline : Phosphorylation d'IRS1 sur résidus sérine par les kinases TOR et S6K1.

V. Interaction entre les acides aminés et l'insuline au niveau des voies de signalisation cellulaires.

Il apparaît aujourd'hui évident que les acides aminés sont capables de moduler l'action de l'insuline en agissant sur la voie de signalisation IRS-1/PI3K/Akt (Tremblay et al. 2007b). En effet, dans le muscle, un excès en acides aminés induit la sur-activation de la voie mTORC1/S6K1, conduisant alors à un rétrocontrôle négatif de mTOR et S6K1 sur les éléments précoces de la voie de signalisation insulinaire (Tremblay et al. 2001b). Ce rétrocontrôle s'effectue au niveau d'IRS-1 par l'intermédiaire de phosphorylation sur différents résidus sérine provoquant la séparation physique d'IRS-1 et du récepteur de l'insuline et le blocage de la propagation du signal insulinaire (Figure 13). IRS-1 est ensuite pris en charge par des protéines de la famille 14-3-3 pour être redirigé des microsomes à faible densité vers le cytosol où il est ensuite dégradé par une voie protéolytique dépendante du protéasome 26S (Craparo et al. 1997). L'effet inhibiteur des acides aminés sur l'action de l'insuline impliquant le rétrocontrôle négatif sur IRS-1 a également été démontré sur hépatocytes (Patti et al. 1998) et adipocytes (Haruta et al. 2000; Takano et al. 2001; Tremblay et al. 2005b).

Il a également été démontré dans des cellules adipeuses et musculaires que l'augmentation de la disponibilité en acides aminés entraîne la phosphorylation d'IRS-1 sur résidus Ser307 et Ser636/639 de façon dépendante de la rapamycine (Carlson et al. 2004; Tremblay et al. 2005a; Tremblay et al. 2005b). De plus, l'infusion *in vivo* d'acides aminés chez l'homme provoque la surexpression de S6K1 dans le muscle qui est associée à la phosphorylation d'IRS-1 sur Ser307 et Ser 636/639 et à la diminution de l'activité PI3K (Tremblay et al. 2005b). Des études génétiques ont démontré également le rôle de mTOR et S6K1 dans la phosphorylation d'IRS-1 sur résidus sérine et le développement de résistance à l'insuline. En effet, dans des fibroblastes de souris, la perte de TSC1/TSC2 entraîne une augmentation de l'activation de la voie mTORC1/S6K1 responsable de l'inhibition de la signalisation insulinaire IRS-1/PI3K/Akt (Harrington et al. 2004; Shah et al. 2006). De plus, S6K1 phosphoryle IRS-1 sur Ser302 ayant pour conséquence de fragiliser l'association entre IRS-1 et le récepteur à l'insuline (Harrington et al. 2004).

L'importance physiologique de la voie TOR/S6K1 dans la résistance à l'insuline a été également mise en évidence par le fait que cette voie est activée de façon chronique dans les cas d'obésité et de diabète (Khamzina et al. 2005). De plus, il a été démontré que des souris S6K1 *-/-* présentant une invalidation du gène S6K1 étaient protégées contre la résistance à l'insuline par l'absence, au moins pour partie, de phosphorylation d'IRS-1 sur résidus sérine (Tremblay et al. 2007a; Um et al. 2004). Par ailleurs, mTORC1 joue également un rôle important dans la résistance à l'insuline dans le foie.

En effet, la surexpression d'une forme tronquée de la protéine raptor diminue l'activité de S6K1 dans le foie et améliore la tolérance au glucose de souris obèses.(Koketsu et al. 2008).

Ainsi l'ensemble de ces données montre que la sur-activation de la voie de signalisation mTOR/S6K1 liée à un excès en acides aminés perturbe la sensibilité à l'insuline dans différents tissus tels que le muscle, le foie et le tissu adipeux.

PARTIE B. REGULATION NUTRITIONNELLE DU METABOLISME INTERMEDIAIRE HEPATIQUE : **PRESENTATION DES ENZYMES ETUDIEES AU COURS DE LA THESE**

Le métabolisme intermédiaire consiste en la dégradation progressive des nutriments (glucides, lipides, protéines) en molécules plus petites. Il est constitué de l'ensemble des réactions biochimiques couplées les unes aux autres par un intermédiaire qui constitue le produit d'une réaction et le substrat d'une autre. Ce système est en fait très flexible car ces intermédiaires vont pouvoir être utilisés dans plusieurs voies métaboliques de synthèse c'est-à-dire d'anabolisme ou de dégradation, on parle alors de catabolisme.

I. Contrôle nutritionnel du métabolisme intermédiaire

I.1. Le foie, centre du métabolisme intermédiaire

Chez les mammifères, comme chez la truite, le foie joue un rôle majeur dans la régulation du métabolisme intermédiaire. Sa localisation anatomique lui confère un statut particulier. En effet, c'est le premier organe à être en contact avec les différents nutriments (acides aminés et peptides, glucides et une partie des lipides alimentaires) apportés par l'alimentation après absorption par l'intestin et acheminement *via* la veine porte. C'est également par la veine porte que les hormones pancréatiques sont acheminées jusqu'au foie. Le foie joue donc un rôle « d'effecteur » métabolique, en adaptant son métabolisme en fonction des flux de nutriments et des hormones pancréatiques. Il est le siège de nombreuses voies métaboliques (métabolisme du glucose, des lipides et des protéines) fortement régulées par le statut nutritionnel.

Différents acteurs régulent les voies métaboliques de manière coordonnée et complexe :

1) les apports en substrats : il est évident que des apports différents en substrats (le glucose pour la glycolyse, les acides aminés, le lactate (cycle de Cori) ou le glycérol (oxydation des acides gras) pour la néoglucogenèse, l'acétyl-CoA pour la lipogenèse et les acyl-CoA pour la β -oxydation) peuvent modifier le flux des voies métaboliques ;

2) la variation des activités enzymatiques. Les activités enzymatiques peuvent être contrôlées au niveau de la protéine elle-même par phosphorylation des enzymes, allostérie des molécules, localisation cellulaire des enzymes etc... Il existe aussi des variations de la quantité d'enzymes par différents mécanismes : modification du taux de transcription de gènes codant pour ces protéines, modification de la stabilité des ARNm en agissant sur la traduction des ARNm en protéines et modification du taux de dégradation des protéines (Desvergne et al. 2006).

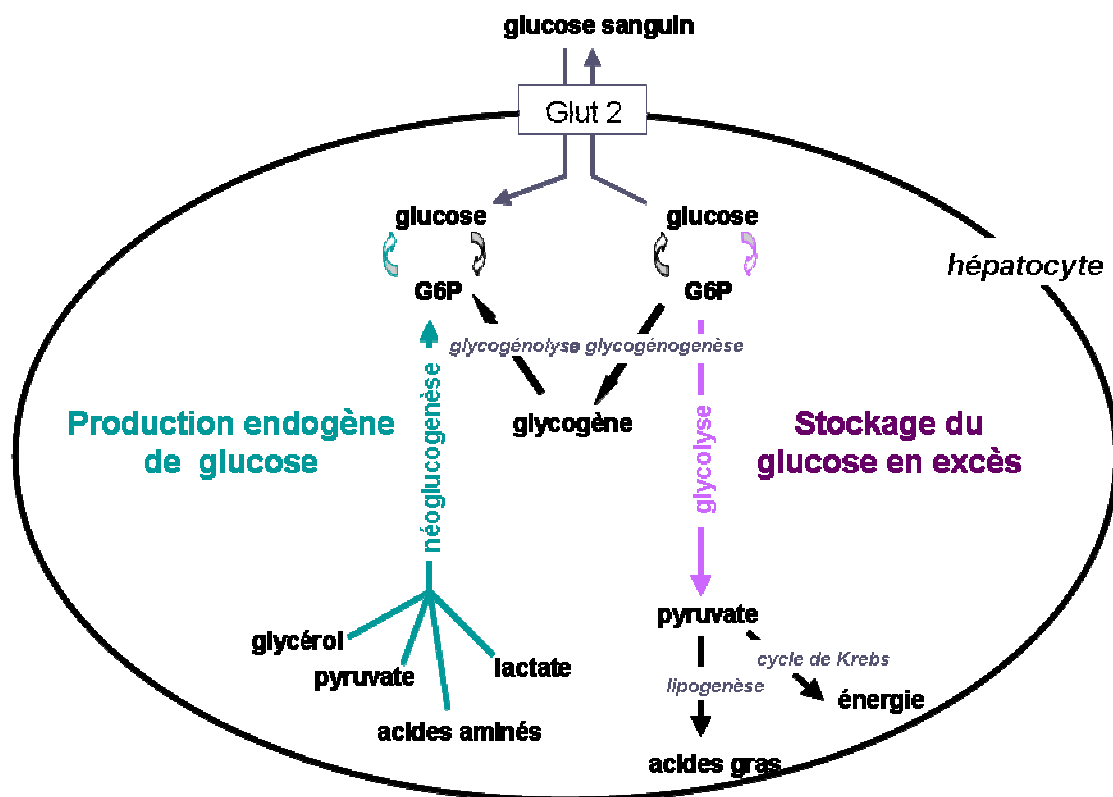


Figure 14 : Représentation schématique des principales voies de contrôle de l'homéostasie glucidique chez les mammifères.

Au cours de cette étude, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la régulation nutritionnelle de l'expression des gènes codant pour les enzymes clés du métabolisme intermédiaire (glucido-lipidique et protéique) catalysant des réactions non-réversibles.

I.2. Régulation nutritionnelle du métabolisme glucidique : glycolyse/néoglucogenèse

Le foie est le seul organe capable d'utiliser le glucose (glycolyse, glycogénogenèse) et de le produire (glycogénolyse, néoglucogenèse) en réponse à des stimuli nutritionnels (Figure 14). Chez des animaux nourris, les effets du glucose alimentaire et de l'insuline se conjuguent pour reconstituer les réserves hépatiques de glycogène (Cherrington 1999), induire la synthèse d'acides gras *de novo* (la lipogenèse à partir du glucose n'est observée *in vivo* chez l'homme qu'en cas d'alimentation très riche en glucides et d'hyperinsulinémie) (Towle et al. 1997) et diminuer la production endogène de glucose (glycogénolyse et néoglucogenèse) (Nordlie et al. 1999). Dans le foie, le glucose par action directe ou indirecte *via* les hormones, va moduler le métabolisme glucido-lipidique, en agissant notamment sur la régulation de deux voies clés : la glycolyse et la néoglucogenèse. Ainsi, au niveau hépatique, l'homéostasie glucidique dépend principalement de l'équilibre entre la production endogène de glucose (néoglucogenèse) à partir de substrats non glucidiques comme le glycérol, le pyruvate, les acides aminés ou le lactate et la mise en réserve du glucose en excès par le biais de la glycolyse (oxydation du glucose pour former du pyruvate). Les réactions de synthèse et de dégradation du glycogène (glycogénogénèse/glycogénolyse) peuvent également participer au contrôle de cet équilibre (Pilkis et al. 1992). Chez la truite arc-en-ciel, la voie indirecte de synthèse de glycogène à partir de substrats non glucidiques produits par la néoglucogenèse, serait d'ailleurs plus importante qu'à partir du glucose lui-même (Pereira et al. 1995).

L'homéostasie glucidique dépend donc principalement des régulations de l'activité d'enzymes hépatiques clés, catalysant des réactions non réversibles de la glycolyse et de la néoglucogenèse, deux voies opposées fonctionnant de manière alternative, selon la situation nutritionnelle (Figure 15).

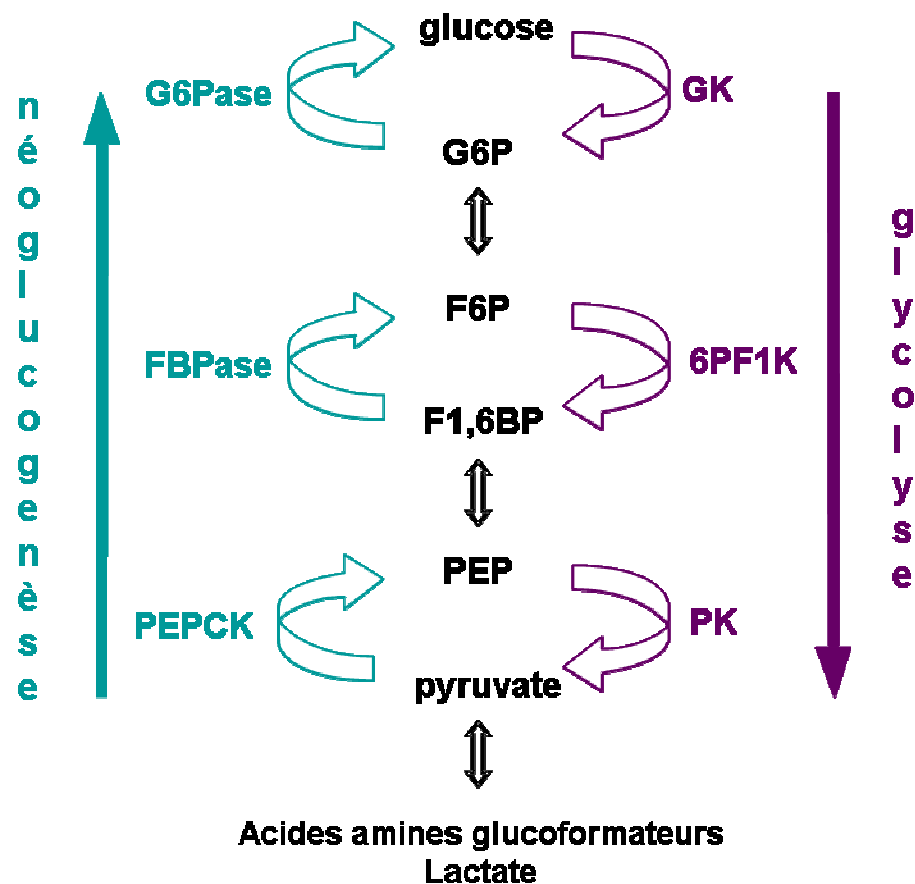


Figure 15 : Représentation schématique des principales voies de régulation du métabolisme glucidique hépatique : enzymes clés de la glycolyse et de la néoglucogénèse.

GK : glucokinase ; 6-PF1K : 6-phosphofructo-1-kinase ; PK : pyruvate kinase ; G6P : glucose-6-phosphate ; G6Pase : glucose-6-phosphatase ; F1,6P : fructose1,6 bisphosphate ; F6P : fructose-6-phosphate ; FBPase : fructose-1,6-bisphosphate ; PEP : phosphoénolpyruvate, PEPCK : phosphoénolpyruvate carboxykinase

I.2.1. La glycolyse

La glycolyse est l'unique voie du catabolisme du glucose chez tous les organismes, y compris les poissons (Cowey et al. 1989). Cette voie consiste en la dégradation progressive d'une molécule de glucose (6C) en deux molécules de pyruvate (3C). La majorité des enzymes impliquées dans cette voie existe chez les poissons (Cowey et al. 1989) comme chez les mammifères. La régulation de la voie glycolytique est dépendante de l'activité de trois enzymes clés : la glucokinase (GK ; E.C.2.7.1.1), la 6-phosphofructo-1-kinase (6PF1K ; E.C.2.7.1.90) et la pyruvate kinase (PK ; E.C.2.7.1.40) (Figure 15),

La glucokinase (aussi appelée hexokinase IV ou D) fait partie d'une famille d'enzymes, les hexokinases, qui catalysent la première réaction de la glycolyse c'est-à-dire la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate (Wilson 2003). Quatre isoenzymes (HK-I à IV) sont connues chez les vertébrés, toutes codées par des gènes différents. HK-I, -II et -III partagent certaines propriétés comme un poids moléculaire élevé (environ 100kDa), une forte affinité pour le glucose et une inhibition par leur produit, le glucose-6-phosphate (Printz et al. 1993) mais présentent cependant des distributions tissulaires différentes. En revanche, l'HK-IV ou GK possède une faible affinité pour le glucose et son activité n'est pas inhibée par la présence de glucose-6-phosphate (Printz et al. 1993). Son poids moléculaire de 50kDa est deux fois plus faible que celui des autres hexokinase (Printz et al. 1993). Cette différence est liée au fait que les HKI à III possèdent un domaine catalytique et un domaine régulateur, alors que la GK ne possède pas ce dernier domaine (Printz et al. 1993). La GK est exprimée principalement dans les cellules hépatiques et les cellules β du pancréas où elle joue un rôle de senseur du glucose circulant (Printz et al. 1993). Chez le rat, l'expression de la GK est contrôlée par le statut nutritionnel et hormonal (Printz et al. 1993). Elle est stimulée par un repas riche en glucides et inhibée après un repas riche en protéines. Le gène codant pour la GK ainsi que son expression ont été caractérisés dans le foie de truite arc-en-ciel (Panserat et al. 2000a). Chez cette espèce, l'expression et l'activité hépatique de la GK stimulées par le repas peuvent être inhibées par le jeûne (Kirchner et al. 2003b; Kirchner et al. 2005). La GK est principalement contrôlée par les glucides chez les poissons. En effet, un repas riche en glucides (>20 % glucides digestibles) induit l'expression du gène codant pour la GK, ainsi que l'activité de cette enzyme, chez la truite mais également chez d'autres espèces de poissons comme la daurade royale ou la carpe commune (Panserat et al. 2001a; Panserat et al. 2000b).

La phosphoglucoisomérase catalyse ensuite la transformation de glucose-6-phosphate en fructose-6-phosphate qui est ensuite phosphorylé en fructose-1,6-bisphosphate par la **6-phosphofructo-1-kinase**, deuxième enzyme clé de la glycolyse. Il s'agit d'une enzyme tétramérique pouvant exister sous plusieurs formes (isoenzymes) dans les tissus humains, chacune d'entre-elles étant codée par

un gène différent. L'activité de la 6PF1K est régulée de façon similaire chez les mammifères et les poissons. En effet, elle est activée par le fructose-1,6-bisphosphate et l'AMP et est inhibée par l'ATP (Cowey et al. 1989). Contrairement à la prise alimentaire qui stimule l'activité hépatique de la 6PF1K, celle-ci est réduite lors d'un jeûne (Fideu et al. 1983). De plus, la composition du régime alimentaire est connue pour moduler l'activité enzymatique de cette enzyme. En effet, chez la truite comme chez le rat, un aliment riche en glucides et pauvre en protéines stimule l'activité hépatique de la 6PF1K de façon plus importante qu'un aliment pauvre en glucides et riche en protéines (Fideu et al. 1983; Walton 1986). En revanche, l'expression du gène 6PF1K ne semble pas être régulée par le statut nutritionnel. En effet, une étude réalisée chez le rat montre que ni le jeûne, ni un aliment riche en glucides ne modifie l'expression hépatique du gène 6PK1K (Hotta et al. 1991).

La pyruvate kinase est la troisième enzyme clé de la glycolyse, elle catalyse la dernière étape de la glycolyse c'est à dire la transformation du phosphoénolpyruvate en pyruvate. Chez les mammifères, il existe deux gènes codant pour la PK. Le gène PKM, caractéristique du muscle, est à l'origine des isoenzymes M₁ et M₂ et le gène PKL code pour les isoenzymes hépatiques L et R (Yamada et al. 1999). Des promoteurs alternatifs permettent la différenciation des deux formes hépatiques L et R. Ces différentes PK sont toutes des enzymes cytosoliques et fonctionnent sous forme homotétramérique (Yamada et al. 1999). Dans le foie, l'expression du gène PK et l'activité de l'enzyme sont principalement attribuées à l'isoenzyme de type L. Son activité diminue suite à un jeûne ou dans les cas de diabète et augmente après un repas riche en glucides (Pilkis et al. 1992). Chez la truite, l'expression du gène PK a été détectée dans le foie (Panserat et al. 2001c). L'expression hépatique du gène PK n'est pas induite après un repas riche en glucides, chez cette espèce. En effet, 6h et 24h après un repas avec ou sans glucides les niveaux d'ARNm messagers codant pour le gène PK restent stables dans le foie de truite. Ces données suggèrent que l'induction de l'activité de la PK par un aliment riche en glucides, observée chez plusieurs espèces de poissons n'est pas régulée par des mécanismes transcriptionnels, mais est probablement liée à des régulations post-transcriptionnelles ou post-traductionnelles telles que la phosphorylation ou la déphosphorylation de l'enzyme (Panserat et al. 2001c). Ainsi, le jeûne entraîne une diminution de l'activité de la PK dans le foie de truite (Fideu et al. 1983; Kirchner et al. 2003a) mais aucune différence significative n'est observée concernant l'expression du gène PK entre des truites à jeun et des truites nourries (Kirchner et al. 2003a; Panserat et al. 2001c).

I.2.2. La néoglucogenèse

La néoglucogenèse, voie très active en période de jeûne, synthétise du glucose à partir de substrats non glucidiques (lactate, glycérol...) produits par les tissus périphériques, libérés dans le sang et captés par le foie (figure 14). Elle consiste en une succession de réactions dont l'objectif est de

transformer deux molécules de pyruvate en une molécule de glucose. Certaines de ces réactions sont communes avec celles de la glycolyse donc réversibles et trois sont irréversibles, donc catalysées par des enzymes clés. Il s'agit de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK ; E.C.4.1.1.32), de la fructose-1,6 bisphosphatase (FBPase ; E.C.3.1.3.11) et de la glucose-6-phosphatase (G6Pase ; E.C.3.1.3.9) (Figure 15). Ces enzymes existent et ont été décrites chez les poissons (Cowey et al. 1989; Walton et al. 1982).

L'enzyme **phosphoénolpyruvate carboxykinase** catalyse la réaction de transformation du pyruvate en phosphoénolpyruvate, première étape de la néoglucogenèse (Hanson et al. 1997). Elle est connue pour exister sous deux formes : mitochondriale (mPEPCK) et cytosolique (cPEPCK), codées par deux gènes différents (Hanson et al. 1997). La proportion relative des deux isoformes diffère selon les espèces (rat : 100% cytosolique, homme 50%-50%, poissons : 90% mitochondriale, oiseau : 100% mitochondriale). Chez le rat, la PEPCK est considérée comme une enzyme limitante de la synthèse hépatique de glucose. Cette enzyme ne subit pas de modification allostérique ou post-transcriptionnelle. Aussi, l'activité de l'enzyme PEPCK est principalement contrôlée par la régulation de l'expression de son gène. Le gène codant pour la forme cytosolique de PEPCK est sous contrôle nutritionnel et hormonal, alors que la forme mitochondriale est exprimée de façon constitutive. Contrairement aux mammifères, l'activité de la PEPCK chez la truite arc-en-ciel est majoritairement mitochondriale (>80%) (Walton et al. 1979). L'activité hépatique de la PEPCK mitochondriale mesurée chez des individus à jeun est significativement supérieure à celle mesurée chez des poissons nourris, alors que l'activité de la forme cytosolique reste similaire entre les deux statuts nutritionnels (Kirchner et al. 2003a). On note également chez la truite que l'activité de la PEPCK est supérieure chez des truites nourries avec un aliment riche en protéines par rapport à des truites nourries avec un aliment riche en glucides (Cowey et al. 1977; Hilton et al. 1982; Walton 1986). Une séquence d'ADNc codant pour la PEPCK et présentant une forte homologie avec l'isoforme mitochondriale de PEPCK de mammifères, a été caractérisée dans le foie de truite (Panserat et al. 2001b). Tout comme cela a été démontré pour l'isoforme mitochondriale de la PEPCK de rat, l'expression hépatique du gène PEPCK reste toujours élevée chez la truite, indépendamment du statut nutritionnel et hormonal de l'animal (à jeun versus nourri, nourri avec ou sans glucides) (Panserat et al. 2001b). Cette expression constitutive de la PEPCK de truite conforte la nature mitochondriale de l'isoforme de PEPCK caractérisée chez la truite. A ce jour, aucune isoforme cytosolique de la PEPCK n'a encore pu être mise en évidence chez la truite.

Tableau 2 : Régulation de l'expression du gène G6Pase et de l'activité de l'enzyme correspondante dans le foie de truite arc-en-ciel.

	G6Pase		Référence
	ARNm	Activité	
Alimentation	-	-	Panserat et al. (2000) J Nutr Biochem 11, 22-29.
Alimentation riche en glucides	-	-	Panserat et al. (2000) J Nutr Biochem 11, 22-29.
Ingestion de glucose	↓	-	Panserat et al. (2001) Comp Biochem Physiol Part B 128, 275-283.
Alimentation riche en protéines	↑↑	↑↑	Kirchner et al. (2003) J Nutr 133, 2561-2564.
Jeune prolongé	↑↑	↑↑	Kirchner et al(2003) Comp Biochem Physiol Part A 134, 337-347.

- Absence d'effet

↓ Diminution

↑↑ Forte augmentation

L'enzyme **fructose-1,6 bisphosphatase** catalyse la réaction d'hydrolyse du fructose-1,6-bisphosphate en fructose-6-phosphate (Pilkis et al. 1992). Plusieurs isoformes de FBPase, toutes localisées dans le cytosol, ont été rapportées chez différentes espèces animales. La comparaison de ces FBPase a montré une grande homologie des séquences protéiques, suggérant l'existence d'une FBPase « ancestrale » commune à toutes ces isoformes. Chez le rat, l'expression du gène codant pour la FBPase est induite par le jeûne et réprimée après un repas riche en glucides. Chez la truite, l'expression du gène codant la FBPase a été détectée dans le foie (Panserat et al. 2001c), mais ne semble pas être soumise à des régulations nutritionnelles. En effet, aucune différence significative d'expression n'a été observée entre des poissons à jeun et des poissons nourris (Panserat et al. 2001c). De plus, les auteurs n'ont pas observé de diminution significative de l'expression du gène codant pour la FBPase en réponse aux glucides alimentaires. Ces résultats sont en accord avec l'absence d'inhibition de l'activité de l'enzyme FBPase observée chez d'autres espèces de poissons nourris avec un aliment riche en glucides. En fait, il semblerait que le facteur majeur impliqué dans la régulation des enzymes de la néoglucogenèse chez le poisson soit les protéines alimentaires et non les glucides. En effet, plusieurs études montrent que les protéines alimentaires induisent une augmentation de l'activité hépatique de la FBPase et/ou de l'expression du gène chez la truite (Cowey et al. 1977; Hilton et al. 1982; Kirchner et al. 2003b; Kirchner et al. 2005; Walton 1986). Enfin, alors que le jeûne ne semble pas réguler l'expression du gène FBPase de truite (Panserat et al. 2001c), il pourrait néanmoins augmenter l'activité de cette enzyme {Kirchner, 2003 #885; Morata, 1982 #2721}.

L'enzyme **glucose-6-phosphatase** joue un rôle important dans le métabolisme du glucose car elle catalyse la libération du glucose dans le système circulatoire après hydrolyse du glucose-6-phosphate en glucose, dernière étape des processus de néoglucogenèse et de glycogénolyse. La G6Pase est une enzyme membranaire multifonctionnelle {Mithieux, 1997 #1751}. Dans la thèse, G6Pase désigne l'unité catalytique de l'enzyme. En effet, pendant longtemps la G6Pase a été considérée comme une enzyme monomérique, cependant de nombreuses études ont montré qu'il s'agissait plutôt d'un système à plusieurs composants comprenant une unité catalytique et des transporteurs de Pi/glucose/G6P (Foster et al. 2002 ; van de Werve et al. 2000). Chez le rat, l'expression hépatique du gène codant pour la G6Pase est sous contrôle nutritionnel et hormonal. En effet, le jeûne stimule l'expression de la G6Pase alors que la réalimentation l'inhibe (Pilkis et al. 1992). Le gène codant la G6Pase a été partiellement cloné chez la truite arc-en-ciel (Panserat et al. 2000c). Cependant, les analyses de banques (SIGENAE) ont permis de mettre en évidence, chez la truite, deux isoformes de la G6Pase, résultant probablement de la duplication ancestrale de son génome. L'étude de la régulation par les facteurs nutritionnels de la G6Pase dans le foie a montré des résultats parfois contradictoires (Tableau 2). En effet, dans le foie de truite l'expression génique de la G6Pase ainsi que son activité ne sont ni modifiées entre 6h et 24h après le repas, ni affectées

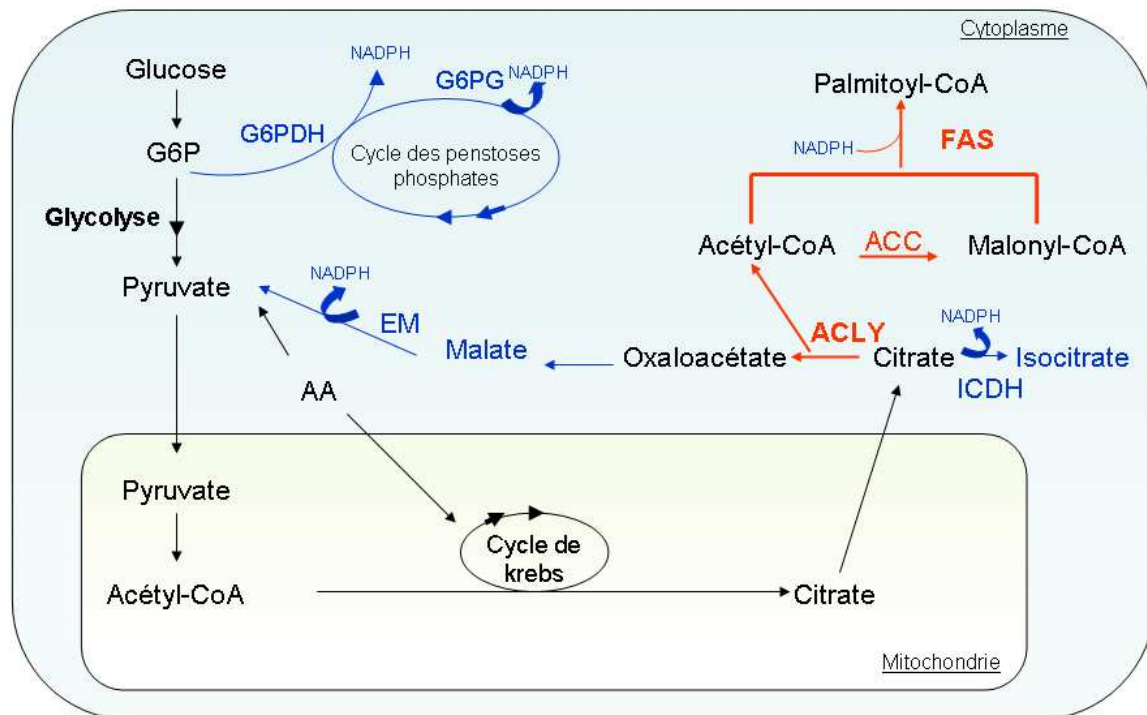


Figure 16 : Représentation schématique des différentes voies impliquées dans la lipogenèse.

AA : acides aminés ; Enzymes de la lipogenèse (en rouge) : ACC : Acétyl-CoA carboxylase, ACLY : ATP-citrate lyase, FAS : fatty acid synthase ; G6P : glucose-6-phosphate ; Enzymes génératrices de NADPH pour la lipogenèse (en bleu) : 6PGD : 6-phosphogluconate déshydrogénase, EM : enzyme malique, G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase, ICDH : isocitrate déshydrogénase ;

par la présence de différents taux de glucides dans l'aliment (0%, 8%, 12% ou 20% de la matière sèche) (Panserat et al. 2000c). Cependant, une autre étude chez la truite a montré que le glucose alimentaire entraîne une faible inhibition de l'expression hépatique de la G6Pase sans pour autant affecter l'activité de l'enzyme. (Panserat et al. 2001a). Par ailleurs, un repas riche en protéines, augmente l'activité et l'expression de la G6Pase dans le foie de truite {Kaiser, 2004 #1906;Kirchner, 2003 #779}. Enfin, chez la truite, un jeûne prolongé augmente l'expression hépatique du gène G6Pase ainsi que l'activité de l'enzyme (Kirchner et al. 2003a).

I.3. Régulation nutritionnelle de la lipogenèse

La lipogenèse convertit les chaînon carbonés issus du catabolisme des glucides ou de certains acides aminés en acides gras. La synthèse *de novo* des acides gras, consiste en la formation d'acyl-CoA à partir d'acétyl-CoA dérivant du catabolisme des glucides ou de la désamination des acides aminés (Figure 16). Chez les mammifères, la lipogenèse a lieu dans le foie et le tissu adipeux (Hillgartner et al. 1995) mais chez les poissons, comme chez l'oiseau, celle-ci se déroule essentiellement dans le foie (Greene et al. 1987; Hillgartner et al. 1995). Les mécanismes biochimiques de la synthèse des lipides restent néanmoins comparables entre les poissons et les mammifères (Iritani et al. 1984), seule l'origine des sources de carbone diffère. En effet, chez les mammifères comme chez les oiseaux, le glucose représente la principale source de carbone utilisée pour la synthèse des acides gras alors que chez les poissons, dont l'alimentation en milieu naturel est riche en protéines, les acides aminés sont les principaux substrats de la lipogenèse (Häussinger 2008; Henderson et al. 1987; Hillgartner et al. 1995). Chez la truite arc-en-ciel, il a été montré *in vitro* que le taux de synthèse des acides gras à partir de l'alanine était beaucoup plus élevé que celui réalisé à partir du glucose (Henderson et al. 1981). L'importance de la lipogenèse varie également selon l'apport alimentaire : elle augmente lorsque l'apport calorique dépasse les besoins énergétiques et conduit ainsi à la mise en réserve des surplus nutritionnels sous la forme de triglycérides. Au cours de ce travail de thèse, deux enzymes clés de la lipogenèse ont été étudiées, l'ATP-citrate lyase (ACLY ; E.C.4.1.3.8) et l'acide gras synthase (ou fatty acid synthase – FAS ; E.C.2.3.1.85).

L'ATP-citrate lyase est une enzyme cytosolique qui clive la molécule de citrate provenant de la mitochondrie en acétyl-CoA utilisé ensuite pour la lipogenèse et en oxaloacétate qui sera recyclé en malate. La présence de cette enzyme est indispensable à l'accumulation des lipides. En effet, lorsque l'enzyme est absente, les cellules sont incapables de stocker les lipides (Boulton et al. 1981). C'est une enzyme homotétramérique, exprimée dans la plupart des tissus et qui présente une régulation au niveau transcriptionnel comme les autres enzymes de la lipogenèse.

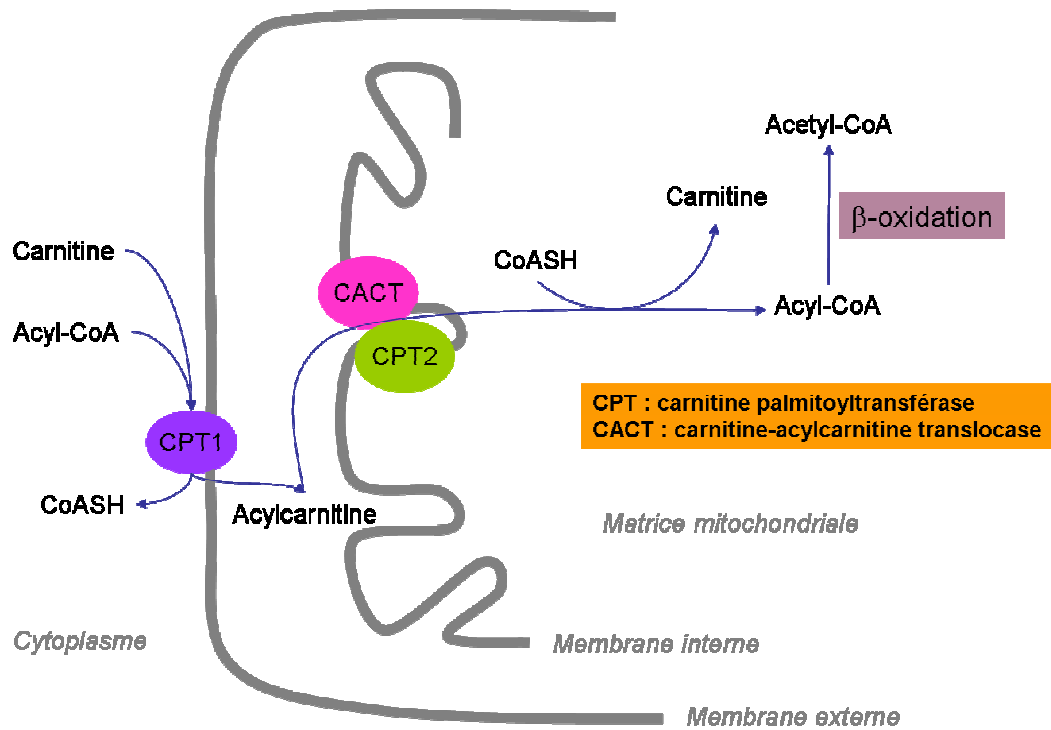


Figure 17 : Schéma représentatif de la voie de la β -oxydation.

La fatty acid synthase est la principale enzyme de la lipogenèse. Elle permet la synthèse d'acide gras, essentiellement le palmitate, par condensation d'une molécule d'acétyl-CoA avec une molécule de malonyl-CoA pour former une molécule d'acyl-CoA. La FAS est un complexe enzymatique codé par un seul gène et constitué de deux chaînes polypeptidiques identiques de 270 kDa, possédant chacune sept activités enzymatiques (la b-ketoacyl synthase, la malonyl/acetyl transférase, la déshydratase, l'énol réductase, la b-ketoacyl réductase, l'acyl «carrier protein » et la thioestérase), assemblées pour former un homodimère. (Smith et al. 2003). La synthèse d'acyl-CoA par le complexe enzymatique débute par la condensation d'un acétyl-CoA avec un malonyl-CoA et se poursuit par des réactions de décarboxylation, réduction, déshydratation et réduction pour fournir un acide gras à 4 carbones, le butyryl. L'allongement de la chaîne hydrocarbonnée se fait ensuite par ajout séquentiel de malonyl-CoA à la chaîne préexistante.

ACLY et FAS, comme la plupart des enzymes de la lipogenèse sont contrôlées par le statut nutritionnel. En effet, chez les mammifères, l'activité ainsi que l'expression des gènes des enzymes de la lipogenèse sont induits après un repas riche en glucides et inhibés par le jeûne ou la consommation d'un repas riche en lipides et pauvre en glucides (Elshourbagy et al. 1990; Girard et al. 1997). De même, chez les poissons, l'activité des enzymes de la lipogenèse (dont FAS et ACLY) est induite après un repas riche en glucides (Dias et al. 1998; Likimani et al. 1982) et inhibée par un aliment riche en lipides (Gelineau et al. 2001; Rollin et al. 2003)

I.4. Régulation nutritionnelle de la β -oxydation des lipides

L'oxydation des acides gras permet l'utilisation de ces métabolites pour la fourniture d'énergie pour le foie (Figure 17). La β -oxydation est la principale voie de dégradation des acides gras. Cette voie est très active en période de jeûne, lorsque la lipolyse c'est-à-dire l'hydrolyse des triglycérides en acides gras et glycérol à partir du tissu adipeux est intense et libère de grandes quantités d'acides gras libres dans le sang. Elle consiste en une succession de réactions au cours desquelles les acides gras sont découpés progressivement en molécules d'acétyl-CoA. La β -oxydation a lieu principalement dans la matrice mitochondriale, mais elle est également observée au niveau d'un autre type d'organite, le peroxysome. La β -oxydation débute dans le cytoplasme, au niveau de la membrane externe mitochondriale, par l'activation des acides gras en acyl-CoA. Les acyl-CoA à chaîne courte (< à 6 carbones) et moyenne (>12 carbones) traversent librement les membranes mitochondriales externe et interne par simple diffusion, contrairement aux acyl-CoA à chaîne longue (>20 carbones) qui nécessitent un système de transport. Ce système de transport est composé de trois protéines : la carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1 : EC 2.3.1.21), la carnitine/acylcarnitine translocase et la carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2). La CPT1, localisée au niveau de la membrane externe de la

mitochondrie, catalyse le transfert du groupement acyl des acyl-coA vers la carnitine pour former des molécules d'acylcarnitine. Les molécules d'acylcarnitine sont ensuite conduites vers la membrane interne de la mitochondrie par une seconde protéine, la carnitine/acylcarnitine translocase où elles sont prises en charge par la CPT2 pour être retransformées en acyl-coA (McGarry et al. 1997).

La CPT1 est considéré comme l'enzyme limitante de la β -oxydation mitochondriale dans le foie (Eaton 2002). Trois isoformes de CPT 1, codées par des gènes différents, ont été décrites chez les mammifères : la CPT 1-A exprimée de façon prépondérante dans le foie et les reins (Esser et al. 1993), la CPT1-B majoritairement exprimée dans les muscles squelettiques et cardiaque, les testicules et le tissu adipeux chez le rat (Esser et al. 1996; McGarry et al. 1997) et la CPT1-C que l'on retrouve essentiellement au niveau des testicules et de certaines régions du cerveau (Price et al. 2002). Chez la truite arc-en-ciel cinq isoformes de la CPT1 ont été décrites : les CPT1 α 1a, CPT1 α 1b, CPT1 α 2, CPT1 β 1 et CPT1 β 2 dont les caractéristiques structurales sont identiques aux CPT1 des mammifères (Gutierrez et al. 2003; Morash et al. 2010). On ne sait en revanche toujours pas quel est le rôle joué par chacune de ces isoformes, ni quels sont leurs profils d'expression et de régulation respectifs. Chez les mammifères, la CPT-1 est inhibée allostériquement et de façon réversible par le malonyl-CoA, premier intermédiaire de la lipogenèse produit par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (McGarry et al. 1997). L'effet inhibiteur du malonyl-CoA sur l'activité de la CPT1 a également été démontré chez la truite (Morash et al. 2008). Dans le foie, le niveau de β -oxydation des acides gras est principalement régulé par l'expression du gène codant pour la CPT1. L'expression des gènes codant pour les différentes isoformes de CPT1 est fortement soumise à un contrôle nutritionnel et hormonal. Des stimuli comme un jeûne, une alimentation riche en lipides, un diabète ou un traitement par des agents stimulant la prolifération mitochondriale et du péroxysomale augmentent l'expression et l'activité de la CPT1 sans affecter celle de la CPT2 (Louet et al. 2001a; Louet et al. 2001b; McGarry et al. 1997; Skiba-Cassy et al. 2007; Thumelin et al. 1994).

I.5. Régulation nutritionnelle de deux enzymes du métabolisme protéique : AS et SD

Au niveau du métabolisme protéique, deux enzymes ont fait l'objet d'une attention particulière au cours de cette thèse :

- l'asparagine synthase connue pour être contrôlée par les acides aminés
- la sérine déshydrogénase connue pour son implication dans la néoglucogenèse chez les mammifères et sa régulation par les acides aminés (Ogawa et al. 1991; Zhong et al. 2007).

L'asparagine synthase (AS : EC 6.3.1.1.) permet la biosynthèse d'asparagine à partir de l'aspartate et du glutamate. Elle est exprimée de façon ubiquitaire chez les mammifères. L'expression du gène

AS est contrôlée par les acides aminés. En effet l'expression du gène codant pour AS est induite lors d'une carence en acides aminés (Barbosa-Tessmann et al. 2000) via l'activation de la voie GCN2.

La **sérine déshydratase** (SD : EC 4.3.1.13), est une enzyme qui catalyse la désamination de la L-sérine en pyruvate de façon dépendante du pyridoxal phosphate (PLP). Elle est localisée essentiellement dans le foie (Snell 1984). La structure de cette enzyme diffère entre les organismes. En effet, elle est monomérique chez certaines bactéries, tétramérique chez d'autres bactéries comme chez les levures et les plantes et enfin dimérique chez les mammifères. Chez le rat, l'enzyme SD est impliquée dans la régulation de la néoglucogenèse sous différentes conditions nutritionnelles et hormonales (Snell 1984). En effet, son activité augmente rapidement en réponse aux stimuli connus pour induire la néoglucogenèse comme le jeûne, un aliment riche en protéine ou le diabète (Ogawa et al. 1991). Ainsi, dans le foie de rat, l'augmentation du taux de protéines dans l'aliment induit l'augmentation de l'activité de la SD (Mauron et al. 1973; Ogawa et al. 1991). L'activité de l'enzyme SD semble être principalement contrôlée par la régulation de l'expression de son gène (Ogawa et al. 1991). Chez la truite, le pyruvate issu de l'activité de la SD pourrait contribuer à augmenter la lipogenèse, comme le suggèrent les résultats obtenus à partir de deux lignées de truite arc-en-ciel sélectionnées de façon divergente sur la teneur en lipides du muscle (Skiba-Cassy et al. 2009).

II. Effets transcriptionnels de l'insuline sur la régulation des gènes codant les enzymes clés du métabolisme intermédiaire dans le foie

Chez les mammifères, la régulation moléculaire postprandiale du métabolisme est le résultat de la combinaison des effets générés d'une part, directement par les nutriments eux-mêmes (ou leurs métabolites intermédiaires) et d'autre part de façon indirecte par les hormones comme l'insuline et glucagon dont la sécrétion est modifiée par les nutriments. Au cours de cette thèse, notre attention s'est plus particulièrement portée sur l'insuline, reconnue comme l'hormone majeure de la régulation du métabolisme au niveau postprandial.

Au cours des 40 dernières années, la régulation de la transcription des gènes par l'insuline a fait l'objet de nombreuses études et il est maintenant établi que l'insuline régule de façon positive ou négative l'expression de plus de 150 gènes. En effet, l'insuline est capable de réguler l'expression de nombreux gènes du métabolisme intermédiaire suite à sa fixation sur son récepteur et l'activation de sa voie de signalisation (décrite précédemment dans la Partie A). L'insuline régule la transcription des gènes en contrôlant la localisation, la fixation et l'activité de nombreux facteurs de transcription qui se fixent sur des éléments de réponse à l'insuline (ERI) situés pour la grande majorité dans les régions promotrices des gènes cibles de l'insuline.

De façon générale, chez les mammifères, l'insuline inhibe l'expression des enzymes de la néoglucogenèse au niveau transcriptionnel (Barthel et al. 2003). En effet, sécrétée après un repas riche en glucides, elle diminue la transcription des gènes codant pour la PEPCK, la G6Pase et la FBPase (Barthel et al. 2003; Pilkis et al. 1992). L'insuline inhibe également l'expression du gène CPT1 codant pour une enzyme clé de la β -oxydation (Park et al. 1995). En revanche, l'insuline active l'expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la lipogenèse (ACLY et FAS) (Foufelle et al. 2002; Griffin et al. 2004) ou la glycolyse (GK, 6PF1K et PK) (Foufelle et al. 2002; Pilkis et al. 1992; Printz et al. 1993). Il a ainsi été démontré que l'insuline augmente l'activité de la FAS chez des animaux diabétiques re-nourris (Lakshmanan et al. 1972) et que cet effet reflète l'action de l'insuline sur la transcription du gène codant pour cette enzyme (Paulauskis et al. 1989). Chez les poissons et notamment la truite, peu de données sont actuellement disponibles concernant la régulation par l'insuline des gènes du métabolisme intermédiaire. Une étude réalisée sur daurade royale démontre néanmoins que *in vivo* l'insuline inhibe l'expression du gène G6Pase après injection intrapéritonéale mais également *in vitro* sur culture primaire d'hépatocytes, (Salgado et al. 2004).

Concernant les effets inhibiteurs de l'insuline sur la transcription, plusieurs cis-acting insulin-response ont été répertoriés mais aucun élément de réponse à l'insuline (ERI) consensus n'a été identifié. Il est possible que l'effet négatif de l'insuline soit relayé par différents patrons d'interactions entre les facteurs de transcription et la région promotrice des gènes. En effet, différents gènes régulés négativement par l'insuline, le sont par des combinaisons de facteurs de transcription différentes (Mounier et al. 2006). Il apparaît cependant que les protéines FoxO jouent un rôle majeur dans les effets transcriptionnels négatifs de l'insuline (Barthel et al. 2005).

Concernant les gènes du métabolisme dont l'expression est induite par l'insuline, plusieurs ERI ont été identifiés dont le «sterol response element» (SRE) et le motif de liaison « activator protein 1 » (AP-1). SRE se lie au facteur de transcription de la famille des « SRE-binding protein » (SREBP) et plus particulièrement au facteur SREBP-1c qui est impliqué dans l'activation des gènes de la lipogenèse (Eberlé et al. 2004). Le motif de liaison AP-1 se liant aux facteurs de transcription de la famille des « Jun » et des « FRA », a été identifié dans le promoteur de l'enzyme malique (ME). Par ailleurs, un large nombre de gènes répondant à l'insuline arbore un autre type d'ERI, contenant des régions riches en GC et se liant au facteur de transcription Sp1, considéré comme un élément clé dans la médiation des effets de l'insuline sur la transcription des gènes hépatiques (Samson et al. 2002). Enfin, il est à noter que l'expression de certains facteurs de transcription, dont SREBP-1c, est elle-même régulée par l'insuline (Fleischmann et al. 2000; Matsumoto et al. 2002; Nadeau et al. 2004).

II.1 Les facteurs de transcriptions régulés par l'insuline

Pour que les facteurs de transcription se lient à leur séquence d'ADN cible, ils doivent être exprimés dans le tissu approprié, avoir accès au noyau et être dans une conformation leur permettant d'interagir avec l'ADN mais également des protéines partenaires. Ainsi, l'insuline régule la transcription en influençant le taux, la localisation et l'activité des facteurs de transcription. Nous allons détailler comment l'insuline régule, dans le foie, les fonctions spécifiques de FoxO et SREBP : deux médiateurs clés des effets de l'insuline sur la transcription des gènes auxquels nous nous sommes plus particulièrement intéressés au cours de cette thèse. Pour ces facteurs de transcription d'autres régulateurs autres que l'insuline existent mais nous ne les détaillerons pas ici.

II.1.1. Les protéines FoxO

Les protéines FoxO ou forkhead transcription factors constituent une famille de facteurs de transcription de classe O comprenant les facteurs FoxO1, FoxO3, FoxO4, et FoxO6. Ces protéines participent au fonctionnement normal de la cellule mais interviennent également dans les processus cellulaires pathologiques. Les protéines FoxO jouent en particulier un rôle important dans la médiation des effets cellulaires de l'insuline chez de nombreuses espèces car ces effets sont retrouvés chez le ver *Caenorhabditis elegans* comme chez la drosophile et les mammifères

En ce qui concerne leur structure, les facteurs de transcription FoxO contiennent un motif de type « winged helix », leur nom étant lié à l'apparence de la protéine sous forme de papillon en cristallographie aux rayons X et RMN. Ces protéines présentent 3 hélices α , 3 feuillets β et deux boucles qui lui confèrent sa forme de papillon. Les protéines FoxO ont la capacité de se lier à l'ADN par l'intermédiaire d'une séquence consensus de type T/C-G/A-A-A-C-A-A. Cette séquence consensus liant FoxO peut présenter des variations mais dans tous les cas la séquence AAACA reste conservée.

Les protéines FoxO interviennent dans les mécanismes de signalisation cellulaire en subissant des modifications post-traductionnelles essentielles à leur régulation. On trouve parmi ces modifications des réactions de phosphorylation, d'acétylation et d'ubiquitination. Akt représente une des principales kinases impliquées dans la phosphorylation des protéines FoxO. En phosphorylant FoxO1, Akt entraîne l'exclusion nucléaire de FoxO1 et sa séquestration dans le cytoplasme (Taniguchi et al. 2006). Une fois dans le cytoplasme, les protéines FoxO1 sont prises en charge par les protéines de liaison 14-3-3 au niveau des sites phosphorylés par Akt, masquant ainsi le signal de localisation nucléaire (Cahill et al. 2001; Obsil et al. 2003). Les protéines FoxO subissent ensuite une polyubiquitination avant d'être dégradées (Matsuzaki et al. 2003). Ainsi la transcription des gènes cibles des protéines FoxO se voit inhibée par absence du facteur de transcription FoxO dans le

noyau. L'acétylation représente enfin la dernière voie de régulation des protéines FoxO. Les protéines FoxO peuvent être acétylées par des histones acetyltransferases comme les protéines p300 et CBP (CREB-binding protein) et le facteur associé à CBP (CBP-associated factor) et inversement déacétylées par l'intermédiaire d'histones déacétylases comme SIRT1. L'acétylation des protéines FoxO par CBP conduit par exemple à la translocation des protéines FoxO vers le noyau de la cellule mais leur activité reste faible car l'acétylation des résidus lysine limite la capacité des protéines FoxO à se lier à l'ADN (Matsuzaki et al. 2005).

II.1.2. Les protéines SREBP

SREBP1-c appartient à la famille de facteurs de transcription SREBP initialement impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes par la disponibilité en cholestérol (Wang et al. 1994). Cette famille comprend trois isoformes: SREBP-1a, SERBP-1c et SERBP-2. Les protéines SREBP-1a et 1c sont produites par un seul et même gène (SREBF-1) (Hua et al. 1995; Miserez et al. 1997). Les transcrits SREBP-1a et 1c sont générés par l'utilisation de sites alternatifs d'initiation de la transcription et diffèrent uniquement par leur premier exon (1a et 1c). Les isoformes 1a et 1c diffèrent également par leur distribution tissulaire. Alors que SREBP1-c s'exprime dans la plupart des tissus des mammifères avec des niveaux d'expression particulièrement élevés dans le foie, le tissu adipeux blanc, les glandes surrénales et le cerveau (Shimomura et al. 1997) et plus raisonnablement dans le muscle (Ducluzeau et al. 2001; Guillet-Deniau et al. 2002), SREBP-1a est plus particulièrement représenté dans les tissus à forte capacité proliférative comme la rate et l'intestin (Shimomura et al. 1997). SREBP-2, le 3^{ème} membre de cette famille de facteurs de transcription dérive d'un gène différent (SREBF-2) et présente environ 50% d'homologie en acides aminés avec SREBP-1. Les trois isoformes présentent en revanche une structure commune comprenant un fragment N-terminal de 480 acides aminés de type hélice-boucle-hélice « leucine zipper » (Foufelle et al. 2002), une région de 80 acides aminés contenant deux domaines transmembranaires séparés par 31 acides aminés localisés dans la lumière du reticulum endoplasmique et un domaine de régulation C-terminal de 590 acides aminés.

Dans le foie, SERBP-1c est la forme majoritairement impliquée dans la régulation des gènes de la lipogenèse codant pour l'acetyl-CoA carboxylase, l'acide gras synthase et la stearoyl-CoA desaturase et SREBP-2 semble principalement réguler les gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol. SREBP-1a participe à la régulation de ces deux voies (Eberlé et al. 2004). Les protéines SREBP sont régulées à plusieurs niveaux par l'insuline : par modification de leur transcription, par clivage protéolytique de leurs précurseurs et par modifications traductionnelles dans le noyau de la cellule.

Dans le foie et les adipocytes, l'insuline induit la transcription du gène SREBP-1 (Foretz et al. 1999; Kim et al. 1998) *via* l'activation de la voie PI3K et Akt (Azzout-Marniche et al. 2000; Fleischmann et al. 2000; Ribaux et al. 2003) et un mécanisme impliquant le facteur de transcription LXR α (liver X receptor α) (Chen et al. 2004). Cependant, les mécanismes précis de la régulation de ce gène par l'insuline ne sont toujours pas élucidés (Osborne et al. 2009)

Les protéines SREBP sont synthétisées à partir de précurseurs inactifs associés aux protéines SCAP (SREBP cleavage-activating proteins) dans le réticulum endoplasmique (Nohturfft et al. 1998). Les protéines Insig1 et Insig2a et 2b considérées comme des partenaires de SCAP ont pour fonction de retenir le complexe SREBP-SCAP au niveau des vésicules CPO II du réticulum endoplasmique (Yabe et al. 2002; Yang et al. 2002). Après une stimulation par l'insuline, les complexes SREBP/SCAP sont transportés du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi pour y être clivés par les protéases site 1 et site 2 (S1P et S2P) (Hua et al. 1995; Nohturfft et al. 1998; Sakai et al. 1998; Wang et al. 1994). En effet, en accélérant la dégradation de l'ARNm codant pour Insig-2a l'insuline réduirait de façon sélective le niveau de protéines Insig-2a favorisant ainsi le transfert des précurseurs SREBP vers l'appareil de Golgi (Yellaturu et al. 2009). A l'intérieur du noyau, la phosphorylation de SREBP induite par l'insuline sur des résidus sérine et thréonines spécifiques semble augmenter l'activité de SREBP (Eberlé et al. 2004; Ilyedjian et al. 2000; Kotzka et al. 2004; Roth et al. 2000; Wang et al. 1998). Différentes études ont montré qu'à l'intérieur du noyau, l'insuline pouvait induire la phosphorylation de SREBP. En effet, *via* l'activation de la voie MAPK, l'insuline induit la phosphorylation de SREBP-2 sur les résidus Ser-432 and Ser-455, ainsi que la phosphorylation de SREBP-1a sur la sérine 117 (Kotzka et al. 2004; Roth et al. 2000). Ces phosphorylations n'ont apparemment pas d'influence sur l'interaction entre le facteur de transcription et l'ADN mais semble augmenter l'activité du facteur de transcription (Eberlé et al. 2004; Ilyedjian et al. 2000; Kotzka et al. 2004; Roth et al. 2000; Wang et al. 1998).

En résumé, les régulations de l'insuline sur la transcription des gènes hépatiques sont diverses et complexes. Nous avons choisi deux exemples pour les illustrer : l'inhibition du gène G6Pase et l'activation du gène FAS.

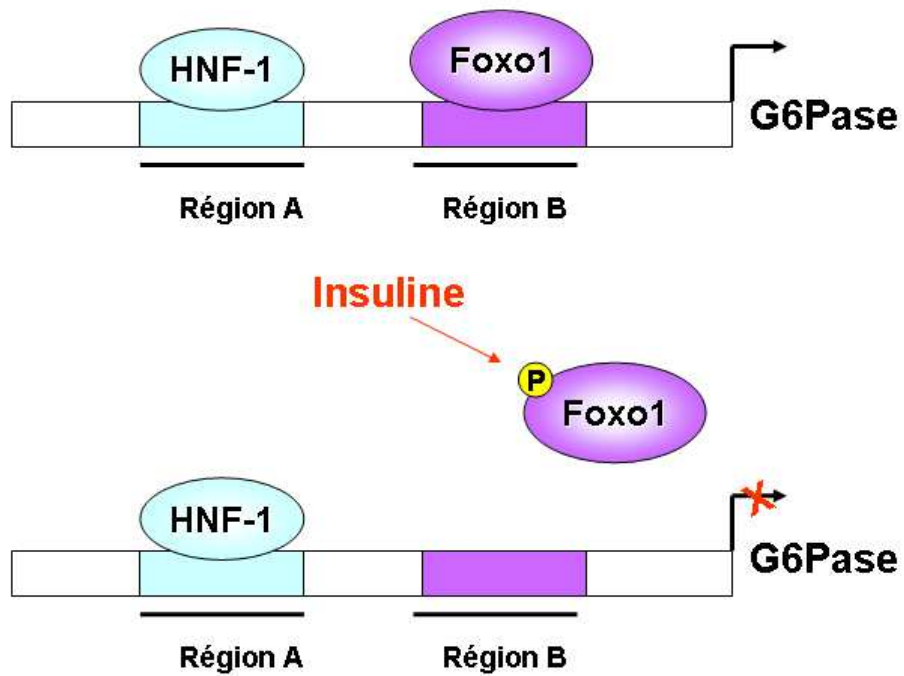


Figure 18 : Représentation schématique des séquences cibles de l'insuline dans le promoteur du gène codant pour la glucose-6-phosphatase (G6Pase).

II.2. Exemples de régulation moléculaire par l'insuline

II.2.1 Inhibition de la transcription du gène G6Pase par l'insuline

L'effet inhibiteur de l'insuline sur la transcription du gène G6Pase est assuré par la présence dans le promoteur de la G6Pase d'une unité de réponse à l'insuline composée de deux régions, nommées région A et région B (Streeper et al. 1998). Dans le promoteur du gène G6Pase de souris, la région A est située entre les paires de bases (pb) -231 et -199 en amont du site d'initiation de la transcription, alors que la région B est comprise entre les pb -198 et -159. La région A lie le facteur de transcription HNF-1 (hepatocyte nuclear factor 1) qui agit comme un élément accessoire afin d'augmenter l'effet de l'insuline véhiculé par la région B (Streeper et al. 1998). La région B contient de son côté trois séquences de réponse à l'insuline (SRI) nommées respectivement SRI-1, SRI-2 et SRI-3 (Streeper et al. 1998) mais seules SRI-1 et 2 sont nécessaires à l'effet inhibiteur de l'insuline sur l'expression du gène G6Pase. (Vander Kooi et al. 2003). Le facteur de transcription FoxO1 se lie à SRI-1 et SRI-2 pour activer la transcription de G6Pase (Onuma et al. 2006; Vander Kooi et al. 2003). Ce facteur de transcription joue un rôle important dans l'effet inhibiteur de l'insuline sur l'expression du gène G6Pase (Schmoll 2000; Vander Kooi et al. 2003). En effet, en présence d'insuline, la protéine Akt, phosphoryle FoxO1 entraînant ainsi son exclusion du noyau et l'inhibition de la transcription de G6Pase (Taniguchi et al. 2006) (Figure18)

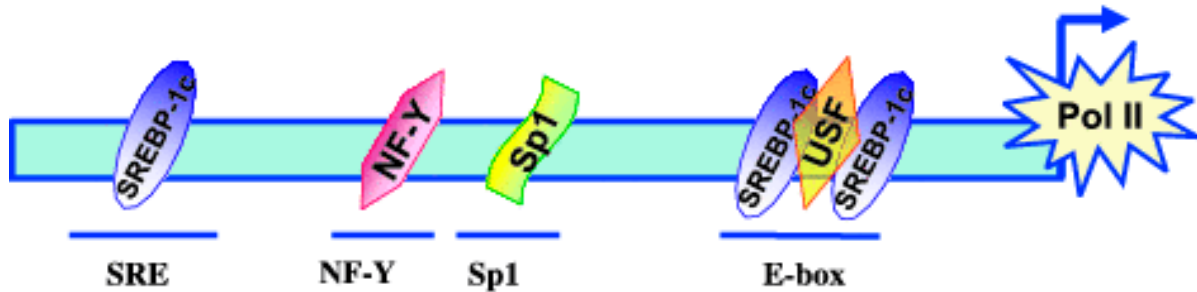


Figure 19 : Représentation schématique des séquences cibles de l'insuline dans le promoteur du gène codant pour la fatty acid synthase (FAS).

Le schéma présente les différentes régions du promoteur impliquées dans la régulation de l'expression du gène FAS par l'insuline. SRE, sterol regulatory element ; NF-Y, nuclear transcription factor Y ; Sp1, specific protein 1 ; SREBP-1c, sterol regulatory binding protein 1c ; USF, upstream stimulatory factor 1 ; Pol II, RNA polymerase II (d'après Mounier et al, 2006).

II.2.2 Activation de la transcription du gène FAS par l'insuline

L'insuline et le glucose agissent de façon synergique pour activer l'expression des gènes de la lipogenèse dans le foie en ciblant différentes régions promotrices (Dentin et al. 2005). Le promoteur du gène FAS possède plusieurs éléments de réponse à l'insuline (ERI) qui interagissent avec plusieurs facteurs de transcription (Figure 19). Le premier ERI caractérisé dans le promoteur du gène FAS est la E-box, qui lie les facteurs de transcription ubiquitaires USF-1 et 2 (upstream stimulatory factor 1 and 2) chez des animaux re-nourris (Moustaïd et al. 1994; Wang et al. 1995). D'autres séquences promotrices interviennent dans l'activation totale par l'insuline. En effet, il existe deux sites de liaison pour SREBP-1c identifiés dans la région promotrice du gène FAS. Il s'agit d'une séquence SRE classique (Latasa et al. 2003) et d'un site qui chevauche la E-box (Kim et al. 1998). L'insuline induit la transcription du gène FAS *via* l'augmentation de la protéine SREBP-1c (Azzout-Marniche et al. 2000; Shimomura et al. 1999). Des études réalisées sur des animaux transgéniques ont identifié un SRE, situé 150 pb avant le site d'initiation, comme étant le site physiologique de l'action de SREBP-1c (Griffin et al. 2004; Latasa et al. 2003). Latasa et al (2003) ont également montré que la liaison de SREBP-1c au SRE entraîne l'activation maximale de la transcription du gène FAS par interaction avec le facteur USF attaché à la E-box. Dans les hépatocytes, la région localisée entre les nucléotides -151 et -42 du promoteur de FAS et comprenant la E-box, un site de liaison à SREBP-1, un site NF-Y (nuclear transcription factor Y) et un site Sp1, est impliquée dans la médiation des effets de l'insuline et des glucides sur la transcription du gène FAS. La mutation d'un seul de ces sites abolit l'effet de l'insuline et du glucose sur la transcription du gène FAS (Magaña et al. 2000).

PARTIE C. LA TRUITE ARC-EN-CIEL : ESPECE MODELE EN NUTRITION (ESPECE « CARNIVORE »)

Parmi toutes les espèces étudiées en nutrition animale, la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) occupe un espace particulier, celui de l'alimentation des espèces carnivores au même titre que le chat domestique (Verbrugghe et al. 2010). En effet, la truite présente une alimentation riche en protéines (au minimum 30-35% (35g de protéines pour 100g d'aliment)) et en lipides (en général autour de 25% mais pouvant aller jusqu'à 45%). En revanche, la truite utilise faiblement les glucides, rendant impossible leur incorporation dans l'aliment au-delà de 15-20% sans conséquence forte sur les performances de croissance (NRC 1993). A l'état naturel, la truite est insectivore et piscivore la plaçant à un niveau trophique (position occupée au sein de la chaîne alimentaire) d'environ 3 (prédateurs) ou 4 (carnivores). L'alimentation de la truite est pauvre voire quasiment dépourvue en glucides digestibles. Cette caractéristique est sans doute à l'origine des particularités nutritionnelles et métaboliques de l'animal (Guillaume et al. 1999) prises en compte dans la formulation des aliments. Il est à noter que toutes les espèces de poissons ne possèdent pas ces caractéristiques spécifiques des carnivores. En effet, une espèce omnivore comme la carpe commune (*Cyprinus carpio*) utilise efficacement les glucides (Hemre et al. 2002). La truite est donc un modèle original et précieux pour comprendre l'utilisation postprandiale des acides aminés alimentaires présents en forte quantité dans le plasma après un repas. La question centrale de cette thèse est donc d'étudier chez cette espèce modèle le rôle joué par les acides aminés dans la régulation du métabolisme intermédiaire dans le foie.

I. Nutrition protéique de la truite : utilisation efficace des acides aminés alimentaires

Chez les poissons 10 acides aminés sont essentiels : l'arginine, la méthionine, la lysine, l'isoleucine, la leucine, la valine, l'histidine, la thréonine, le tryptophane, et la phénylalanine. On distingue également chez les poissons deux acides aminés semi-essentiels, qui ne peuvent être synthétisés qu'à partir d'acides aminés essentiels. Ce sont la cystéine et la tyrosine qui dérivent respectivement du couple sérine-méthionine et de la phénylalanine (Guillaume et al. 1999).

La digestion des protéines alimentaires sous l'action des enzymes gastriques, pancréatiques et intestinales libère des acides aminés libres et des di- et tripeptides qui sont ensuite absorbés au niveau de la bordure en brosse des entérocytes de la muqueuse intestinale. Chez la truite, la digestion des protéines et l'absorption des acides aminés s'effectue au niveau de l'intestin grêle et plus particulièrement au niveau des caeca pyloriques (structures en forme de doigt situées à la jonction de l'estomac et de l'intestin en dessous du pylore) (Buddington et al. 1997).

Tableau 3 : Concentrations en acides aminés mesurées au niveau de la veine porte chez la truite et le rat à jeun et nourris (adapté de Karlsson et al., 2006 et Azzout-Marniche et al., 2007)

$\mu\text{mol/l}$	Truite		Rat	
	A jeun	Nourris	A jeun	Nourris
Arginine	95	382	52	47
Histidine	137	141	27	39
Isoleucine	217	422	39	37
Leucine	373	850	73	68
Lysine	362	764	269	235
Methionine	61	228	26	28
Phenylalanine	90	182	38	39
Threonine	234	533	163	163
Tryptophane	19	28	-	-
Valine	449	806	91	98
Alanine	629	1387	262	415
Aspartic Acid	9	10	27	33
Cysteine	8	12	-	-
Glutamic acid	30	56	286	280
Glycine	405	867	224	179
Hydroxylysine	3	14	-	-
Proline	49	340	100	155
Serine	113	496	179	159
Taurine	332	826	45	82
Tyrosine	66	162	44	52

Cependant, le rôle de l'intestin ne se limite pas seulement à la digestion des protéines et à l'absorption des acides aminés. En effet, plusieurs études indiquent que l'intestin est un site majeur du catabolisme des acides aminés chez l'homme comme chez la truite, modifiant ainsi le profil postprandial en acides aminés plasmatiques par rapport à celui des protéines alimentaires (Riedijk et al. 2007; Stoll et al. 1998; Wu 2009). Les acides aminés et peptides arrivent ensuite au foie par la veine porte. Ces acides aminés plasmatiques sont présents en quantité importante chez la truite comme l'indiquent les concentrations plasmatiques mesurées au niveau de la veine porte chez la truite et chez le rat dans des conditions de jeûne et d'alimentation (Tableau 3) (Azzout-Marniche et al. 2007; Karlsson et al. 2006). Les acides aminés non captés par le foie sont par la suite utilisés principalement par le tissu musculaire pour la protéosynthèse.

Comme écrit précédemment, l'utilisation métabolique des acides aminés est donc très efficace chez la truite. Ainsi, comme chez la plupart des espèces animales, les acides aminés ingérés par la truite sont utilisés comme substrats pour la synthèse des protéines et de nombreux composés azotés tels que les nucléotides et les amines. De façon remarquable, les acides aminés sont aussi utilisés efficacement comme source d'énergie préférentiellement au glucose d'origine alimentaire (Walton et al. 1982). Ceci est à mettre en relation avec le catabolisme des acides aminés qui s'avère peu coûteux en énergie chez les poissons. En effet, l'ammoniaque, produit final de la dégradation des protéines, peut être directement excrété dans le milieu aquatique par les branchies, la peau et les urines, alors qu'il doit être transformé en urée chez les mammifères ou en acide urique chez les oiseaux et les reptiles. Ainsi, lors du catabolisme des acides aminés, leur squelette carboné peut également servir à la synthèse *de novo* des acides gras par la voie lipogénique ou du glucose par la voie néoglucogénique (Henderson et al. 1987; Hillgartner et al. 1995). En effet, chez la truite comme chez les mammifères, la plupart des acides aminés, à l'exception de la lysine et de la leucine, sont des substrats néoglucogéniques qui permettent à cette espèce de maintenir une glycémie constante et proche de celle de l'homme (4-5 mM) quel que soit son statut nutritionnel (à l'exception notable d'une alimentation riche en glucides) (Suarez et al. 1987). Enfin, certains aminés (comme l'arginine mais aussi l'alanine, la méthionine et la sérine) sont impliqués dans la sécrétion de l'insuline et sont reconnus pour être de meilleurs sécrétagogues d'insuline que le glucose (Andoh 2007). Le rôle des acides aminés dans la régulation du métabolisme intermédiaire (gluco-lipidique-énergétique) est encore inconnu chez la truite et la plupart des espèces animales.

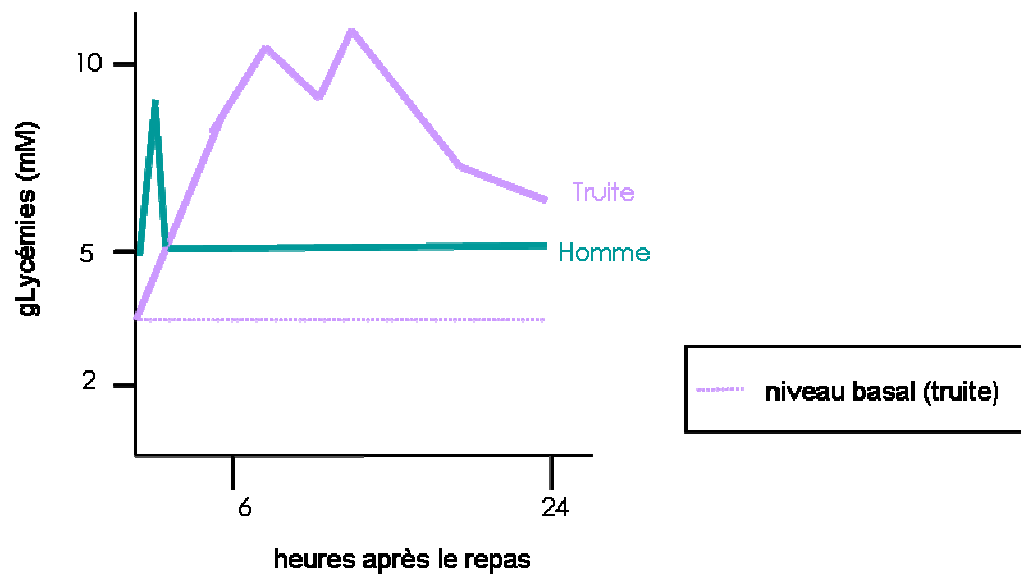


Figure 20 : Comparaison schématique des glycémies postprandiales de l'homme et de la truite après un repas contenant des glucides digestibles (d'après (Guillaume et al. 1999).

II. Nutrition glucidique de la truite : faible utilisation métabolique du glucose d'origine alimentaire

Les amidons natifs étant peu digestibles pour la truite, un traitement hydrothermique des matières premières (cuisson, extrusion, floconnage, toastage) est nécessaire afin d'améliorer leur digestibilité (>80%) (Krogdahl et al. 2005; Wilson 1994). Le problème de digestibilité des amidons étant résolu, ce qui fait encore l'objet de nombreuses interrogations est l'utilisation métabolique des glucides simples (Hemre et al. 2002; Moon 2001). En effet, la truite est considérée comme intolérante au glucose. L'administration par voie orale ou intraveineuse de glucose, ainsi qu'un repas riche en glucides digestibles entraînent une hyperglycémie persistante de l'ordre de 24h, chez différentes espèces de poissons, y compris la truite arc-en-ciel, en dépit d'une sécrétion d'insuline normale (Backer et al. 1997; Bergot 1979; del sol Novoa et al. 2004; Legate et al. 2001; Palmer et al. 1972; Parrizas et al. 1994; Plisetskaya 1994) (Figure 20).

Les mécanismes à l'origine de la faible utilisation métabolique du glucose alimentaire chez la truite ont été largement étudiés ces dernières années au niveau biochimique et moléculaire mais ne sont toujours pas totalement élucidés (Panserat 2009). La truite, bien que possédant l'ensemble des acteurs impliqués dans l'utilisation du glucose comme ceux impliqués dans le transport du glucose et les enzymes de la glycolyse/glyconéogenèse, ne semble pas réussir à s'adapter rapidement à un régime contenant des proportions élevées de glucides digestibles (> à 20%). Le muscle blanc n'utilise que faiblement le glucose comme source d'énergie, illustré par un transport et une phosphorylation du glucose peu efficaces (Panserat 2009). La présence d'un faible nombre de récepteurs de l'insuline pourrait en partie expliquer ce phénomène. Par ailleurs, la lipogenèse à partir du glucose dans le foie et le tissu adipeux est, elle aussi, peu induite après un repas riche en glucides (Panserat 2009). Enfin, après un repas riche en glucides, on observe chez la truite, une absence d'inhibition de l'activité et de l'expression hépatique de plusieurs enzymes clés insulino-dépendantes de la néoglucogenèse comme la G6Pase, la FBPase et la PEPCK (Panserat et al. 2001a; Panserat et al. 2000c; Panserat et al. 2001b; Tranulis et al. 1996), qui est une caractéristique du diabète de type II chez l'homme (Panserat 2009).

III. Existe-t-il un effet des acides aminés sur la régulation du métabolisme intermédiaire glucolipidique pouvant expliquer la faible utilisation des glucides chez la truite?

Des études réalisées au laboratoire (Kirchner et al. 2003b), ont montré que la réduction du taux de protéines alimentaires - tout en maintenant une ingestion constante de glucides -permettait de restaurer l'inhibition de ces enzymes néoglucogéniques. Ces résultats suggéraient donc l'existence

d'interactions entre les acides aminés et l'insuline. De plus, de nombreuses données récentes, bien que quelquefois discordantes, suggèrent aussi un rôle des protéines alimentaires dans l'apparition/le maintien de l'insulino-résistance chez les mammifères (Tremblay et al. 2007b). En effet, comme décrit précédemment (Partie B, V), la sur-activation de la voie TOR/S6k1 liée à un excès en acides aminés, induirait un rétrocontrôle négatif sur les éléments précoces de la voie de signalisation de l'insuline entraînant ainsi des perturbations dans la propagation du signal insulinique dans la cellule.

- **Chez la truite, la forte proportion d'acides aminés alimentaires plasmatiques au niveau postprandial pourrait interagir (négativement) avec l'insuline et perturber ses effets sur la régulation de l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire (métabolisme gluco-lipidique en particulier) dans le foie. Ceci constituait l'hypothèse principale à l'origine du sujet de cette thèse.**

PARTIE D. OBJECTIFS DE LA THESE

Les objectifs de ce travail de thèse étaient les suivants :

- 1) Caractériser, pour la première fois *in vivo* et *in vitro*, les différents acteurs des voies de signalisation intracellulaire de l'insuline et des acides aminés (Akt, FoxO1, TOR, S6K1 et S6) et leurs régulations par l'insuline, les acides aminés (mélange d'acides aminés, leucine, lysine, méthionine) et le statut nutritionnel (à jeun/nourri) dans le foie de truite arc-en-ciel.
- 2) Etudier, *in vitro* sur culture primaire d'hépatocytes de truite, la régulation par l'insuline et/ou les acides aminés (mélange d'acides aminés, leucine, lysine, méthionine) de l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire cibles de l'insuline impliqués dans : la néoglucogenèse (G6Pase, FBPase, mPEPCK), la glycolyse (GK, 6PF1K, PK), la lipogenèse (FAS, ACLY, SREBP1) et le métabolisme des acides aminés (AS et SD).
- 3) Etudier, *in vivo*, l'effet d'un remplacement des huiles et farines de poissons par des huiles et protéines végétales sur la signalisation Akt/TOR et la régulation de l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire impliqués dans la néoglucogenèse (G6Pase, FBPase, mPEPCK), la glycolyse (PK), la lipogenèse (FAS) et la β -oxydation des lipides (CPT1).

MATERIELS ET METHODES

I. Matériel biologique : truite arc-en-ciel

Les truites arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792) diploïdes utilisées pour la culture cellulaire ainsi que pour l'étude *in vivo* proviennent de la pisciculture expérimentale de l'INRA de Donzacq (Landes). Les juvéniles de truites arc-en-ciel ont été maintenus sous photopériode naturelle, dans des bassins circulaires de 1m³ (environ 300 L d'eau) alimentés en continu à un débit de 50L/min par une eau douce prélevée dans les sources naturelles de température constante 18±1°C tout au long de l'année. Les poissons ont été nourris manuellement, deux fois par jour, jusqu'à satiété visuelle.

II. Etude *in vitro* de l'effet des acides aminés sur la régulation des gènes du métabolisme intermédiaire : protocole expérimental de culture primaire d'hépatocytes de truite-arc-en-ciel (Articles 1 et 2)

II.1 Dissociation des hépatocytes et mise en culture

Pour la culture cellulaire, les truites d'un poids variant de 250g à 400g selon les expériences ont été transférées dans les installations expérimentales du laboratoire de Saint Pée-sur-nivelle. Les poissons ont été maintenus dans des bacs de 60L, dans un circuit fermé thermorégulé à une température de 18 ± 1°C. Trois jours avant la mise en culture des hépatocytes, les poissons ont été mis à jeun afin de vider le tractus digestif et faciliter la réalisation de la perfusion *in situ* du foie. Le jour de l'expérimentation, les truites ont préalablement été anesthésiées dans un bac contenant de l'acide amino-benzoïque (60mg/l), puis pesées et désinfectées à l'alcool 70%. Elles ont ensuite été placées dans un bac de dissection et ouvertes longitudinalement de l'anus à la bouche.

Les hépatocytes ont été isolés selon la méthode dite de perfusion *in situ* (Mommsen et al. 1994) décrite ci-après. Tout d'abord, la vésicule biliaire est ligaturée avec une pince clamps puis le foie est délicatement canulé à l'aide d'un cathéter introduit dans la veine porte. Une première solution dite de « perfusion » (hepatocyte liver perfusion medium ; Invitrogen Carlsbad, Californie, USA) est injectée dans le foie à l'aide d'une pompe péristaltique avec un débit de 2ml/min afin d'éliminer des globules rouges du foie. Le cœur est alors incisé afin de limiter l'arrivée de sang dans le foie. Lorsque le foie devient de couleur blanchâtre (signifiant que le foie ne contient quasiment plus de globules rouges), une seconde solution dite de « digestion » (hepatocyte liver digestion medium ; Invitrogen Carlsbad, Californie, USA) est injectée avec un débit de 2ml/min. La solution de digestion contient de la collagénase, enzyme capable de rompre les liaisons peptidiques du collagène, donc de dissocier les cellules.

Tableau 4 : Composition du milieu de Hank modifié.

Composition	Concentration (mM)
NaCl	139,9
KCl	5,4
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,8
Na ₂ HP0 ₄ ×7H ₂ O	0,33
KH ₂ P0 ₄	0,44
NNaHCO ₃	5
HEPES	5
HEPES×Na	5

Tableau 5 : Composition en acides aminé du milieu de culture (1X).

Composition	Concentration (µM)
MEM essentiels	
L-arginine	600
L-cystine	100
L-histidine	200
L-isoleucine	400
L-leucine	400
L-lysine	400
L-méthionine	100
L-phénylalanine	200
L-thréonine	400
L-tryptophane	50
L-tyrosine	200
L-valine	400
MEM non essentiel	
Glycine	100
L-alanine	100
L-asparagine	100
L-acide aspartique	100
L-acide glutamique	100
L-proline	100
L-sérine	100

Lorsque le foie s'affaisse et devient « mou au toucher », il est excisé, séparé de la vésicule biliaire, pesé puis placé sous une hotte à flux laminaire. Suite à la dissociation enzymatique, le foie est soumis à une dissociation mécanique par trituration à l'aide de scalpels dans une solution de rinçage constituée du milieu de Hank modifié (Tableau 4) auquel est ajouté 1mM EGTA. La suspension cellulaire ainsi obtenue est filtrée sur toile à bluter de 250 puis 100 μm afin d'éliminer les amas de cellules trop importants. Le filtrat est alors centrifugé une première fois à 120g pendant 2 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est resuspendu dans un volume, correspondant à 5 fois le poids du foie, constitué pour moitié de solution de rinçage et pour l'autre moitié d'un milieu de resuspension (milieu de Hank modifié, 1.5 mM CaCl_2 et 1.5% BSA délipidé (Sigma, St. Louis, MO, USA)). La suspension cellulaire est ensuite centrifugée une deuxième fois (120g pendant 2 minutes) puis les cellules sont remises en suspension dans un volume de milieu de resuspension équivalent à 5 fois le poids du foie. Après une troisième centrifugation (120g pendant 2 minutes), les cellules sont reprises dans du milieu de culture (milieu de Hank modifié, 1.5 mM CaCl_2 , 1% BSA délipidé, 3 mM glucose, acides aminés essentiels et non essentiels (Invitrogen Carlsbad, California, USA) à la concentration 1X (Tableau 5), solution antibiotique et antimétabolique (1X) (Sigma, St. Louis, MO, USA)]. La viabilité des cellules (> 98%) est évaluée par la méthode d'exclusion au bleu trypan (0.04% dans 0.15 M NaCl) puis les cellules sont comptées sur cellule de Neubauer. La suspension d'hépatocytes est enfin diluée et distribuée dans des plaques de culture 6 puits (Primaria, BD, USA) à une densité de $3 \cdot 10^6$ cellules/puit. Les hépatocytes sont mis à incuber à 18°C pendant 48h avant le début des stimulations. L'examen au microscope permet de s'assurer que les hépatocytes se réassocient progressivement pour former des ensembles bidimensionnels, en accord avec ce qui est décrit dans la littérature (Ferraris et al. 2002; Segner 1998) (Figure 21). Les contrôles de la viabilité cellulaire et de la cytotoxicité ont été respectivement réalisés à l'aide des kits CellTiter 96® (Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, Wisconsin, USA) et Cyto Tox 96® (Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega, Madison, Wisconsin, USA). Le pH et la pression osmotique de tous les milieux de cultures et expérimentaux ont été vérifiés avant utilisation. Le pH a été calibré à 7,6 et la pression osmotique à 300 mosmol.l⁻¹ à l'aide d'un osmomètre (K7400, Knauer, Berlin, Allemagne).

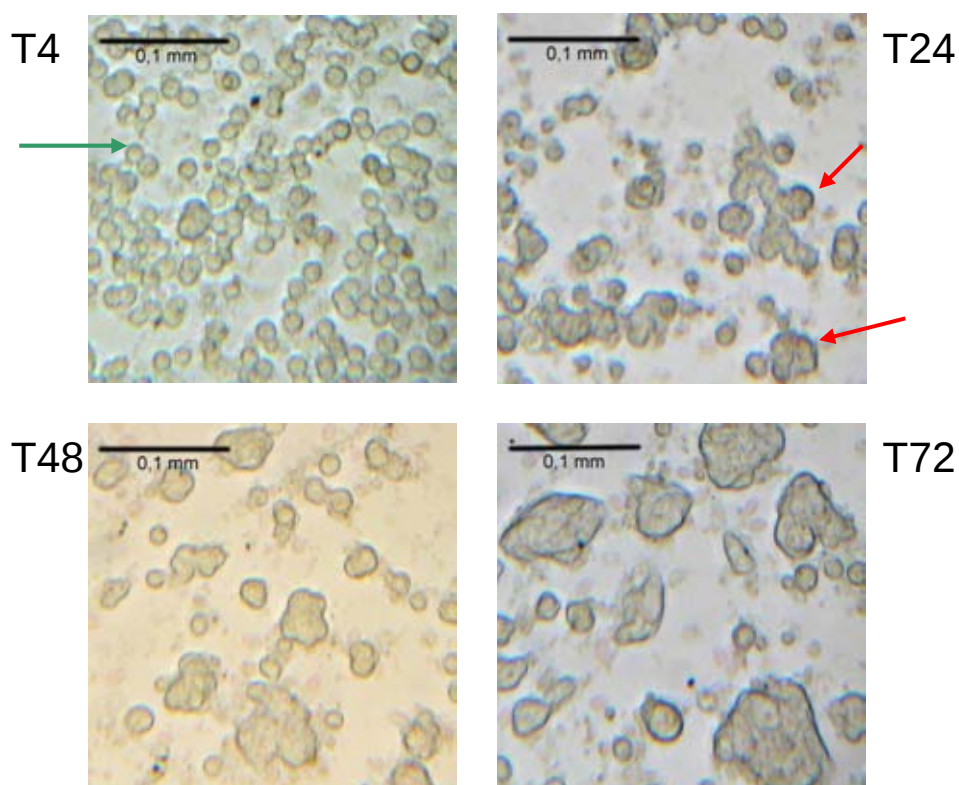


Figure 21 : Photos d'hépatocytes de truite arc-en-ciel après 4h (T4), 24h (T24), 48h (T48) et 72h (T72) de culture.

Dès 24h, les cellules initialement bien individualisées (flèche verte) commencent à se regrouper pour former des amas cellulaires (flèche rouge).

Tableau 6 : Composition du tampon de lyse

Composition	Concentration
NaCl	150mM
Tris-HCL	10mM
EGTA	1mM
EDTA	1mM
Sodium Fluoride	100mM
Sodium Pyrophosphate	4mM
Sodium Orthovanadate	2mM
Triton X-100	1%
IGEPAL	0,50%
Cocktail anti-protéases	1 tablette/50ml

EDTA, acide éthylène diamine tétraacétique ; EGTA, acide éthylène glycol tétraacétique.

II.2. Stimulation et récupération des cellules

Après 48h de culture, les cellules ont été placées dans un milieu dépourvu en acides aminés 2h avant les stimulations (période de sevrage). Pour les conditions impliquant la rapamycine, cet inhibiteur spécifique de TOR est ajouté 30 minutes avant les stimulations à une concentration de 25nM. Puis, suivant les cas, les cellules sont stimulées avec 1,5ml de milieu expérimental :

- pendant 15 minutes pour l'étude des voies de signalisation par western blot,
- pendant 8h ou 24h pour les études d'expression de gènes par qRT-PCR.

Les mécanismes de régulation sont des systèmes dynamiques. L'activation des voies de signalisation et notamment la phosphorylation des protéines cibles est un mécanisme qui se met en place rapidement après stimulation. En effet, l'effet de l'insuline sur la phosphorylation d'Akt intervient dès 5 minutes de stimulation (Plagnes-Juan et al. 2008). En revanche la régulation de l'expression des gènes est un mécanisme qui se met en place plus tardivement. En effet, des études préliminaires réalisées par Plagnes-Juan et al (2008) ont montré que la régulation des gènes du métabolisme intermédiaire, bien qu'apparaissant dès 8h est plus forte après 24h de stimulation.

- Cellules destinées aux analyses de phosphorylation des protéines

Une fois le temps de stimulation écoulé, le milieu de stimulation est retiré et les cellules sont lavées avec 1ml/puit de PBS froid. Puis, 300 µl de tampon de lyse (Tableau 6) sont ajoutés dans chaque puit. Les plaques contenant les cellules ainsi préparées sont alors conservées à -80°C jusqu'à extraction des protéines. La congélation des cellules en présence du tampon de lyse facilite le décollement du tapis cellulaire.

- Cellules destinées aux analyses d'expression des gènes

Une fois le milieu de stimulation retiré, 1ml de TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) est déposé dans chaque puit. Les cellules sont ensuite décollées du fond des puits à l'aide d'un grattoir. Le mélange de TRIZOL et de cellules est récupéré dans des micotubes et après homogénéisation, conservé à -80°C jusqu'à l'extraction des ARN totaux.

Tableau 7 : Composition des aliments expérimentaux.

Aliment (PV/HV)	0/0	50/50	50/100	100/100
Ingrédients (%)				
Farine de poisson	59	29	29	-
Gluten de maïs	-	20	20	20
Tourteau de soja	-	8	8	15.4
Gluten de blé	-	7.8	7.8	26
Maïs	7	7	7	7
Blé entier extrudé	12	3.2	3.2	0.1
Huile de poissons	19	11	-	-
Huile de colza	-	5.5	11	11.6
Huile de lin	-	2.2	4.4	4.6
Huile de palme	-	3.3	6.6	7
Lecithine de soja	-	-	-	1
L-lysine	-	-	-	1.2
L-arginine	-	-	-	0.1
CaHPO ₄ -2H ₂ O (18%P)	-	-	-	3
Astaxanthine	0.03	0.04	0.05	0.03
Mélange minéral	1	1	1	1
Mélange vitaminique	1	1	1	1
Composition Analytique				
Matière sèche (MS, %)	94.1	94.3	93.9	90.9
Potéines (% MS)	45.9	46.7	45.9	44.4
Lipides(% MS)	26.6	27.4	27.6	27.8
Amidon (% DM)	12.1	10.4	11.2	11.3
Energie (kJ/g MS)	24.1	25.4	25.5	25.7

¹ Sopropêche, Lorient, France ; ² Inzo, Argentan, France ; ³ Roquette, Lestrem, France ; ⁴ Lacadee Agro Industrie, Mont, France ; ⁵ Daudruy, Dunkerque, France ; ⁶ Louis François, Saint Maur, France ; ⁷ Eurolysine, Paris, France ; ⁸ Carophyll pink, DSM, Courbevoie, France ; ⁹ Mélange composé de (mg / kg d'aliment, sauf lorsque c'est indiqué): calcium carbonate (40% Ca) 2.15 g, magnesium hydroxide (60% Mg) 1.24 g, potassium chloride 0.9 g, ferric citrate 0.2 g, potassium iodine 4 mg, sodium chloride 0.4 g, calcium hydrogen phosphate 50 g, copper sulphate 0.3, zinc sulphate 40, cobalt sulphate 2, manganese sulphate 30, sodium selenite 0.3 ; ¹⁰ Mélange composé de (mg / kg d'aliment): retinyl acetate 2.58, DL-cholecalciferol 0.037, DL- α tocopheryl acetate 30, menadione sodium bisulphite 2.5, thiamin 7.5, riboflavin 15, pyridoxine 7.5, nicotinic acid 87.5, folic acid 2.5, calcium pantothenate 2.5, vitamin B₁₂ 0.025, ascorbic acid 250, inositol 500, biotin 1.25 and choline chloride 500.

III. Etude de l'effet d'un remplacement conjoint des huiles et farines de poissons par des huiles et protéines végétales dans l'aliment pour truite-en-ciel (Article n°3)

Cette étude a été menée dans le cadre du programme européen AQUAMAX 2007-2010 (Sustainable aquafeeds to maximise the health benefits of farmed fish for consumers ; <http://www.aquamaxip.eu>), impliquant de nombreux laboratoires européens. Ce projet, divisé en plusieurs programmes de recherche (Programme 1: Développement d'aliments basés sur des alternatives durables aux farines et huiles de poissons ; Programme 2: Bénéfices sur la santé de la consommation de poisson avec un focus sur les femmes enceintes et les maladies allergiques ; Programme 3: Sécurité des poissons élevés avec les nouveaux aliments développés dans le projet AQUAMAX; Programme 4: Perception des poissons d'élevage par le public, les consommateurs et les scientifiques), avait pour ambition de développer des aliments pour poisson à base de matières premières végétales, en remplacement de la farine et de l'huile de poisson. L'objectif général du programme 1 dans lequel cette étude s'inscrit était de réduire l'emploi des ressources naturelles marines pour l'élevage, sans altérer l'efficacité de production et la qualité du produit, tout en intégrant les notions de durabilité du système de production et d'amélioration de la santé et de la sécurité des consommateurs. Les recherches menées au laboratoire de Saint Pée-sur-Nivelle visaient à évaluer les conséquences des changements de régime alimentaire sur l'utilisation métabolique des nutriments, la qualité et la sécurité des produits, avec comme modèle d'étude la truite arc-en-ciel.

Plus spécifiquement, l'expérience réalisée au cours de ma thèse visait à évaluer l'effet d'un remplacement conjoint (partiel ou total) des huiles et farines de poissons par des huiles et protéines végétales sur la régulation de la signalisation Akt/TOR et l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire dans le foie de truite-en-ciel. Cet essai à été réalisé à la pisciculture expérimentale de l'INRA de Donzacq. Les truites arc-en-ciel, d'un poids initial moyen de 120g (disparité < 15%), ont été réparties par groupe de 100 dans les bacs d'élevage. Les poissons ont été maintenus sous photopériode naturelle, dans des bassins circulaires de 1m³ (environ 300 L d'eau). Chacun des quatre aliments expérimentaux a été attribué au hasard à trois bacs (expérience réalisée en triplicat), Les truites ont été nourries manuellement deux fois par jour, 6 jours sur 7, jusqu'à satiété visuelle pendant 12 semaines (durée permettant de tripler le poids initial, indispensable pour analyser les paramètres zootechniques).

III.1. Aliments expérimentaux

Quatre régimes expérimentaux ont été préparés à la pisciculture de l'INRA de Donzacq (Tableau 7). Ces aliments, désignés par les pourcentages de protéines et d'huiles d'origine végétale incorporées, ont été formulés pour être isoprotéiques, isolipidiques et isoénergétiques. L'aliment (0/0) contenait

des protéines et des huiles provenant uniquement de farine et d'huile de poisson. L'aliment (50/50) correspondait au remplacement de 50% des protéines par un mélange de protéines d'origine végétale et à la substitution de 50% de l'huile de poisson par un mélange d'huiles végétales. L'aliment (50/100) était comparable à l'aliment (50/50) en ce qui concerne les protéines, mais contenait uniquement des huiles d'origines végétales. Enfin, l'aliment (100/100) correspondait au remplacement total des protéines et huiles de poisson par des protéines et huiles d'origine végétale.

III.2. Détermination analytique de la composition des aliments

III.2.1. Détermination de la matière sèche

Le pourcentage d'eau contenue dans les échantillons est mesuré par différence de masse de la prise d'essai (environ 1 g d'échantillon) avant et après dessiccation durant 24 h dans une étuve à 105 °C.

% de matière sèche (MS) = [masse de l'échantillon sec (g)] / [masse de l'échantillon initial (g)] x 100]

III.2.2. Détermination de l'énergie brute

L'énergie brute est mesurée à l'aide d'un calorimètre adiabatique (IKA C4000) à partir de la quantité de chaleur dégagée par la combustion d'un échantillon de masse connue (prise d'essai d'environ 300 mg), sous pression d'oxygène de 25 atmosphères. Les résultats sont exprimés par rapport au taux de matière sèche.

Energie brute (kJ/g) = $[(\Delta T \times C) - Q] \times 100$ / [masse de l'échantillon encapsulé (g) x MS]

ΔT : augmentation de la température qui se produit pendant la combustion

C : capacité de la bombe (quantité de chaleur nécessaire pour élever la température de la bombe de 1°C, déterminée à partir d'un témoin, l'acide benzoïque, dont on connaît la chaleur de combustion)

Q : quantité de chaleur dégagée par le fils de nickel et de coton servant à l'ignition (0,076 kJ)

III.2.3. Détermination des lipides totaux

La méthode d'analyse du taux de lipides totaux est basée sur la capacité de solubilisation dans les solvants organiques par la méthode de Soxhlet. Le dosage est réalisé à l'aide de l'appareil semi-

Tableau 8 : Composition théorique en acides aminés essentiels des quatre régimes.

	Concentration (% de l'aliment)			
	0/0	50/50	50/100	100/100
ARG	2,49	2,07	2,07	1,68
HIS	1,03	0,97	0,97	0,84
ILE	1,86	1,80	1,80	1,60
LEU	3,14	4,18	4,18	3,90
LYS	3,21	2,02	2,02	1,97
SAA	1,59	1,66	1,66	1,42
AROM	3,01	3,64	3,64	3,65
THR	1,79	1,59	1,59	1,24
TRP	0,45	0,37	0,37	0,32
VAL	2,21	2,09	2,09	1,81

SAA, acides aminés soufrés ; AROM, acides aminés aromatiques

automatique Soxtec II. L'extraction des lipides (prise d'essai d'environ 2 g) a été effectuée à chaud (155 °C) par l'éther de pétrole. Le solvant est éliminé par évaporation, le résidu séché dans une étuve à 105 °C pendant 1 h. La masse de lipides totaux est déterminée par pesée après évaporation de la totalité du solvant. Les résultats sont exprimés par rapport au taux de matière sèche.

$$\text{Lipides (\% MS)} = [\text{masse des lipides (g)} \times 100] / [\text{masse de l'échantillon (g)} \times \text{MS}]$$

III.2.4. Détermination du taux d'amidon

Le taux d'amidon est déterminé par la méthode enzymatique gluco-amylase/glucose oxydase de Thivend et al. (1972). L'échantillon subit un traitement hydrothermique qui détruit la structure des grains d'amidon : l'empesage de l'amidon est réalisé par une ébullition de 3 min suivie d'un autoclavage d'1 h à 135 °C. L'amidon est hydrolysé durant 2 h à 60 °C par la gluco-amylase, dans une solution de tampon acétique. Il est impératif que la température ne descende pas en dessous de 60 °C durant toutes ces opérations. Les solutions sont filtrées pendant 12 h. L'analyseur automatique Beckmann (mesure du taux de glucose par la glucose oxydase) permet de déterminer les taux de glucose des hydrolysats. Une solution d'amidon de concentration connue, ayant subi le même traitement que les échantillons, permet de contrôler la validité de l'hydrolyse.

$$\% \text{ glucose} = [(\text{Concentration mesurée} \times \text{volume d'hydrolysat (L)}) / (\text{masse d'échantillon initial (g)})] \times 100$$

Une correction est alors effectuée pour évaluer la concentration d'amidon (estimation du taux d'amidon : 90 % du taux de glucose) et les résultats sont exprimés par rapport à la matière sèche.

III.2.5. Détermination des protéines brutes

Le taux de protéines brutes est déterminé par la méthode de Kjeldhal pour le dosage de l'azote total à l'aide d'un appareil Kjeltec Auto Analyser 1030. L'échantillon est minéralisé à chaud (440 °C) par de l'acide sulfurique concentré (H_2SO_4) en présence d'un catalyseur (mélange de sulfate de potassium (K_2SO_4) et de sélénium (Se)). L'azote produit est fixé par de l'acide sous forme de sulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Puis, par addition d'une solution de soude, l'ammoniac est libéré et recueilli dans une solution d'acide borique (H_3BO_3) et titré par une solution d'acide sulfurique de concentration connue (0,125 N). Le taux de protéines ($\text{N} \times 6,25$) est directement indiqué par le Kjeltec, dans lequel est entrée la masse de l'échantillon. Les résultats sont alors exprimés par rapport au taux de matière sèche. La composition théorique en acides aminés essentiels des différents régimes est présentée dans le tableau 8.

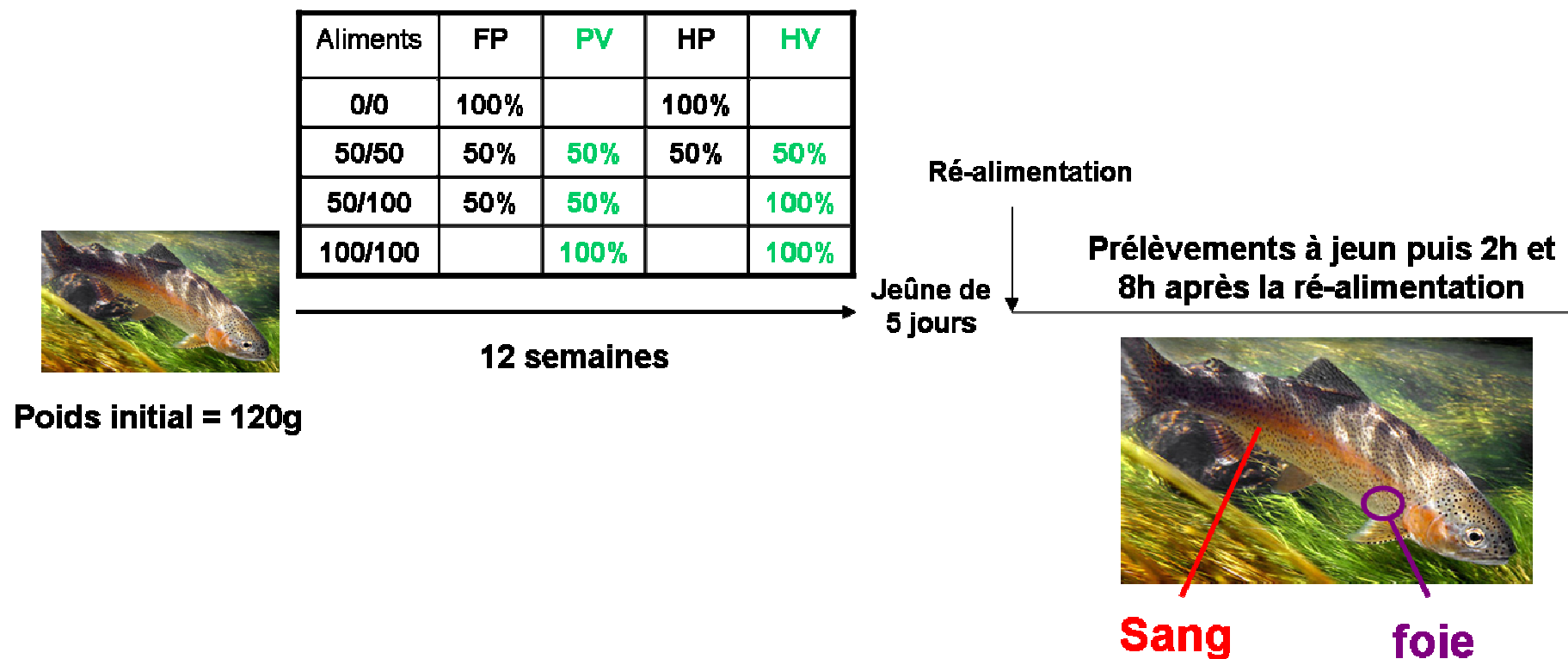


Figure 22 : Schéma représentatif de l'expérimentation *in vivo*.

FP : farine de poisson ; PV : protéines végétales ; HP : huile de poisson ; HV : huiles végétales

III.3. Paramètres zootechniques

La biomasse (BM) et la quantité d'aliment distribuée ont été mesurées toutes les 3 semaines. Les critères zootechniques suivants ont été calculés à la fin de l'expérimentation en tenant compte de l'évolution du nombre de poissons par bac.

- ◆ Poids moyen initial (g) = BM initiale du bassin (g) / Nombre de poissons
- ◆ Poids moyen final (g) = BM finale du bassin (g) / Nombre de poissons
- ◆ Taux de croissance journalier (%) = $[(\text{Poids moyen final}^{1/3} - \text{poids moyen initial}^{1/3}) / \text{Nombre de jours}] \times 100$
- ◆ Efficacité alimentaire = Gain de poids frais / Quantité d'aliment sec ingéré
- ◆ Ingéré = (Quantité d'aliment ingéré / poisson) / Nombre de jours

III.4. Prélèvement des échantillons

A l'issue des 12 semaines d'élevage, les poissons ont été laissés à jeun pendant 5 jours avant le prélèvement afin de revenir à des niveaux basaux de paramètres plasmatiques. Cette période de jeûne visait également à homogénéiser les réponses métaboliques des poissons d'un même groupe. Le jour des prélèvements, les poissons ont été réalimentés une seule fois jusqu'à satiété visuelle avec l'aliment qui leur avait été attribué. Ils ont ensuite été sacrifiés soit 2h après le dernier repas pour les études de signalisation cellulaire soit 8h après le dernier repas pour les études d'expression de gènes. Les prélèvements ont été effectués sur 6 poissons par régime soit 2 poissons par bac. Au moment du prélèvement, chaque poisson a été préalablement euthanasié par un coup franc sur les cervicales puis pesé. Une prise de sang a été effectuée au niveau de la veine caudale à l'aide d'une seringue contenant un mélange d'oxalate de potassium et de fluorure de sodium à 4 % pour éviter la coagulation du sang. Le plasma a été collecté après centrifugation à 3500 g pendant 10 min, aliquoté et conservé à -20 °C jusqu'aux analyses. Le foie a été prélevé, immédiatement plongé dans l'azote liquide puis conservé à -80 °C jusqu'aux extractions de protéines et d'ARN. Par ailleurs, 6 poissons à jeun par régime soit 2 poissons par bac ont été sacrifiés avant la réalimentation pour servir de contrôle. La figure 22 est une représentation schématique de cette expérimentation.

III.5. Détermination de la concentration en métabolites plasmatiques

Les concentrations en métabolites plasmatiques ont été mesurées par des méthodes colorimétriques (lecture spectrophotométrique) réalisées à l'aide de kits enzymatiques commerciaux : glucose RTU kit (Biomérieux, Marcy-l'étoile, France) pour le glucose ; PAP 150 kit pour les triglycérides (Biomérieux, Marcy-l'étoile, France) et Wako NEFA C kit pour les acides gras libres (Wako Chemicals, Neuss, Germany).

IV. Analyse de l'expression différentielle des gènes par qRT-PCR

IV.1. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits des hépatocytes (études *in vitro*) et des foies (étude *in vivo*) à l'aide d'une solution de Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). L'intégrité des ARN totaux extraits a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% via l'observation des bandes correspondant aux ARNr 18S et 28S, qui représentent la grande majorité des ARN totaux. Le dosage de la concentration en ARN totaux a été effectué par spectrophotométrie en mesurant la densité optique (DO) à 260 nm de chaque solution d'ARN (1 unité de DO correspond à une concentration d'ARN de 40 µg.ml⁻¹).

Le rapport DO₂₆₀/DO₂₈₀ permet d'estimer la contamination par les protéines des solutions d'ARN (pureté acceptable lorsque ce rapport est compris entre 1,6 et 2). Les extraits sont ensuite aliquotés et conservés à -80°C.

IV.2. RT-PCR quantitative en temps réel

La RT-PCR (Reverse Transcription – Polymerase chain Reaction) quantitative en temps réel est une technique de biologie moléculaire permettant d'amplifier une quantité d'ARN après transformation en ADNc pour en mesurer la quantité. La PCR est dite en temps réel lorsque la quantité d'ADNc synthétisée est enregistrée après chaque cycle d'amplification. C'est une méthode précise, sensible et rapide qui permet la quantification relative du taux d'expression d'un gène cible par rapport à celui d'un gène de référence stable.

IV.2.1. Principe

Après une étape de synthèse des ADN complémentaires (ADNc) par transcription inverse (reverse transcription) à partir des ARNm, une partie de la séquence d'un gène d'intérêt est

amplifiée, à partir des ADNc (matrice) en présence d'un couple d'amorces oligonucléotidiques spécifique du gène d'intérêt et d'une ADN polymérase. A ce mélange réactionnel est ajouté un agent intercalant fluorescent (le SYBRGreen), qui ne se lie qu'à l'ADN double brin. Lorsque le SYBERGreen est lié à l'ADN double brin, il émet une fluorescence directement proportionnelle à la quantité d'ADN double brin présent dans le milieu réactionnel. Dans le cadre de la PCR en temps réel, on utilise ce produit pour mesurer la quantité d'ADN double brin produite après chaque cycle d'amplification,. Au cours de la PCR, la quantité d'ADN évolue de façon exponentielle avec un doublement théorique de la quantité d'ADN à chaque cycle. Une réaction de PCR comporte en moyenne 30 à 40 cycles d'amplification. Lors de l'analyse des résultats, un seuil de fluorescence, commun à l'ensemble des échantillons, est fixé dans la partie exponentielle de la courbe (c'est en effet à ce moment que l'efficacité de la réaction est la meilleure et les quantités de réactifs non limitantes).

En déterminant le nombre de cycle PCR (CT, pour Cycle Threshold) nécessaire à chaque échantillon pour atteindre ce seuil de fluorescence, il est alors possible d'estimer la quantité relative d'ADNc du gène d'intérêt initialement présente dans les différents échantillons. Ainsi, plus la valeur de CT est élevée plus la quantité initiale de matrice est faible.

Afin de corriger les éventuelles erreurs de quantités initiales d'ADNc utilisées lors de la PCR, les résultats ont été corrigés par les niveaux d'expression d'un gène domestique ou gène de ménage (gène s'exprimant de la même manière dans toutes les cellules d'un organisme). Aucun consensus n'étant établi concernant le choix de ce gène de référence, nous avons utilisé le gène du facteur d'élongation EF1 α (Olsvik et al. 2005), après avoir vérifié que son expression ne variait pas dans nos différentes conditions.

IV.2.2. Choix et validation des amorces

Le choix des amorces et leur validation ont été réalisés avant mon arrivée au laboratoire, selon les modalités décrites ci-après. Afin d'éviter l'amplification d'ADN génomique, d'autant plus que les extraits n'ont pas été traités à la DNase, les amorces ont été choisies, dans la mesure du possible, sur deux exons différents ou l'une chevauchant deux exons et l'autre se situant sur l'exon suivant. Le choix du couple d'amorces tient compte de la température d'hybridation optimale, qui doit être comprise entre 55°C et 65°C et ne pas différer de plus d'1°C entre les deux amorces.

De plus, elles doivent contenir un minimum de structures secondaires et de séquences répétées pour éviter la dimérisation des amorces qui nuit à l'amplification. Enfin la taille de l'amplicon doit être comprise entre 80 et 200 pb.

Tableau 9 : Séquences des couples d'amorces de PCR utilisées.

Nom	Séquence des amorces	Taille de l'amplicon (pb)	Température d'hybridation (°C)	Id de la séquence Genbank ou Sigenae
6PF1K	: GGTGGAGATGCACAAGGAAT S: CTTGATGTTGTCCCCTCCAT	129	54	tcbk0069c.k.05_s.1
ACLY	: CTGAAGCCCAGACAAGGAAG S: CAGATTGGAGGCCAAGATGT	211	60	CA349411.1
AS	: CTGCACACGGTCTGGAGCTG S: GGATCTCGTCTGGGATCAGGTT	159	59	ay0019b.e.21_3.1.s.om.8
CPT1a	: TCGATTTTCAAGGGTCTTCG S: CACAACGATCAGCAAACCTGG	166	55	AF327058
CPT1b	: CCCTAAGCAAAAAGGGTCTTCA S: CATGATGTCACTCCCGACAG	149	55	AF606076
EF1 α	: TCCTCTTGGTCGTTTCGCTG S: ACCCGAGGGACATCCTGTG	159	59	AF498320
FAS	: TGATCTGAAGGCCCGTGTC S: GGGTGACGTTGCCGTGGTAT	161	60	ab0001c.e.06_5.1.s.om.8
FBPase	: GCTGGACCCTTCCATCGG S: CGACATAACGCCACCATAGG	182	59	AF333188
G6Pase -1	: CTCAGTGGCGACAGAAAGG S: TACACAGCAGCATCCAGAGC	77	55	ay0019b.d.18_3.1.s.om.8 .1-1683
G6Pase -2	: TAGCCATCATGCTGACCAAG S: CAGAAGAACGCCACAGAGT	82	55	AF120150
GK	: TGAAGGATCAGAGGTGGGTGATT S: GAAGGTGAAACCCAGAGGAAGC	253	59	AF135403
mPEPCK	: GTTGGTGCTAAAGGGCACAC S: CCCGTCTTCTGATAAGTCCAA	149	59	AF246149
PK	: CCATCGTCGCGGTAACAAGA S: ACATAGGAAAGGCCAGGGGC	158	59	AF266146
SD	: CCCGTTTTTGGAGAGCATAG S: TTTTGAATGAACCGGATGGT	92	60	ay0007b.b.13_3.1.s.om.8 .
SREBP1	: GACAAGGTGGTCCCAGTTGCT S: CACACGTTAGTCCGCATCAC	71	60	CA048941.1

S = séquence de l'amorce sens ; AS= séquence de l'amorce anti-sens.

Nous avons utilisé un logiciel en ligne (Primer3 : <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3>) pour définir les couples d'amorces satisfaisant ces exigences.

Les couples d'amorces choisis ont été testés par RT-PCR classique suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose 1%. La présence d'un amplicon unique et de taille attendue est une première étape de la validation du couple d'amorces utilisé. Un séquençage de l'amplicon, excisé du gel et purifié sur colonne (Microcon PCR, *Millipore Corporation*, USA) a permis ensuite de valider définitivement la nature de l'amplicon. Les amorces ont ensuite été successivement testées trois fois en PCR en temps réel sur une gamme de dilution (5 points de dilution au 1/2) déposée en triplicat. La gamme est réalisée à partir d'un pool de tous les échantillons et encadre la dilution utilisée pour l'analyse des échantillons. Les valeurs de CT obtenues en triplicat pour chaque point de la gamme au cours des 3 amplifications successives permettent de calculer l'efficacité de la PCR ($E=10^{-1/\text{pente}}$) qui doit être comprise entre 1,90 et 2 et d'estimer la reproductibilité des résultats à travers le calcul des coefficients de variation intra et inter-run des valeurs de CT. Les amorces utilisées au cours ma thèse sont présentées dans le tableau 9.

IV.2.3. Transcription inverse des ARNm en ADNc

Les ADNc ont générés par transcription inverse à partir d'1µg d'ARN totaux (quantifiés spectrophotométriquement) en présence de la transcriptase inverse Superscript™ III Rnase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cette étape de transcription inverse a été effectuée en duplicat pour chaque échantillon.

IV.2.4. PCR quantitative en temps réel

Les analyses de PCR quantitatives en temps réel ont été réalisées grâce au thermo-cycleur iCycler iQ™ (BIORAD, Hercules, CA, USA). Les réactions de PCR ont été effectuées à partir de 10 µL d'ADNc dilué au 1/76^{ème}. A ces 10 µl, 200 mM d'amorces et 12,5 µl de SYBR® Green (kit SYBR® Green PCR Super-Mix, BIORAD) ont été ajoutés. Le volume final de réaction de PCR était de 25 µL. Les échantillons ont été incubés à 95 °C pendant 10 min pour activer l'ampliTaq gold DNA polymérase. Les échantillons ont ensuite été soumis à une succession de 35 cycles de PCR. Chaque cycle de PCR est composé de deux phases :

- une phase de dénaturation de l'ADNc double brin à 95°C, pendant 20 secondes

- une phase d'hybridation des amorces à l'ADN dénaturé et d'élongation du brin d'ADN néosynthétisé, au cours de laquelle les échantillons sont maintenus pendant 20 secondes à une température qui dépend du couple d'amorce utilisé. La quantité de fluorescence émise est enregistrée à la fin de chaque phase d'hybridation/élongation ce qui permet de suivre en temps réel l'amplification de l'ADN cible. Au terme du dernier cycle de PCR, l'ADN double brin a été soumis à un gradient de température croissant de 55 à 94 °C, à raison de 0,5°C par pas de 10 secondes pour obtenir une courbe de fusion. L'observation d'un pic unique permet de s'assurer de l'absence de contamination par amplification d'un amplicon unique. La température de fusion de l'amplicon permet également de s'assurer de la nature de l'amplicon ciblé par la PCR.

IV.2.5. Traitement des données

La quantification relative de l'expression du gène cible par rapport au gène de référence (EF1α) a été réalisée en utilisant le modèle mathématique de Pfaffl (Pfaffl 2001). Cette méthode peut être utilisée même si les efficacités de PCR sont différentes entre le gène cible et le gène de référence (EF1α). Les rapports d'expression relative (R) du gène cible sont calculés sur la base de l'efficacité de la PCR (E) et de la différence de CT (ΔCT) entre l'échantillon et un calibrateur interne, obtenus pour le gène cible et pour le gène de référence (EF1α). Le calibrateur interne que nous avons choisi pour chaque plaque est la moyenne des CT des 6 échantillons de la condition contrôle.

$$R = \frac{[(E_{\text{gène cible}})^{\Delta CT_{\text{gène cible (moyenne contrôle- moyenne échantillon)}}]}{[(E_{\text{EF1}\alpha})^{\Delta CT_{\text{EF1}\alpha (\text{moyenne contrôle- moyenne échantillon})}}]}$$

E : efficacité de PCR ($E = (10^{-1/\text{pente}}) - 1$) déterminée par la courbe standard : CT= f (quantités d'ADNc).

Tableau 10 : Préparation des gels de polyacrylamide.

Composition	Gel de concentration 4%	Gel de résolution 7,5%	Gel de résolution 10%
H2O	1,81ml	4,15ml	3,4ml
Glycérol 50%		0,9	0,9ml
Acrylamide 30%	0,95ml	2,25ml	3ml
Tris-HCl 3M pH 6,6		1,125ml	1,125ml
Tris-HCl 1M pH 8,8	1ml		
SDS 10%	40 μ l	90 μ l	90 μ l
Temed	5 μ l	8 μ l	8 μ l
APS 10%	0,3ml	0,6ml	0,6ml

APS, amonium persulfate ; SDS, sodium dodécylsulfate ; Temed, Tetramethylethylenediamine.

Tableau 11 : Présentation des différents anticorps utilisés en Western blot.

Anticorps	Fournisseur	Référence	Dilution	Taille (kDa)
Phospho-Akt (Ser473)	OZYME	# 9271	1/1000e	60
Akt	OZYME	# 9272	1/1000e	60
Phospho-mTOR (Ser2448)	OZYME	# 2971	1/500e	289
mTOR	OZYME	# 2972	1/500e	289
Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389)	OZYME	# 9205	1/500e	70
p70 S6 Kinase	OZYME	# 9202	1/500e	70
Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (2F9) Rabbit mAb	OZYME	# 4856	1/1000e	32
S6 Ribosomal Protein (5G10) Rabbit mAb	OZYME	# 2217	1/1000e	32
Phospho-FoxO1 (Ser256)	OZYME	# 9461	1/1000e	82
FoxO1A Antibody	ABCAM	ab34406	1/1000e	70

L'anticorps dirigé contre Akt reconnaît les trois formes Akt1, Akt2 et Akt3.

V. Analyse de la phosphorylation des protéines par Western blot

V.1. Extraction des protéines totales

➤ A partir d'hépatocytes

Les lysats cellulaires ont été mis à décongeler lentement sur de la glace afin d'éviter l'altération des protéines et plus particulièrement des groupements phosphorylés.

Une fois décongelé, le tapis cellulaire a été récupéré à l'aide d'un grattoir et placé dans un microtube. Après 30 min d'incubation des cellules dans le tampon de lyse à 4°C, les protéines totales ont été extraites par centrifugation pendant 30 minutes à 12000g et 4°C. Les protéines se retrouvent dans le surnageant alors que le culot contient les mitochondries, peroxyosomes, lysosomes et débris cellulaires. Les concentrations en protéines ont ensuite été déterminées par la méthode de Bradford.

➤ A partir du foie

Environ 300mg de foie ont été broyés à l'aide d'un ultra-turax en présence de 2ml de tampon de lyse. Après 30 min d'incubation dans le tampon de lyse à 4°C, le lysat cellulaire sont centrifugées 15 minutes à 1000g à 4°C, afin d'éliminer les gros débris. Le surnageant est ensuite récupéré et subit une seconde centrifugation de 45 minutes à 45000 rpm à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est récupéré et les concentrations en protéines sont ensuite déterminées par la méthode de Bradford.

V.2. Immunodétection des protéines par Western blot

La séparation des protéines a été réalisée par électrophorèse sur gels de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Les échantillons ont été préparés dans une solution tampon (1,25 mM Tris-HCL pH 6,8, 50% glycerol, 4% SDS, 0,08% bleu de bromophénol 1%, 5% β -mercaptoéthanol), chauffés à 95°C pendant 10 minutes puis plongés immédiatement dans la glace, avant dépôt sur gel d'acrylamide. La concentration en acrylamide du gel ainsi que les conditions d'électrophorèse et de transfert sur membrane de nitrocellulose dépendent des protéines étudiées (tableau 10). Pour toutes les protéines étudiées à l'exception de TOR, la migration par électrophorèse des protéines a été réalisée à 50V dans le gel de concentration puis à 100V dans le gel de résolution (10% d'acrylamide) en présence d'un tampon de migration (25mM tris, 192mM glycine, 0.1% SDS (BIORAD, Hercules, CA, USA)). Le transfert sur membrane de nitrocellulose s'est effectué à 100V pendant 2h dans un tampon

de transfert (25mM tris, 192mM glycine, 20% méthanol (BIORAD, Hercules, CA, USA)). En ce qui concerne la protéine TOR, l'électrophorèse a été réalisée pendant la nuit à 45V dans un gel de résolution contenant 7,5% d'acrylamide et le transfert pendant 4h à 45V. Une fois l'électrophorèse et l'électrotransfert réalisés, la membrane a été placée dans un tampon de blocage sous agitation pendant 1h, afin de saturer les sites non spécifiques de fixation d'anticorps. Les protéines présentes sur la membrane ont ensuite été exposées à un anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt pendant une nuit à 4°C, sous agitation. Les anticorps utilisés (présentés dans le tableau 11) utilisés au cours de ces études réagissent avec succès avec les protéines d'intérêt chez la truite (Seiliez et al. 2008). En effet, les séquences des protéines d'intérêt reconnues par les différents anticorps utilisés, sont en général très conservées entre la truite et les espèces pour lesquelles l'utilisation des anticorps commerciaux est préconisée. La membrane a ensuite été mise à incuber pendant au moins 2h en présence d'un anticorps secondaire dirigé contre les immunoglobulines de l'espèce chez qui a été produit le premier anticorps. Cet anticorps secondaire est couplé à une molécule (IRD680) qui fluoresce dans le domaine de l'infra-rouge. Le signal fluorescent a ensuite été détecté par le système Odyssey Imaging (LICOR Biotechnology Inc., Lincoln, NE, USA), scanner infra-rouge permettant de révéler les bandes protéiques détectées par les complexes antigènes-anticorps.

Au cours de ces études, je me suis intéressée à l'état de phosphorylation de différentes molécules de signalisation cellulaire. Pour cela, un anticorps primaire dirigé contre la forme phosphorylée de la protéine a été utilisé. Après révélation, la membrane était déshybridée à l'aide d'un tampon de déshybridation (SCIENCETEC, les Ulis, France) permettant de séparer l'anticorps des protéines. Puis une nouvelle immunodétection était réalisée avec un anticorps primaire dirigé contre la forme totale (formes phosphorylées et non phosphorylées) de la protéine étudiée. Cette méthode a permis d'évaluer la proportion de protéines phosphorylées (rapport : protéine phosphorylée/protéine totale).

VI. Analyse statistique des données

Les résultats exposés dans ce manuscrit et les trois articles sont présentés sous forme de moyennes $\pm$ écart-type. Différents tests statistiques ont été utilisés suivant le type d'expérimentation et de données obtenues. Au cours de ces études, nous avons donc utilisé le test non paramétrique de Mann et Whitney dans le cas de la comparaison de 2 moyennes. Par ailleurs, nous avons utilisé soit une ANOVA à une voie suivie d'un test de Student-Newman-Keuls, soit le test non paramétrique de Kruskal–Wallis lorsque le nombre de conditions à comparer était supérieur à 2. Pour toutes les analyses statistiques effectuées, le seuil de significativité a été fixé à $p < 0.05$.

RESULTATS

Les résultats issus des travaux réalisés au cours de cette thèse ont donné lieu à trois publications acceptées. Ils seront donc présentés sous forme de trois parties, chacune correspondant à l'objet de ces trois publications.

Publication n°1 :

Integration of insulin and amino acid signals that regulate hepatic metabolism-related gene expression in rainbow trout: role of TOR.

Amino Acids, sous presse

Lansard Marine, Panserat Stéphane, Plagnes-Juan Elisabeth, Seiliez Iban, Skiba-Cassy Sandrine.

Publication n°2:

Effect of single amino acid leucine, methionine and lysine on carbohydrate and lipid metabolism-related gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes.

Journal of Nutrition, sous presse

Lansard Marine, Panserat Stéphane, Plagnes-Juan Elisabeth, Dias Karine, Seiliez Iban, Skiba-Cassy Sandrine

Publication n°3 :

Hepatic protein kinase B (Akt) - target of rapamycin (TOR)-signalling pathways and intermediary metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) are not significantly affected by feeding plant-based diets.

British Journal of Nutrition, 2009; 102: 1564-73,

Lansard Marine, Panserat Stéphane, Seiliez Iban, Polakof Sergio, Plagnes-Juan Elisabeth, Geurden Inge, Médale Françoise, Kaushik Sadasivam, Corraze Geneviève, Skiba-Cassy Sandrine.

I. Effet de l'insuline et des acides aminés sur la signalisation cellulaire et la régulation de l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire dans des hépatocytes de truite arc-en-ciel (Publication n°1)

Lorsque j'ai commencé ma thèse, l'effet de l'insuline sur la régulation de l'expression des gènes du métabolisme était largement décrit (Mounier et al. 2006), alors que peu de données sur l'effet des acides aminés étaient disponibles. En effet, les acides aminés sont considérés non seulement comme les substrats des protéines mais également comme des molécules signales intervenant dans la régulation de l'expression des gènes (Jousse et al. 2004; Kimball et al. 2006a). L'objectif de cette première étude était donc d'analyser l'effet des acides aminés, seuls ou combinés à l'insuline, sur la régulation de l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire et la possible implication de la voie de signalisation TOR dans ces régulations. Pour cela nous avons utilisé des cultures primaires d'hépatocytes de truite que nous avons stimulées avec de l'insuline, des acides aminés ou une combinaison des deux. Par ailleurs, la rapamycine, inhibiteur de la voie TOR, a été utilisée dans le but de déterminer si les effets observés lors d'une stimulation par les acides aminés combinés à de l'insuline étaient dépendants de la voie de signalisation TOR.

Ces travaux ont fait l'objet de la publication suivante :

Integration of insulin and amino acid signals that regulate hepatic metabolism-related gene expression in rainbow trout: role of TOR. Amino Acids, 2010. Lansard Marine, Panserat Stéphane, Plagnes-Juan Elisabeth, Seiliez Iban, Skiba-Cassy Sandrine.

Integration of insulin and amino acid signals that regulate hepatic metabolism-related gene expression in rainbow trout: role of TOR

Marine Lansard · Stéphane Panserat ·
Elisabeth Plagnes-Juan · Iban Seilliez ·
Sandrine Skiba-Cassy

Received: 27 November 2009 / Accepted: 12 February 2010 / Published online: 6 March 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Amino acids are considered to be regulators of metabolism in several species, and increasing importance has been accorded to the role of amino acids as signalling molecules regulating protein synthesis through the activation of the TOR transduction pathway. Using rainbow trout hepatocytes, we examined the ability of amino acids to regulate hepatic metabolism-related gene expression either alone or together with insulin, and the possible involvement of TOR. We demonstrated that amino acids alone regulate expression of several genes, including glucose-6-phosphatase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, pyruvate kinase, 6-phospho-fructo-1-kinase and serine dehydratase, through an unknown molecular pathway that is independent of TOR activation. When insulin and amino acids were added together, a different pattern of regulation was observed that depended upon activation of the TOR pathway. This pattern included a dramatic up-regulation of lipogenic (fatty acid synthase, ATP-citrate lyase and sterol responsive element binding protein 1) and glycolytic (glucokinase, 6-phospho-fructo-1-kinase and pyruvate kinase) genes in a TOR-dependent manner. Regarding gluconeogenesis genes, only glucose-6-phosphatase was inhibited in a TOR-dependent manner by combination of insulin and amino acids and not by amino acids alone. This study is the first to demonstrate an important role of amino acids in combination with insulin in the molecular regulation of hepatic metabolism.

Keywords Amino acids · Insulin · TOR ·
Hepatic gene expression · Metabolism

Introduction

Amino acids are not only important substrates for the synthesis of proteins and other nitrogenous compounds, but also are now widely considered to be key regulators of flux through the control of major metabolic pathways (Jobgen et al. 2006; Meijer 2003). There is increasing evidence that amino acids regulate intracellular signalling pathways. Through an unknown pathway, probably involving Rag GTPase (Sancak et al. 2008), amino acids regulate protein synthesis by activating the target of rapamycin (TOR) nutrient signalling pathway in common with insulin (Avruch et al. 2009; Kimball and Jefferson 2006). In mammals, TOR is part of a molecular complex known as mTOR complex 1 (TORC1) and contains the WD40 repeat-containing subunit raptor (a scaffold for TOR substrates), GBL (or mLST8, a positive effector of TOR) and PRAS40 (a negative effector of TOR). This complex is a nutrient sensor regulated by both insulin (or other growth factors) and amino acids, and is a key regulator of energy homeostasis, cell growth and protein translation through the subsequent activation of p70 ribosomal S6 protein kinase 1 (S6K1) and ribosomal protein S6 (Wullschlegel et al. 2006).

The mechanism leading to activation of TORC1 by insulin is already well known. Insulin acts through a tyrosine kinase membrane receptor. When activated by insulin binding, tyrosine kinase recruits and phosphorylates intracellular substrates known as IRS (insulin receptor substrates). Phosphorylated IRS are further used as docking sites for proteins which then transmit the insulin signal through several molecules, including successively phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) and Akt (also known as protein kinase B), a critical node of the insulin signalling pathway leading to at least the regulation of glucose

M. Lansard · S. Panserat · E. Plagnes-Juan · I. Seilliez ·
S. Skiba-Cassy (✉)
INRA, UMR1067 Nutrition Aquaculture et Génomique,
Pôle d'hydrobiologie, CD918, 64310 St Pée-sur-Nivelle, France
e-mail: skiba@st-pee.inra.fr

transport, glycogen synthesis, mRNA translation and gene expression (Taniguchi et al. 2006). Indeed, Akt regulates intermediary metabolism-related gene expression via phosphorylation and nuclear exclusion of Forkhead-box Class O1 (FoxO1) transcription factor and controls protein synthesis by the inactivation of the tuberous sclerosis complex (TSC), leading to the activation of mTORC1.

Increasing evidence has emerged in recent years to show that amino acids may interfere with insulin function. For example, excessive levels of amino acids have detrimental effects on glucose homeostasis by promoting insulin resistance and increasing gluconeogenesis (Tremblay et al. 2007b), which may be due to the activation of TORC1. Recent findings have also indicated that activation of TORC1 contributes to the regulation of fatty acid biosynthesis (Porstmann et al. 2008). For example, Porstmann et al. demonstrated that Akt-induced nuclear accumulation of mature sterol responsive element binding protein (mSREBP1) and expression of SREBP target genes such as fatty acid synthase (FAS) and ATP-citrate lyase (ACLY) require TORC1 activity. Moreover, they showed that induction of FAS and ACLY gene expression in response to Akt activation was blocked in the presence of rapamycin, indicating that TORC1 is involved in the regulation of SREBP-dependent transcription. This provides an example of the possible involvement of the TOR signalling pathway in the regulation of lipid metabolism-related gene expression.

The main aim of the present study was thus to investigate more widely the specific role of amino acids in the regulation of mRNA levels encoding genes involved in carbohydrate and lipid metabolism, and to evaluate the possible involvement of the TORC1 signalling pathway in such regulation. For this purpose, we chose to work on primary cell cultures of hepatocytes prepared from the livers of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), a carnivorous fish with high dietary protein requirement (1993) compared to mammals. Total protein content of the rainbow trout diet may exceed 45% of the dry matter, and it seems that this high dietary intake of amino acids may have undesirable effects on insulin sensitivity, particularly on insulin-regulated gene expression (Kirchner et al. 2003). Rainbow trout, in fact, exhibit an absence of post-prandial inhibition of glucogenic gene expression [especially glucose-6-phosphatase (G6Pase) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (mPEPCK)] that can be restored by reducing dietary protein levels (Kirchner et al. 2003). We examined insulin and TORC1 signalling and mRNA expression of metabolism-related genes under stimulation by insulin, amino acids and a combination of both. Attention was focused on asparagine synthase (AS), which is responsible for the biosynthesis of asparagine from aspartate and glutamate, and genes related to gluconeogenesis (G6Pase, fructose-1,6-bisphosphatase FBPase and

mPEPCK), glycolysis (glucokinase GK, 6-phospho-fructo-1-kinase 6PF1K and pyruvate kinase PK), lipogenesis (fatty acid synthase FAS, ATP-citrate lyase ACLY) and amino acid degradation (serine dehydratase SD). Transcript accumulation of transcription factor SREBP1 was also evaluated.

Methods

Animals

Sexually immature rainbow trout (350–400 g) were obtained from the INRA experimental fish farm facilities (INRA, Donzacq, France). Fish were maintained in tanks kept in open circuits at 18°C with well-aerated water under natural photoperiod conditions. Trout were fed to satiety every 2 days with a commercial diet (T-3P classic, Trouw, France). All experiments were carried out in accordance with legislation governing the ethical treatment of animals, and investigators were certified by the French Government to carry out animal experiments (authority: Prefecture of Pyrénées Atlantiques, 64000 Pau, for INRA St Pée-sur-Nivelle). Animal experiments were in accordance with national law (Decret No. 2001-464, 29 May 2001) as applicable in INRA according to INRA No. 2002-36, 4 April 2002.

Hepatocyte cell culture

Isolated liver cells were prepared from 3-day fasted rainbow trout. Trout were left unfed for 3 days in order to empty the digestive tract and then facilitate the liver in situ perfusion. At the time of experiments, fish were anaesthetized by placing them in water containing 60 mg l⁻¹ aminobenzoic acid, and hepatocytes were isolated by the in situ perfusion method described by Mommsen et al. (1994). Livers were excised and minced with a razor blade in modified Hanks' medium (136.9 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 0.33 mM Na₂HPO₄, 5 mM NaHCO₃ and 10 mM HEPES) supplemented with 1 mM EGTA. After filtration and centrifugation (120g, 2 min), the resulting cell pellet was resuspended three successive times in modified Hanks' medium [1.5 mM CaCl₂ and 1.5% defatted bovine serum albumin (BSA) (Sigma, St. Louis, MO, USA)]. Cells were finally taken up in modified Hanks' medium supplemented with 1.5 mM CaCl₂, 1% defatted BSA, 3 mM glucose, MEM essential amino acids (1×) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), MEM non-essential amino acids (1×) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and antibiotic antimycotic solution (1×) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Cell viability (>98%) was assessed using the trypan blue exclusion method (0.04% in 0.15 M NaCl) and cells were counted using a haemocytometer. The hepatocyte cell

suspension was plated in a six-well Primaria culture dish (BD, USA) at a density of 3×10^6 cells/well and incubated at 18°C. 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 two-dimensional aggregates, in agreement with earlier reports (Ferraris et al. 2002; Segner 1998). Cell viability and cytotoxicity were monitored throughout culture using CellTiter 96[®] aqueous one solution cell proliferation assay (Promega, Madison, WI, USA) and Cyto Tox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, WI, USA), respectively, according to the manufacturer's recommendations. Osmotic pressures of all cell culture media were verified before experiments and calibrated to 300 mosmol l⁻¹ using a K7400 osmometer (Knauer, Berlin, Germany). For experiments, 48-h cultured hepatocytes were subjected to amino acid deprivation in amino acid-free incubation medium for 2 h. Then, according to each experimental design, cells were incubated in either amino acids-free medium (control), in medium containing 4×10^{-9} M of bovine insulin (Sigma, St. Louis, MO, USA) corresponding to the post-prandial level of insulin irrespective of dietary carbohydrate level (del sol Nova et al. 2004), in medium containing onefold (1×) or fourfold (4×) concentrated amino acids, or in medium containing insulin plus amino acids as specified in the figure legends. In experiments involving rapamycin (specific TOR inhibitor), the inhibitor was added 30 min prior to stimulation with insulin and/or amino acids. At the end of the stimulation period, cells were prepared for western blot analysis or resuspended in TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and stored at -80°C for subsequent mRNA extraction.

Gene expression analysis

Total RNA samples were extracted from hepatocytes using TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. One microgram of the resulting total RNA was reverse transcribed into cDNA using the SuperScript III RNaseH-Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and oligo dT primers (Promega, Charbonnières, France) according to the manufacturers' instructions. Target gene expression levels were determined by quantitative RT-PCR. Primers were designed to overlap an intron if possible (Primer3 software) using known sequences in trout nucleotide databases (Genbank and INRA-Sigenae) as previously described (Plagnes-Juan et al. 2008; Polakof et al. 2009; Skiba-Cassy et al. 2009), except for AS in the liver (forward primer : CTGCACACGGTCTGGAGCTG; reverse primer: GGATCTCGTCTGGGATCAGGTT; tcay 0019b.e.21_3.1.s.om.8). The different PCR products were

initially checked by sequencing to confirm the nature of the amplicon.

qRT-PCR was carried out on an iCycler iQTM real-time PCR detection system (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) using iQTM SYBR[®] Green Supermix. qRT-PCR analyses were focused on several key enzymes of hepatic metabolism (Plagnes-Juan et al. 2008): (a) glucose-6-phosphatase (G6Pase), fructose-1,6-bisphosphatase FBPase and the mitochondrial isoform of phosphoenolpyruvate carboxykinase (mPEPCK) involved in gluconeogenesis, (b) for glycolysis, glucokinase (GK) that catalyses the phosphorylation of glucose, 6-phospho-fructo-1-kinase (6PF1K) that catalyses the transfer of a phosphate group from ATP to fructose-6-phosphate to yield fructose-1,6-bisphosphate, and pyruvate kinase (PK) that catalyses the conversion of phosphoenolpyruvate to pyruvate (Towle et al. 1997), (c) two enzymes involved in fatty acid metabolism, ATP-citrate lyase (ACLY) and fatty acid synthase (FAS), that successively allow the synthesis of fatty acids, primarily palmitate, by catalysing the production of cytosolic acetyl-CoA and oxaloacetate from citrate then promoting the condensation of malonyl-CoA and acetyl-CoA (Smith et al. 2003), (d) serine dehydratase (SD), which catalyses the pyridoxal 50-phosphate-dependent deamination of serine and threonine in the liver to produce pyruvate and 2-oxobutyrate, respectively (Ishikawa et al. 1965), and (e) transcript accumulation of the transcription factor SREBP1.

Elongation factor 1 α (EF1 α) was employed as a non-regulated reference gene, as previously used in rainbow trout. No changes in EF1 α gene expression were observed in our investigations (data not shown). PCR was performed using 10 μ l of the diluted cDNA mixed with 5 pmol of each primer in a final volume of 25 μ l. The PCR protocol was initiated at 95°C for 3 min for initial denaturation of the cDNA and hot-start iTaqTM DNA polymerase activation and continued with a two-step amplification programme (20 s at 95°C followed by 30 s at specific primer hybridisation temperature) repeated 40 times. Melting curves were systematically monitored (temperature gradient at 0.5°C/10 s from 55 to 94°C) at the end of the last amplification cycle to confirm the specificity of the amplification reaction. The different PCR products were initially checked by sequencing to confirm the nature of the amplicon. Each PCR run included replicate samples (duplicate of reverse transcription and PCR amplification, respectively) and negative controls (reverse transcriptase- and RNA-free samples, respectively).

Relative quantification of target gene expression was performed using the mathematical model described by Pfaffl (2001). The relative expression ratio (*R*) of a target gene was calculated on the basis of real-time PCR efficiency (*E*) and the CT deviation (Δ CT) of the unknown sample versus a control sample and expressed in comparison to the EF1 α reference gene. PCR efficiency (*E*) was measured by the

slope of a standard curve using serial dilutions of cDNA. PCR efficiency values ranged between 1.90 and 2.

Protein extraction and Western blotting

Following incubation, cell pellets were washed with 1 ml of phosphate buffered saline. Then 300 μ l of cell lysis buffer [150 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA (pH 7.4), 100 mM sodium fluoride, 4 mM sodium pyrophosphate, 2 mM sodium orthovanadate, 1% Triton X-100, 0.5% NP-40-IGEPAL and a protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland)] was added before being stored the culture dish at -80°C overnight. Then cells were scraped, collected, and lysed on ice for 30 min. Lysates were centrifuged at 12,000g for 30 min at 4°C . The resulting supernatants were aliquoted and stored at -80°C . Protein concentrations were determined using the Bio-Rad protein assay kit (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). Cell lysates (20 μ g of protein) were subjected to SDS-PAGE and Western blotting using the appropriate antibody. All antibodies used were obtained from Cell Signaling Technologies (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France). Anti-phospho Akt (Ser⁴⁷³), anti-carboxyl terminal Akt, anti-phospho-FoxO1 (Ser²⁵⁶), anti-FoxO1, anti-phospho-mTOR (Ser²⁴⁴⁸), anti-mTOR, anti-phospho-S6K1 (Thr³⁸⁹), anti-S6K1, anti-phospho-S6 (Ser^{235/236}) and anti-S6 were purchased from Cell

Signaling Technologies (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France). These antibodies have been shown to cross-react successfully with rainbow trout proteins of interest (Seiliez et al. 2008). After washing, membranes were incubated with an IRDye infrared secondary antibody (LI-COR Inc. Biotechnology, Lincoln, NE, USA). Bands were visualised by Infrared Fluorescence using the Odyssey[®] Imaging System (LI-COR Inc. Biotechnology, Lincoln, NE, USA).

Statistical analysis

The results of gene expression analysis were expressed as mean $\pm$ SD ($n = 6$) and analysed by one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test. For all statistical analyses, the level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Specific and combined effects of insulin and amino acids on Akt-TOR signalling

The effects of insulin and/or amino acids on Akt/TOR signalling pathways were investigated in rainbow trout hepatocytes using western blot analyses. As illustrated in Fig. 1, proteins of the Akt/TOR signalling pathways,

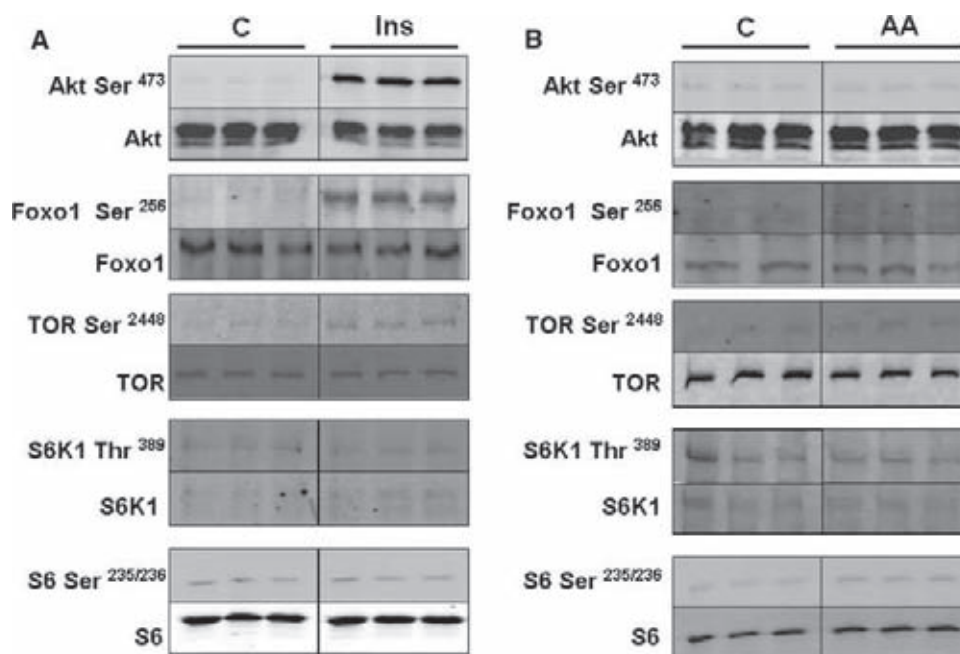


Fig. 1 Specific effect of insulin (a), amino acids (b) on the phosphorylation of Akt, FoxO1, TOR, S6K1 and S6 protein in trout hepatocytes. Cells were subjected to amino acid deprivation for 1 h 30 min and then were preincubated for 30 min with or without 100 nM rapamycin, a TOR inhibitor. The culture medium was then replaced for 15 min with an amino acid-free medium (control C), an

amino acid-free medium containing 4×10^{-9} mol l^{-1} insulin (Ins) or a medium containing $1 \times$ amino acids (AA). The gel was loaded with 20 μ g of total protein per lane. Western blots were performed on six individual samples and similar results were obtained. This figure includes representative blots

including Akt, FoxO1, TOR, S6K1 and the ribosomal protein S6, were identified. The levels of these total proteins were not modified by with insulin or amino acids treatment (Fig. 1). As expected, insulin (4×10^{-9} mol l^{-1}) improved the phosphorylation of Akt (Ser⁴⁷³) and FoxO1 (Ser²⁵⁶), and slightly enhanced the phosphorylation of TOR (Ser²⁴⁴⁸), but had no effect on S6K1 (Thr³⁸⁹) or S6 (Ser^{235/236}) protein phosphorylation (Fig. 1a). On the other hand, we found that amino acids had no effect on the phosphorylation state of any of the proteins tested (Fig. 1b). Figure 2 shows that combined insulin and amino acid stimulation had no further effect on the insulin-induced phosphorylation of Akt (Ser⁴⁷³) or FoxO1 (Ser²⁵⁶) but caused even greater stimulation than insulin alone with regard to TOR phosphorylation, and induced the phosphorylation of S6K1 (Thr³⁸⁹) and S6 (Ser^{235/236}) protein. Finally, as expected, we observed no effect of addition of rapamycin on the phosphorylation of Akt and FoxO1, whereas the activating effect of the combination of insulin and amino acids on TOR (Ser²⁴⁴⁸), S6K1 (Thr³⁸⁹) and S6 (Ser^{235/236}) phosphorylation was totally abolished by the rapamycin treatment (Fig. 2). The phosphorylation of tested proteins was not affected by rapamycin alone (data not shown).

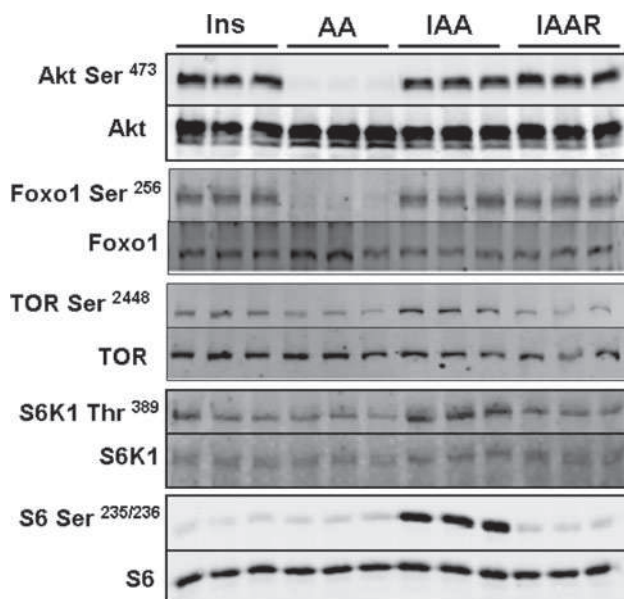


Fig. 2 Combined effects of insulin and amino acids on the phosphorylation of Akt, FoxO1, TOR, S6K1 and S6 protein in trout hepatocytes. Cells were subjected to amino acid deprivation for 1 h 30 min and then were preincubated for 30 min with or without 100 nM rapamycin, a TOR inhibitor. The culture medium was then replaced for 15 min by an amino acid-free medium containing 4×10^{-9} mol l^{-1} insulin (*Ins*), a medium containing $1 \times$ amino acids (*AA*), or a $1 \times$ amino acid medium containing 4×10^{-9} mol l^{-1} insulin (*AAI* and *AAIR*). The gel was loaded with 20 μ g of total protein per lane. Western blots were performed on six individual samples and similar results were obtained. This figure includes representative blots

Specific effects of amino acids on metabolism-related gene expression

In order to test the effects of amino acids on gene expression in rainbow trout hepatocytes, cells were amino acid deprived for 2 h then stimulated for 24 h with a pool of amino acids. The specific effects of amino acids on AS, G6Pase, FBPase, mPEPCK, GK, 6PF1K PK, FAS, ACLY, SREBP1 and SD gene expression are presented in Fig. 3. AS is a marker gene that is known to be induced by amino acid starvation in mammals. As expected, AS was down-regulated after 24 h of stimulation with amino acids in a dose-dependent manner (Fig. 3). Amino acids up-regulated the gene expression of G6Pase, mPEPCK and 6PF1K in dose-dependent manner. PK and SD gene expression was increased by amino acids but only with the $4 \times$ concentration. Expression of the other target genes (FBPase, GK, FAS, ACLY and SREBP1) was not affected by amino acids.

Combined effects of insulin and amino acids on gene expression

In order to investigate the combined effect of amino acids and insulin on gene expression and to determine the potential involvement of the TOR pathway in such regulation, cells were stimulated with insulin, amino acids or a combination of insulin and amino acids in the presence or absence of the TOR inhibitor rapamycin (Fig. 4). To exclude a particular effect of rapamycin on gene expression, cells were also treated with rapamycin alone. We found that rapamycin had no effect on the mRNA levels of FBPase, mPEPCK, GK, 6PF1K, FAS, ACLY, SREBP1 and SD compared to the control situation, but weakly down- and up-regulated G6Pase and PK, respectively. Our results regarding gluconeogenic genes showed that insulin and amino acids had opposite effects on the regulation of G6Pase mRNA levels. Insulin decreased G6Pase gene expression twofold while amino acids increased G6Pase mRNA accumulation fourfold. However, the combination of insulin and amino acids dramatically (sixfold) decreased mRNA levels of G6Pase, compared to amino acids alone and reached level significantly lower than that measured in control cells. This decrease was totally abolished when TOR was inhibited by rapamycin. We found that using insulin and amino acids separately had no significant effect on FBPase mRNA levels, but together increased FBPase gene expression compared to control cells. Addition of rapamycin did not change this effect. Moreover, whereas insulin decreased (about twofold) the expression of mPEPCK, amino acids increased mPEPCK expression about twofold. Combination of insulin and amino acids 1.5-fold increased mPEPCK gene expression but this increase was significantly lower compared to that obtained

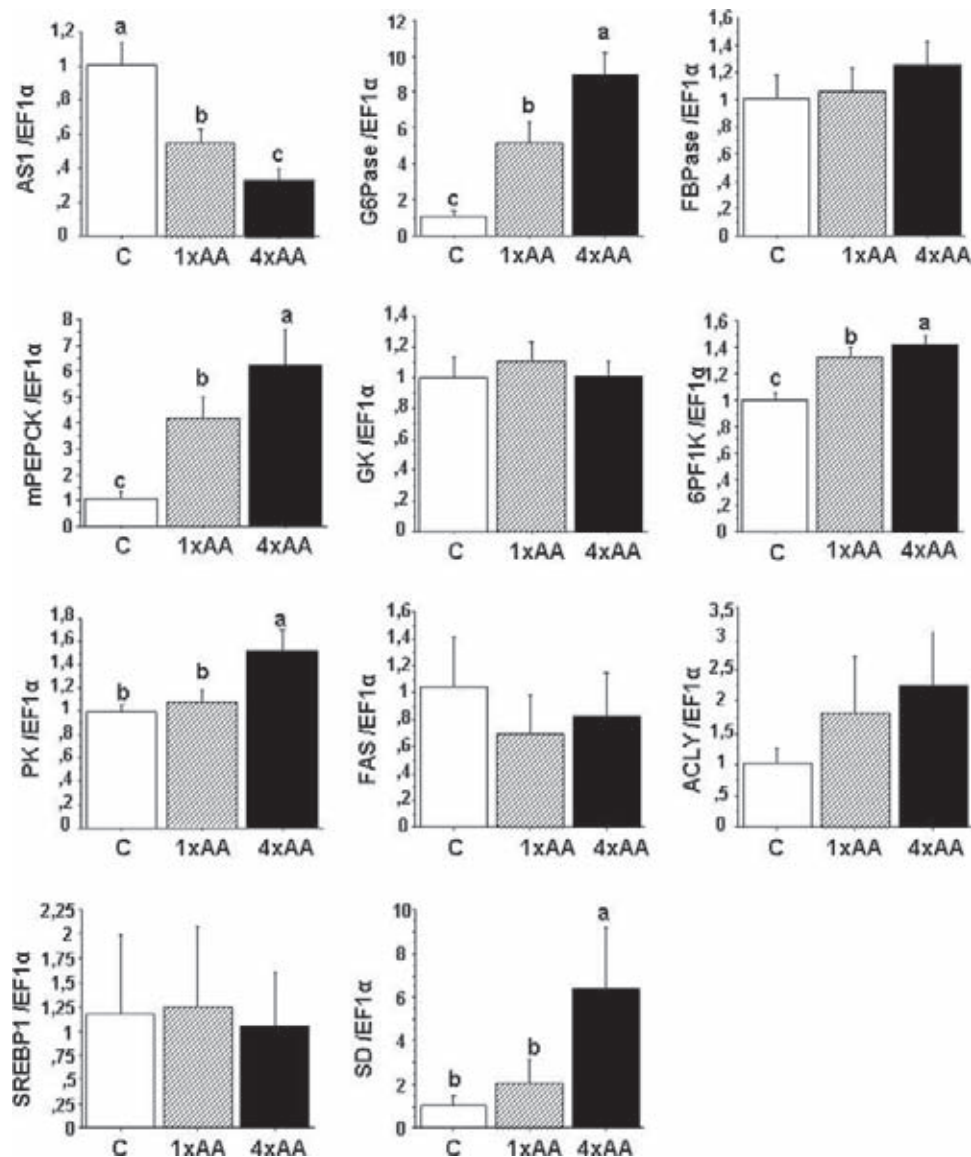


Fig. 3 Dose effect of amino acids on the expression levels of mRNA encoding hepatic genes in 24-h stimulated rainbow trout hepatocytes. Cells were subjected to amino acid deprivation for 2 h. The culture medium was then replaced for 24 h by an amino acid-free medium (control C), or onefold (AA) or fourfold (4×AA) concentrated amino acid medium. Asparagine synthase (AS), glucose 6-phosphatase (G6Pase), fructose 1,6-bisphosphatase (FBPase), mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (mPEPCK), glucokinase (GK), 6-phospho-fructo-1-kinase (6PF1K), pyruvate kinase PK, fatty acid synthase (FAS), ATP-citrate lyase (ACLY), sterol responsive element

binding protein (SREBP1) and serine dehydratase (SD) mRNA levels were estimated using real-time RT-PCR. For each treatment, six replicates were performed. Similar results were obtained from three separate primary hepatocyte cell cultures. Expression values were normalised with elongation factor 1α (EF1α)-expressed transcripts. Results are expressed as mean ± SD ($n = 6$) and were analysed by one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test for multiple comparison ($P < 0.05$). Different letters represent significantly different values

with amino acids alone. Addition of rapamycin also slightly decreased this combined effect on mPEPCK gene expression. Expression of the GK gene was 2.5-fold reduced by insulin but not modulated by amino acids alone. Insulin plus amino acids resulted in significant up-regulation (1.6-fold) of GK gene expression, and this effect was suppressed by addition of rapamycin. Amino acids induced three- and fivefold increase in 6PF1K mRNA levels in the

absence and presence of insulin, respectively, whereas insulin alone was unable to modulate 6PF1K gene expression. This combined effect of insulin and amino acids on 6PF1K was counteracted by rapamycin. Expression of the PK gene was slightly but significantly increased (1.3-fold) by insulin, not modified by amino acids, and increased twofold by the combination of both. Once again, this combined effect was abolished by rapamycin. On the

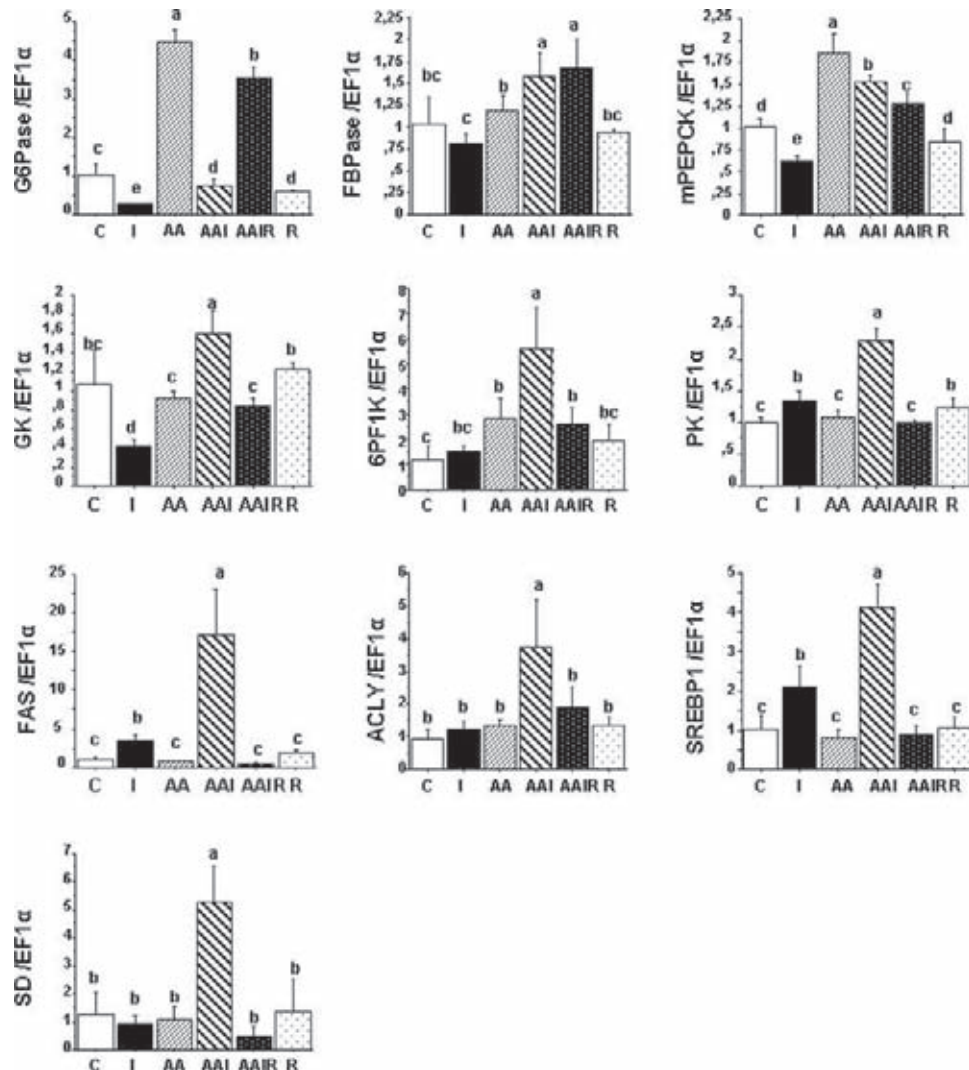


Fig. 4 Combined effects of insulin and amino acids on the expression levels of mRNA encoding hepatic genes in 24-h stimulated rainbow trout hepatocytes. Cells were subjected to amino acid deprivation for 1 h 30 min and then were preincubated for 30 min with or without 100 nM rapamycin, a TOR inhibitor. The culture medium was then replaced for 24 h with an amino acid-free medium (control group C and rapamycin group R), an amino acid-free medium containing 4×10^{-9} mol l^{-1} insulin (Ins), a medium containing $1 \times$ amino acids (AA), or a $1 \times$ amino acid medium containing 4×10^{-9} mol l^{-1} insulin (AAI and AAIR). Glucose 6-phosphatase (G6Pase), fructose 1,6-bisphosphatase (FBPase), phosphoenolpyruvate carboxykinase (mPEPCK), glucokinase (GK), 6-phospho-

fructo-1-kinase (6PF1K), pyruvate kinase PK, fatty acid synthase (FAS), ATP-citrate lyase (ACLY), sterol responsive element binding protein (SREBP1) and serine dehydratase (SD) mRNA levels were estimated using real-time RT-PCR. For each treatment, six replicates were performed. Similar results were obtained from three separate primary hepatocyte cell cultures. Expression values were normalised with elongation factor 1α ($E1\alpha$)-expressed transcripts. Results are expressed as mean $\pm$ SD ($n = 6$) and were analysed by one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test for multiple comparison ($P < 0.05$). Different letters represent significantly different values

other hand, we found that FAS and SREBP-1 gene expression was regulated in the same way: insulin increased the expression of FAS and SREBP-1 (3.5- and 2-fold, respectively) and the insulin stimulatory effect was dramatically enhanced (five- and twofold, respectively) in the presence of amino acids. This increase was totally inhibited in the presence of rapamycin. Finally, mRNA levels of ACLY and SD were not affected by insulin or by amino acids but strongly increased when cells were treated

simultaneously with insulin and amino acids (3.5-fold and 5-fold, respectively). This effect was totally suppressed by addition of rapamycin.

Discussion

There is growing evidence that amino acids have an important role in controlling gene expression (Jousse et al.

2004). Using rainbow trout hepatocytes, the purpose of the study reported here was to establish the role of amino acids in the regulation of hepatic intermediary metabolism-related expression of genes involved in gluconeogenesis, glycolysis, lipogenesis and amino acid catabolism. The aim was also to demonstrate the interaction between amino acids and insulin and the possible involvement of the TOR signalling pathway in such regulation.

Particular effects of amino acids on metabolic gene expression

Our results demonstrate for the first time that amino acids are not only able to regulate the expression of genes involved in the metabolism of amino acids but also affect the expression of a wider range of hepatic metabolism-related genes involved in gluconeogenesis and glycolysis. In fact, we demonstrated that amino acids decreased AS gene expression while they up-regulated mRNA levels of G6Pase, mPEPCK, PK and SD enzymes. To our knowledge, and except for AS (Gong et al. 1991; Guerrini et al. 1993), no findings have been published to date on the effects of amino acids on the regulation of expression of these intermediary metabolism-related genes. Whereas AS gene transcription is known to be controlled by amino acid starvation through the activation of the GCN2 transduction pathway (Barbosa-Tessmann et al. 2000), the molecular pathway involved in the regulation of G6Pase, mPEPCK, PK and SD by addition of amino acids remains to be determined. In our study, cells stimulated with $1\times\text{AA}$, which corresponded to the concentration of amino acids of a standard cell culture medium, had enough amino acids to permit proteosynthesis (Mommsen et al. 1994; Plagnes-Juan et al. 2008) compared cells deprived of amino acids. The dose-dependent action of amino acids ($1\times\text{AA}$ vs. $4\times\text{AA}$) thus suggested that the control of G6Pase, mPEPCK, PK and SD mRNA levels by amino acids was not linked to altered protein synthesis. Some amino acids are known to induce cell swelling because of increased intracellular osmolarity following Na^+ -dependent, concentrative, amino acid transport across the plasma membrane (Meijer 2003). It is also well known that cell swelling leads to phosphorylation of the ribosomal protein S6 (Meijer 2003) and decreased levels of gluconeogenic rate-limiting enzymes (Goswami et al. 2004). Since opposite effects were observed in the present study (i.e. absence of phosphorylation of S6 with amino acids alone and increased expression of gluconeogenic genes), we can exclude the involvement of amino acid-induced cell swelling in the regulation of gene expression. We therefore concluded that amino acids have specific effects on the mRNA levels of G6Pase, mPEPCK, PK and SD. These effects seem to be independent of the activation of the TOR

pathway since our results clearly indicated that amino acids were unable to induce the phosphorylation of TOR, S6K1 and S6 without insulin. Further investigations will be necessary to elucidate the molecular mechanism distinct from the TOR pathway mediating the particular effects of amino acids on such intermediary metabolism-related genes expression.

Combined effects of amino acids and insulin on metabolic gene expression

Recent findings have suggested that the PI3K-Akt-TOR pathway regulates lipid biosynthesis in an orchestrated manner. Indeed, Porstmann et al. (2008) demonstrated that mTORC1 positively regulates SREBP1, a transcription factor that controls the expression of genes encoding proteins involved in lipid metabolism (ACLY and FAS). In this context, our aim was to elucidate how hepatocytes integrate signals generated by insulin and amino acids to regulate not only lipogenic genes but also genes related to other types of metabolism and the role played by the TOR signalling pathway in these interactions between insulin and amino acids. For this purpose, we stimulated primary cell cultures of hepatocytes with a combination of insulin and amino acids in order to fully activate the TOR pathway. To distinguish the involvement of the TOR pathway, rapamycin was used to inhibit TOR activation. As previously demonstrated in mammals (Porstmann et al. 2008), we confirmed in this cellular model that the stimulation of FAS, ACLY and SREBP1 gene expression was associated with the activation of TOR, since rapamycin abolished the combined stimulatory effect of insulin and amino acids. Similar regulation was also observed for SD. SD catalyses the pyridoxal phosphate (PLP)-dependent deamination of serine to produce pyruvate. In mammals, SD is involved in the regulation of liver gluconeogenesis from serine in different dietary, hormonal and developmental states by providing pyruvate (Snell 1984). In rainbow trout hepatocytes, pyruvate originating from SD activity might instead be directed to lipid synthesis and contribute to enhanced lipogenesis, as previously proposed for a line of rainbow trout genetically selected for high muscle fat content (Skiba-Cassy et al. 2009). We thus confirmed in this study using a different model from mammals that lipogenesis is probably under the control of the TOR pathway in fish.

The lipogenic metabolism was not the only type of metabolism subjected to combined insulin and amino acid regulation. Compared to amino acid-treated cells, expression of GK, 6PF1K and PK was also up-regulated by insulin combined with amino acids. Insulin is considered to be a positive regulator of glycolysis. PK gene transcription in mammals is induced by insulin-stimulated glucose metabolism (Alam and Saggerson 1998; Towle 2005). We

demonstrated here that the ability of insulin to stimulate glycolytic gene expression was enhanced in the presence of amino acids. In excessive nutrient situations in mammals, amino acids are able to trigger negative feedback on the early events of the insulin signalling pathway and generate insulin resistance (Tremblay et al. 2007a; Tremblay and Marette 2001). In our study, where hepatocytes were not placed in excessive nutrient conditions, the positive combined effects of insulin and amino acids on the expression of several genes and the persistence of insulin-induced Akt and FoxO1 phosphorylation in cells stimulated by both insulin and amino acids (compared to insulin alone) suggested that in our conditions amino acids did not impair the insulin signalling pathways. In fact, it was quite the reverse, since rapamycin inhibited TOR activation and totally abolished the molecular effects of the insulin/amino acids combination on GK, 6PF1K and PK mRNA levels. We therefore hypothesize that insulin and amino acids both contribute to the regulation of glycolysis through activation of the TOR pathway.

In mammals, as in fish, gluconeogenic genes are mainly under insulin control (Barthel and Schmoll 2003; Plagnes-Juan et al. 2008). Insulin inhibits expression of mPEPCK and G6Pase enzymes at the transcription level through the activation of Akt (Liao et al. 1998; Schmoll 2000). We demonstrated here for the first time that amino acids may also contribute to the regulation of gluconeogenesis by activating the TOR signalling pathway in concert with insulin. In fact, insulin inhibited G6Pase gene expression in both the presence and absence of amino acids, but such inhibition was completely abolished by rapamycin only in the presence of amino acids. This suggests that insulin regulates G6Pase gene expression by activating several pathways, including at least the Akt-FoxO1 pathway and the TOR pathway, together with amino acids. Such regulation did not apply to all enzymes of gluconeogenesis. For example, rather than a decrease, FBPase was subjected to an increase in gene expression under stimulation with insulin and amino acids compared to untreated cells, insulin alone, and amino acid-treated cells. Nevertheless, such regulation that is totally independent of the activation of TOR is in agreement with previous studies in our laboratory showing a stimulatory effect of insulin on FBPase gene expression in rainbow trout hepatocytes (Plagnes-Juan et al. 2008). The pattern of regulation was again different for mPEPCK, with a dramatic up-regulation of mPEPCK mRNA levels under amino acid conditions. In agreement with previous published findings in mammals and fish (Barthel and Schmoll 2003; Plagnes-Juan et al. 2008), insulin resulted in a weak but significant decrease in mPEPCK mRNA levels in the presence or absence of amino acids. Surprisingly, blocking the TOR pathway slightly strengthened the inhibitory action of insulin,

suggesting that the TOR pathway may be involved in molecular mechanisms regulating PEPCK gene expression.

In conclusion, this study demonstrated that hepatic metabolism is regulated by a combination of several hormonal-nutrient pathways, and showed the essential role of amino acids in the regulation of hepatic metabolism-related gene expression. The ways by which amino acids regulate gene expression are still not fully understood but may at least include the TOR pathway, the activation of which clearly required simultaneous induction by insulin.

Acknowledgments We thank M. Larquier and L. Gruyère for technical assistance, and F. Terrier, Y. Hontang and F. Sandres for fish rearing in the INRA experimental farm (Donzacq, France). This study was supported by the European Union 6th Framework project (Contract No. 016249-2, Sustainable aquafeeds to maximise the health benefits of farmed fish for consumers—AQUAMAX), French national research agency (ANR-08-JCJC-0025, Low utilisation of dietary carbohydrates in carnivorous rainbow trout: role of amino acids, glucose and insulin interactions?) and the Aquitaine Region (No. CRRDT-20051303004AB). The AQUAMAX European project (Contract No. 016249-2) also provided M.L. with a fellowship.

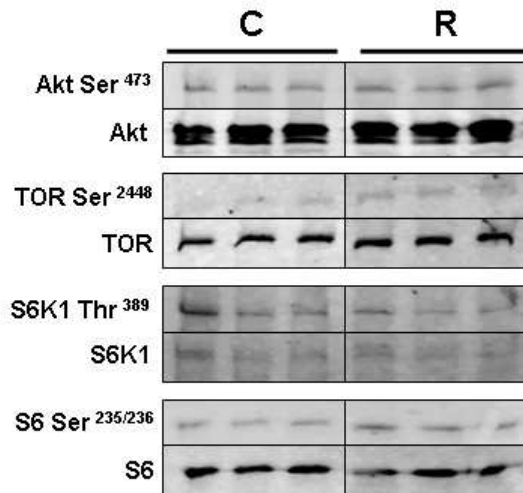
Conflict of interest statement None.

References

- Alam N, Saggerson ED (1998) Malonyl-CoA and the regulation of fatty acid oxidation in soleus muscle. *Biochem J* 334:233–241
- Avruch J, Long X, Ortiz-Vega S, Rapley J, Papageorgiou A, Dai N (2009) Amino acid regulation of TOR complex 1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E592–E602
- Barbosa-Tessmann IP, Chen C, Zhong C, Siu F, Schuster SM, Nick HS, Kilberg MS (2000) Activation of the human asparagine synthetase gene by the amino acid response and the endoplasmic reticulum stress response pathways occurs by common genomic elements. *J Biol Chem* 275:26976–26985
- Barthel A, Schmoll D (2003) Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol* 285:E685–E692
- Committee on Animal Nutrition, Board of Agriculture, National Research Council (1993) Nutrient requirements of fish. National Academy Press, Washington, DC
- del sol Novoa M, Capilla E, Rojas P, Baro J, Gutierrez J, Navarro I (2004) Glucagon and insulin response to dietary carbohydrate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol* 139:48–54
- Ferraris M, Radice S, Catalani P, Francolini M, Marabini L, Chiesara E (2002) Early oxidative damage in primary cultured trout hepatocytes: a time course study. *Aquat Toxicol* 59:283–296
- Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. *Mol Cell Biol* 11:6059–6066
- Goswami C, Datta S, Biswas K, Saha N (2004) Cell volume changes affect gluconeogenesis in the perfused liver of the catfish *Clarias batrachus*. *J Biosci* 29:337–347
- Guerrini L, Gong SS, Mangasarian K, Basilico C (1993) *Cis*- and *trans*-acting elements involved in amino acid regulation of asparagine synthetase gene expression. *Mol Cell Biol* 13:3202–3212
- Ishikawa E, Ninagawa T, Suda M (1965) Hormonal and dietary control of serine dehydratase in rat liver. *J Biochem* 57:506–513

- Jobgen WS, Fried SK, Fu WJ, Meininger CJ, Wu G (2006) Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *J Nutr Biochem* 17:571–588
- Jousse C, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Mordier S, Fafournoux P (2004) Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun* 313:447–452
- Kimball SR, Jefferson LS (2006) Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *J Nutr* 136:227S–231S
- Kirchner S, Kaushik S, Panserat S (2003) Low protein intake is associated with reduced hepatic gluconeogenic enzyme expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Nutr* 133:2561–2564
- Liao J, Barthel A, Nakatani K, Roth RA (1998) Activation of protein kinase B/Akt is sufficient to repress the glucocorticoid and cAMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *J Biol Chem* 273:27320–27324
- Meijer AJ (2003) Amino acids as regulators and components of nonproteinogenic pathways. *J Nutr* 133:2057S–2062S
- Mommsen TP, Moon TW, Walsh TJ (1994) Hepatocytes: isolation, maintenance and utilization. In: Hochachka PW, Mommsen TP (eds) *Biochemistry and molecular biology of fishes*. Elsevier Science B.V., Amsterdam
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:E45
- Plagnes-Juan E, Lansard M, Seiliez I, Medale F, Corraze G, Kaushik S, Panserat S, Skiba-Cassy S (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
- Polakof S, Skiba-Cassy S, Panserat S (2009) Glucose homeostasis is impaired by a paradoxical interaction between metformin and insulin in carnivorous rainbow trout. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297:R1769–R1776
- Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leever S, Griffiths JR, Chung YL, Schulze A (2008) SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab* 8:224–236
- Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, Sabatini DM (2008) The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320:1496–1501
- Schmoll D (2000) Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase B[alpha] and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. *J Biol Chem* 275:36324–36333
- Segner H (1998) Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. *Comp Biochem Physiol A* 120:71–81
- Seiliez I, Gabillard JC, Skiba-Cassy S, Garcia-Serrana D, Gutierrez J, Kaushik S, Panserat S, Tesseraud S (2008) An in vivo and in vitro assessment of TOR signaling cascade in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295:329–335
- Skiba-Cassy S, Lansard M, Panserat S, Medale F (2009) Rainbow trout genetically selected for greater muscle fat content display increased activation of liver TOR signaling and lipogenic gene expression 10.1152/ajpregu.00312.2009. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297:R1421–R1429
- Smith S, Witkowski A, Joshi AK (2003) Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Prog Lipid Res* 42:289–317
- Snell K (1984) Enzymes of serine metabolism in normal, developing and neoplastic rat tissues. *Adv Enzyme Regul* 22:325–400
- Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR (2006) Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:85–96
- Towle HC (2005) Glucose as a regulator of eukaryotic gene transcription. *Trends Endocrinol Metab* 16:489–494
- Towle HC, Kaytor EN, Shih H (1997) Regulation of the expression of lipogenic enzyme genes by carbohydrate. *Annu Rev Nutr* 17:405–433
- Tremblay F, Marette A (2001) Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway. A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 276:38052–38060
- Tremblay F, Brule S, Hee Um S, Li Y, Masuda K, Roden M, Sun XJ, Krebs M, Polakiewicz RD, Thomas G, Marette A (2007a) Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:14056–14061
- Tremblay F, Lavigne C, Jacques H, Marette A (2007b) Role of dietary proteins and amino acids in the pathogenesis of insulin resistance. *Annu Rev Nutr* 27
- Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124:471–484

A



B

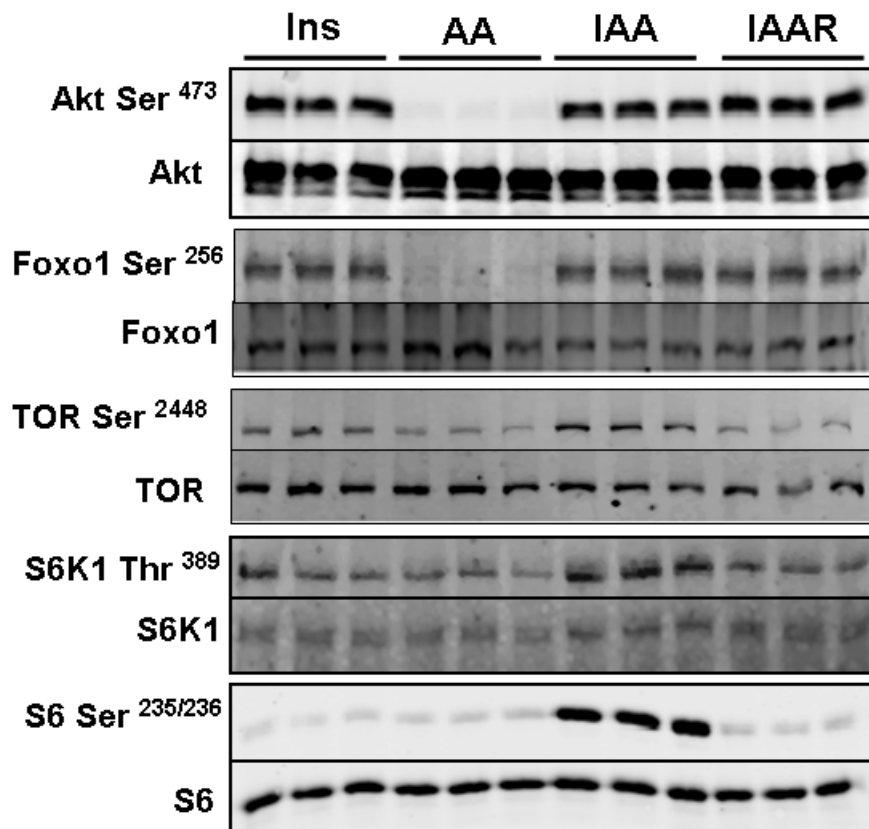


Figure 23 : A) Effet de la rapamycine (R) sur la phosphorylation des protéines Akt, TOR, S6K1 et S6 (résultats complémentaires) ; B) Effet de l'insuline (I), d'un mélange d'acides aminés (AA), et de leur combinaison (AAI) en présence ou absence de rapamycine sur la phosphorylation des protéines Akt, FoxO1, TOR, S6K1 et S6.

Pour plus de précision se reporter à la Figure 2 de l'article 1.

PRINCIPAUX RESULTATS ET CONCLUSIONS

Effets spécifiques et combinés de l'insuline et des acides aminés sur les voies de signalisation Akt/TOR

Ce travail a permis, entre autre, de caractériser pour la première fois *in vitro* les principaux acteurs des voies de signalisation insuline/acides aminés que sont les protéines Akt, FoxO1, TOR, S6K1 et S6 dans des hépatocytes de truite. Leur état de phosphorylation est régulé en fonction de la présence d'insuline et/ou d'acides aminés dans le milieu de culture alors que le taux de chacune de ces protéines totales n'était pas modifié par de tels traitements.

L'insuline augmente la phosphorylation des protéines Akt (Ser473) et FoxO1 (Ser256) dans les hépatocytes de truite, correspondant à ce qui est décrit chez les mammifères (Balbis et al. 2000; Taniguchi et al. 2006). Elle induit également une faible phosphorylation de TOR (Ser2448) mais n'a aucun effet sur la phosphorylation des protéines S6K1 (Thr389) et S6 (Ser 235/236). En revanche, aucun effet des acides aminés sur l'état de phosphorylation des protéines précédemment citées n'a pu être mis en évidence. Ces résultats suggèrent donc l'incapacité des acides aminés à induire la voie de signalisation Akt-TOR en l'absence de tout autre facteur dans notre modèle cellulaire. D'autre part, l'association des acides aminés avec l'insuline ne modifie pas l'effet induit par l'insuline seule sur la phosphorylation d'Akt et de FoxO1. En revanche, cette combinaison augmente la phosphorylation de TOR (Ser2448) et induit celle de S6K1 (Thr389) et S6 (Ser 235/236).

Afin de vérifier que la phosphorylation des protéines S6K1 et S6 dépendait effectivement de l'activation de TOR comme chez les mammifères, les hépatocytes ont été soumis à un prétraitement à la rapamycine afin de prévenir toute activation des protéines TOR. La rapamycine seule n'a eu aucun effet sur la phosphorylation des protéines cibles (Figure 23A). En présence d'insuline et d'acides aminés, la rapamycine, n'a en aucune façon modifié la phosphorylation d'Akt et FoxO1 mais a inhibé celle des protéines TOR (Ser2448), S6K1 (Thr389) et S6 (Ser 235/236) induite par le traitement alliant insuline et acides aminés (Figure 23B).

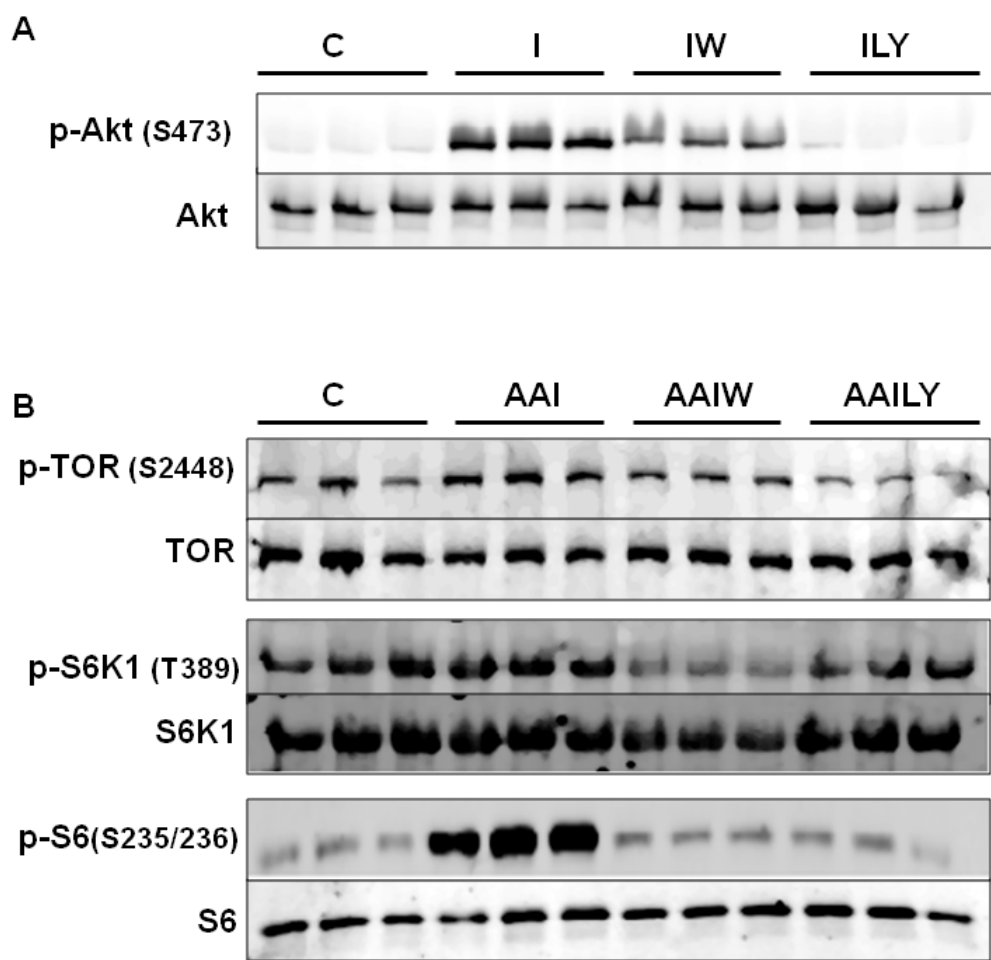


Figure 24 : Résultats complémentaires : Effet de la wortmanine et du LY294004 sur A) la phosphorylation d'Akt induite par l'insuline et B) la phosphorylation de TOR, S6K1 et S6 induite par la combinaison acides aminés / insuline.

Les cellules ont été placées dans un milieu sans acides aminés pendant 1h puis incubées avec ou sans wortmanine (W) ou LY 294004 (LY) pendant 1h. Le milieu de culture a ensuite été remplacé pendant 15 minutes par un milieu dépourvu d'acides aminés (C), un milieu dépourvu d'acides aminés contenant de 4.10^{-9} M d'insuline (I), un milieu contenant un mélange d'acides aminés à la concentration 1X et de l'insuline (AAI), en présence ou absence de wortmanine ou de LY294004.

Par ailleurs, afin de démontrer que chez la truite, comme chez les mammifères, l'activation de protéines Akt et de TOR était dépendante de la PI3K (Taniguchi et al. 2006), nous avons utilisé deux inhibiteurs des PI3K : la wortmanine et le LY294004 (Figure 24). Les analyses de Western blot démontrent que la wortmanine et le LY294004 respectivement diminuent et suppriment la phosphorylation d'Akt (Ser473) induite par l'insuline. En présence d'acides aminés et d'insuline, la wortmanine et le LY294004 diminuent également la phosphorylation de TOR (Ser2448), S6K1(Thr389) et S6 (Ser235/236). Ces résultats mettent donc en évidence le rôle de la voie Akt/PI3K dans l'activation de la voie TOR. Ces derniers résultats sont des données complémentaires ne figurant pas dans l'article n°1.

- **Ainsi dans les hépatocytes de truite, alors que l'insuline est nécessaire et suffisante pour induire l'activation de la voie Akt/FoxO1 de façon dépendante des PI3K, l'activation de la voie TOR/S6K1/S6 nécessite impérativement la présence conjointe de l'insuline et des acides aminés dans le milieu. Il semblerait qu'il en soit de même chez les mammifères, dans des cultures primaires d'hépatocytes de rat (Chotechuang et al. 2009). En revanche, chez les oiseaux (poulet), en l'absence de récepteur à l'insuline dans les cellules musculaires, les acides aminés sont capables d'induire la phosphorylation de la protéine S6K1 (Tesseraud et al. 2003).**

Il est aujourd'hui évident que les acides aminés sont des facteurs impliqués dans la régulation de l'expression des gènes chez les mammifères via différentes voies de signalisation telles que la voie GCN2 (inhibée par la présence d'acides aminés) (Chotechuang et al. 2009; Jousse et al. 2004) et la voie TOR (Avruch et al. 2009; Proud 2007). Dans le cadre de cette étude, nous avons étudié l'effet de la présence des acides aminés seuls ou combinés à l'insuline sur l'expression des gènes du métabolisme chez la truite.

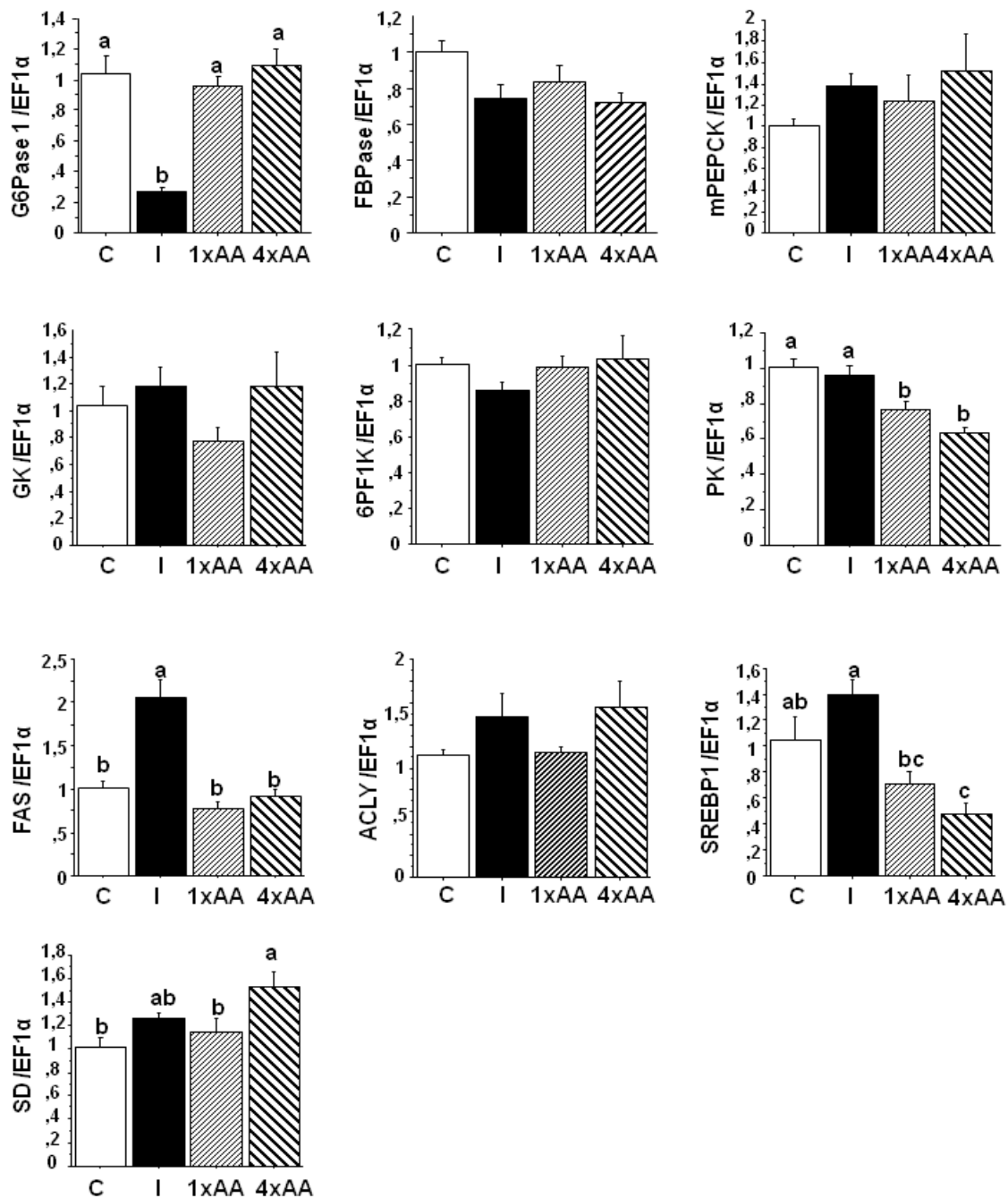


Figure 25 : Effet de l'insuline et des acides aminés à la concentration 1X ou 4X sur l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire dans des hépatocytes de truite après 8h de stimulation. Les cellules ont été laissées sans acides aminés pendant 2h. Puis, le milieu de culture a été remplacé pendant 8h avec un milieu dépourvu en acides aminés (C), un milieu contenant 4nM d'insuline ou un milieu contenant un mélange d'acides aminés à la concentration 1X ou 4X.

Choix du temps d'exposition des cellules afin d'observer les effets de l'insuline et des acides aminés sur l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire dans des hépatocytes de truite (Résultats complémentaires, Figure 25)

Afin de se placer dans les meilleures conditions possibles pour observer les effets de l'insuline et des acides aminés sur la régulation de l'expression des gènes, des hépatocytes de truite en culture primaire ont été placés pendant 2h dans un milieu dépourvu d'acides aminés avant d'être stimulés pendant 8h ou 24h par un milieu contenant soit de l'insuline, soit un mélange d'acides aminés 1 ou 4 fois concentré (1X ou 4X). Les résultats après 8h de stimulation présentés dans la Figure 25 constituent des données complémentaires qui ne figurent pas dans l'article n°1. Ces résultats montrent qu'après 8h de stimulation, l'insuline inhibe d'un facteur 5 l'expression de la G6Pase et active celles de FAS et SREBP (respectivement, d'un facteur 2 et 1,5). Les acides aminés diminuent les niveaux d'ARNm codant pour la PK quelle que soit leur concentration. Par ailleurs, l'expression des gènes SREBP1 et SD est respectivement inhibée (/2) et activée (x1,5) par les acides aminés à la concentration 4X.

Bien que l'effet de l'insuline commence à être visible dès 8h pour certains gènes, il reste néanmoins faible comparé à celui observé après 24h de stimulation (Figure 26). Par exemple, l'expression du gène FAS est induite d'un facteur 2 après 8h de stimulation et d'un facteur 15 après 24h de stimulation. De plus, l'effet activateur des acides aminés sur les gènes de la néoglucogenèse observé après 24h de stimulation ne semble pas encore être effectif à 8h. Pour ces raisons nous avons donc choisi de travailler sur des cellules stimulées pendant 24h.

Effets des acides aminés seuls sur l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire après 24h de stimulation : comparaison de deux concentrations 1X et 4X (Figure 3 de l'article n°1)

Afin d'étudier l'effet spécifique des acides aminés sur l'expression des gènes du métabolisme, des hépatocytes de truite en culture primaire ont été placés pendant 2h dans un milieu dépourvu d'acides aminés avant d'être stimulés pendant 24h par un milieu contenant un mélange d'acides aminés 1 ou 4 fois concentré (1X ou 4X). Chez les mammifères, l'expression du gène AS est connue pour être stimulée suite à l'activation de la voie GCN2 par une déficience en acides aminés (Gong et al. 1991; Guerrini et al. 1993) Nous avons donc choisi d'analyser l'expression de ce gène comme marqueur de la présence ou de l'absence d'acides aminés dans le milieu de culture. Comme attendu, l'expression du

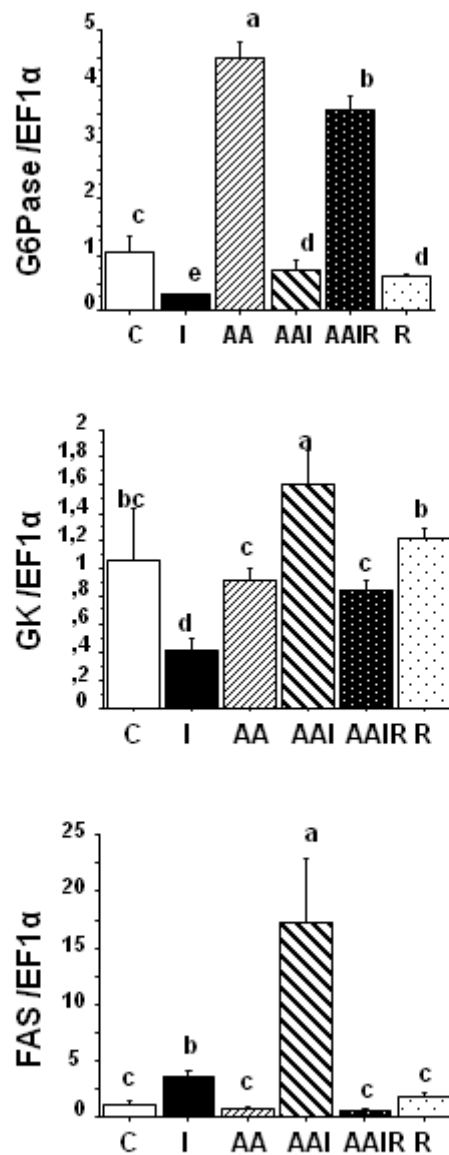


Figure 26 : Effet combiné de l'insuline et des acides aminés, après 24h de stimulation, sur l'expression des gènes G6Pase, GK et FAS dans des hépatocytes de truite.

Exemples, tirés de la figure 4 de l'article n°1, représentatifs des différents types de régulation.

gène AS est significativement inhibée par les acides aminés de façon dose-dépendante après 24h de stimulation. Certains gènes cibles du métabolisme présentent également des régulations par les acides aminés. Ainsi, l'expression des gènes G6Pase, mPEPCK, et 6PF1K augmente significativement en présence d'acides aminés de façon dose-dépendante, alors que celle des gènes PK et SD n'est stimulée qu'en présence d'une concentration 4X d'acides aminés. En revanche, aucune variation de l'expression des autres gènes cibles (FBPase, GK, FAS, ACLY, et SREBP-1) n'a pu être observée dans nos conditions de stimulation.

- **Nous démontrons ainsi, en culture primaire d'hépatocytes de truite, l'implication des acides aminés de façon dose-dépendante dans le contrôle de l'expression non seulement du gène AS mais également d'autres gènes impliqués dans la néoglucogenèse, la glycolyse et le catabolisme des acides aminés.**

Effets spécifiques et combinés de l'insuline et des acides aminés sur l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire et implication de la voie TOR (Figure 4 de l'article n°1)

Afin d'analyser les effets spécifiques et combinés des acides aminés et de l'insuline sur l'expression des gènes du métabolisme, des d'hépatocytes de truite en culture primaire ont été placés dans un milieu sans acides aminés pendant 2h avant d'être stimulés par de l'insuline, des acides aminés, ou une combinaison de ces deux facteurs. Nous avons également utilisé la rapamycine, inhibiteur de TOR, afin d'évaluer l'implication de cette voie de signalisation dans la régulation de l'expression des gènes du métabolisme hépatique (Figure 26).

En ce qui concerne les gènes de la glycolyse, nos travaux ont montré que l'insuline diminue d'un facteur 2 l'expression du gène GK en absence d'acides aminés alors que les acides aminés seuls n'ont aucun effet. Cependant, en présence d'insuline, les acides aminés induisent une augmentation significative du niveau d'ARNm codant pour la GK et cet effet est supprimé par l'ajout rapamycine. L'insuline ne modifie pas le niveau d'expression de 6PF1K. En revanche, les acides aminés, en présence ou absence d'insuline, induisent l'expression de ce gène. Et, l'effet combiné de l'insuline et des acides aminés est inhibé par la rapamycine. Concernant l'expression du gène codant pour la PK, celle-ci n'est pas modifiée par les acides aminés mais est faiblement (x1,2) activée par l'insuline et l'est

davantage par la combinaison insuline/acides aminés (facteur 2). Une fois encore, l'effet combiné est inhibé par la rapamycine.

- **Alors que séparément, l'insuline ou les acides aminés seuls n'affectent que très peu l'expression des gènes de la glycolyse (GK, 6PF1K et PK), la combinaison de ces deux acteurs entraîne une induction importante de l'expression de ces trois gènes de façon dépendante de la voie de signalisation TOR.**

Les gènes codant pour la FAS et le facteur de transcription SREBP-1 sont deux gènes impliqués dans la lipogenèse et régulés de façon similaire dans notre modèle cellulaire. L'insuline active significativement leur expression mais cet effet est considérablement renforcé par l'ajout d'acides aminés, il est d'un facteur 15 pour FAS et d'un facteur 4 pour SREBP1. L'induction de l'expression de ces deux gènes par l'effet conjoint de l'insuline et des acides aminés est inhibée de façon drastique par l'ajout de rapamycine. Enfin, alors que ni l'insuline, ni les acides aminés ne modifient l'expression des gènes ACLY et SD, on observe un effet synergique positif de leur présence conjointe dans le milieu sur l'expression de ces deux gènes. Cet effet combiné est également inhibé par la rapamycine.

- **Combinés à l'insuline, les acides aminés activent de façon importante (supérieure à l'induction liée à l'insuline seule) l'expression de certains gènes liés à la lipogenèse (FAS, ACLY et SREBP1) et au catabolisme des acides aminés (SD). Comme pour les gènes de la glycolyse, il semble que ces régulations soient dépendantes de la voie de signalisation TOR.**

Concernant la régulation de l'expression des gènes de la néoglucogenèse, les types de régulation observés au cours de nos expériences varient entre les 3 gènes étudiés. Pour la G6Pase, l'insuline et les acides aminés agissent de façon opposée. En effet, alors que l'insuline diminue le niveau d'ARNm codant pour la G6Pase, les acides aminés l'augmentent. Cependant, comparé à l'effet des acides seuls, la combinaison insuline/acides aminés diminue de façon drastique l'expression du gène G6Pase, jusqu'à atteindre un niveau inférieur à celui mesuré dans les cellules contrôles. Cette inhibition est totalement contrecarrée par la rapamycine. Alors que séparément l'insuline et les acides aminés n'ont aucun effet sur l'expression du gène FBPase, ils induisent ensemble l'expression de ce gène et l'ajout de rapamycine ne modifie en rien cet effet. Enfin, l'insuline et les acides aminés respectivement inhibent et activent l'expression du gène mPEPCK. Une fois associés, l'insuline et les acides aminés augmentent l'expression du gène mPEPCK comparativement

aux cellules contrôles mais cette augmentation est moindre que celle induite par les acides aminés seuls. L'ajout de rapamycine inhibe très légèrement cet effet.

- De façon générale, l'effet inhibiteur de l'insuline sur les gènes de la néoglucogenèse est modifié par l'ajout d'acides aminés ayant pour leur part un effet activateur. L'effet résultant de la combinaison de l'insuline et des acides aminés sur l'expression du gène codant pour la G6Pase est clairement dépendant de la voie TOR ce qui ne semble pas être le cas pour la FBPase et la mPEPCK.

En conclusion, cette étude montre que l'expression des gènes du métabolisme hépatique est non seulement régulée par l'insuline mais également par les acides aminés. En effet, les acides aminés, seuls ou associés à l'insuline, semblent jouer un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire. De plus, la voie de signalisation TOR, dont l'activation nécessite la présence conjointe de l'insuline et des acides aminés, semble être l'une des voies impliquée dans la médiation de l'effet des acides aminés. Ces données suggèrent donc un rôle important des protéines alimentaires dans le contrôle des métabolismes glucidique et lipidique dans le foie de truite. Nous confirmons ainsi, chez un modèle non mammifère, l'implication de TOR dans la régulation des gènes lipogéniques (Porstmann et al. 2008) et élargissons l'implication de cette voie dans la régulation de gènes clés du métabolisme glucidique.

II. Effets propres de la leucine, de la méthionine et de la lysine sur la régulation de l'expression des gènes des métabolismes glucidique et lipidique dans des hépatocytes de truite arc-en-ciel (Publication n°2)

Après avoir démontré les effets d'un mélange d'acides aminés, seul ou en présence d'insuline, sur l'expression des gènes du métabolisme, nous avons recherché si l'effet des acides aminés pouvait être réduit à l'effet d'un acide aminé en particulier. Nous nous sommes donc intéressé à la leucine, acide aminé à chaîne ramifiée, connue pour être une molécule « signale » chez les mammifères. En effet, la leucine stimule la synthèse protéique, *via* la voie de signalisation mTOR (Crozier et al. 2005; Kimball et al. 2006b; Proud 2004; Stipanuk 2007). Quelques études ont également démontré la capacité de la leucine à stimuler la voie mTOR dans le foie (Ijichi et al. 2003; Krause et al. 2002). Cependant, l'implication de la leucine dans la régulation de l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire restait à déterminer. Nous avons également étudié l'effet de la lysine et de la méthionine. Comme décrit précédemment, le développement d'une aquaculture durable, nécessite de s'affranchir de l'utilisation des matières premières d'origine marine dans la composition des aliments pour poissons d'élevage (Nadeau et al. 2004; Naylor et al. 2000; Naylor et al. 2009; Tidwell et al. 2001). Dans ce contexte, les huiles et protéines végétales ont été proposées comme alternative à l'huile et la farine de poisson (Gatlin et al. 2007). Cependant le profil des acides aminés essentiels des protéines végétales diffère de celui de la farine de poisson. Ainsi, les aliments à base de matières végétales ne satisfont généralement pas les besoins en acides aminés essentiels de la truite arc-en-ciel et l'ajout d'acides aminés sous forme cristalline est souvent nécessaire (Cheng et al. 2003; Davies et al. 1997; NRC 1993). La lysine et la méthionine sont les principaux acides aminés limitant dans les aliments pour poisson et particulièrement dans les aliments à base de végétaux. Il est également à noter que la lysine et la méthionine, de façon directe ou indirecte *via* leurs métabolites, jouent un rôle dans la régulation du métabolisme. Par exemple, la lysine est impliquée dans la régulation de la synthèse de l'oxyde nitrique et la modification des protéines (méthylation, actétylation, ubiquitination etc...)(Wu 2009). La méthionine, quant à elle, est impliquée, entre autre, dans le métabolisme cellulaire, la méthylation des protéines et de l'ADN ou encore l'expression des gènes (Metayer et al. 2008; Tesseraud et al. 2009; Wu 2009).

L'objectif de cette expérimentation était donc d'étudier si la leucine, la méthionine et la lysine pouvaient mimer l'effet d'un mélange d'acides aminés sur la signalisation Akt/TOR et l'expression des gènes du métabolisme. Pour cela, nous avons stimulé des d'hépatocytes de

truite avec un mélange d'acides aminés, de la leucine, de la méthionine ou de la lysine en présence ou absence d'insuline.

Ces travaux ont fait l'objet de la publication suivante :

Effect of single amino acid leucine, methionine and lysine on carbohydrate and lipid metabolism-related gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Soumis à Journal of Nutrition*. Lansard Marine, Panserat Stéphane, Plagnes-Juan Elisabeth, Dias Karine, Seilliez Iban, Skiba-Cassy Sandrine

L-Leucine, L-Methionine, and L-Lysine Are Involved in the Regulation of Intermediary Metabolism-Related Gene Expression in Rainbow Trout Hepatocytes^{1,2}

Marine Lansard, Stéphane Panserat, Elisabeth Plagnes-Juan, Karine Dias, Iban Seilliez, and Sandrine Skiba-Cassy*

INRA, UMR1067 Nutrition Aquaculture et Génomique, Pôle d'hydrobiologie, CD918, F-64310 St-Pée-sur-Nivelle, France

Abstract

Using rainbow trout hepatocytes stimulated with L-leucine, L-methionine, or L-lysine in the presence or absence of bovine insulin, we investigated the ability of these amino acids to mimic the effects of a pool of amino acids on protein kinase B (Akt)/target of rapamycin (TOR) signaling pathways and expression of 6 genes known to be subjected to insulin and/or amino acid regulation [*glucose-6-phosphatase (G6Pase)*, *phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)*, *glucokinase (GK)*, *pyruvate kinase (PK)*, *fatty acid synthase (FAS)*, and *serine dehydratase (SDH)*]. Emphasis was placed on leucine, known to be a signaling molecule in mammals, and methionine and lysine that are essential amino acids limiting in plant-based diets for fish. In the presence of insulin, leucine (but not methionine or lysine) phosphorylated Akt and ribosomal protein S6 as previously observed with a pool of amino acids, suggesting that leucine might participate in the activation of the TOR pathway by amino acids in fish, as in mammals. *G6Pase*, *PEPCK*, *GK*, and *SDH* gene expression were higher in leucine-treated cells compared with control cells. Leucine combined with insulin reduced *G6Pase* gene expression by 90% and increased *FAS* gene expression > 4-fold compared with the control treatment. Methionine weakly decreased *G6Pase*, *GK*, and *SDH* gene expression and lysine but significantly decreased the mRNA level of *PEPCK*. Thus, leucine regulated gluconeogenesis and lipogenesis, but not glycolysis, in the same way as a pool of amino acids. Methionine appeared involved in the regulation of specific genes, whereas lysine only had limited effects. These findings are particularly relevant regarding the involvement of amino acids in the regulation of metabolism-related gene expression. J. Nutr. 141: 1–6, 2011.

Introduction

There is increasing evidence that amino acids together with insulin act as signaling molecules regulating protein synthesis through the activation of the target of the rapamycin complex 1 signaling pathway (1,2). This complex is a nutrient sensor regulated by both insulin (or other growth factors) and amino acids and is a key regulator of energy homeostasis, cell growth, and protein translation through the subsequent activation of p70 ribosomal S6 protein kinase 1 and ribosomal protein S6 (3).

In addition, there is growing evidence indicating that amino acids have an important role in controlling gene expression through different pathways, including GCN2 and target of rapamycin (TOR)³ (4–6). Indeed, we demonstrated in a previous study using primary cell culture of rainbow trout hepatocytes that amino acids regulated hepatic metabolism at the molecular level in combination with insulin (5). This study showed that amino acids alone or together with insulin were able to regulate expression of several genes involved in the metabolism of carbohydrates and lipids. We also demonstrated for the first time, to our knowledge, that amino acids alone were able to induce the expression of genes encoding enzymes involved in gluconeogenesis, glycolysis, and amino acid catabolism by an unknown pathway that seemed to be independent of activation

¹ Supported by the European Union 6th Framework project (contract no. 016249-2, Sustainable aquafeeds to maximise the health benefits of farmed fish for consumers-AQUAMAX), French National Research Agency (ANR-08-JCJC-0025, Low utilisation of dietary carbohydrates in carnivorous rainbow trout: role of amino acids, glucose and insulin interactions?), and the Aquitaine Region (contract no. CRRDT-20051303004AB). The AQUAMAX European project (contract no. 016249-2) also provided M.L. with a fellowship.

² Author disclosures: M. Lansard, S. Panserat, E. Plagnes-Juan, K. Dias, I. Seilliez, and S. Skiba-Cassy, no conflicts of interest.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: skiba@st-pee.inra.fr.

³ Abbreviations used: AA, pool of amino acids; Akt, protein kinase B; EAA, essential amino acids; EF1 α , Elongation factor 1 α ; G6Pase, glucose-6-phosphatase; GCN2, general control non-repressible 2; GK, glucokinase; I, insulin; MEM, minimum essential medium; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; PK, pyruvate kinase; S6, ribosomal protein; TOR, target of rapamycin.

of the TOR signaling pathway. Nevertheless, a different pattern of regulation was observed when insulin and amino acids were added together. This pattern included dramatic upregulation of several lipogenic and glycolytic genes in a TOR-dependent manner.

The aim of the present study was to investigate whether the effects of a pool of amino acids on the regulation of hepatic intermediary metabolism could be mimicked by specific essential amino acids (EAA). Several studies performed in mammals (mainly in skeletal muscle) have established that the essential branched-chain amino acid L-leucine stimulates protein synthesis in part through the activation of the TOR signaling pathway (2,7). In vitro L-leucine activation of the TOR signaling pathway has been reported in different cell types such as proliferating L6 cell line (8), C2C12 myogenic cells (9), rat pancreatic β cells (10), and rat adipocytes (11). Few studies on rat hepatocytes have reported that L-leucine activates the mTOR signaling pathway as indicated by the phosphorylation of p70 ribosomal S6 protein kinase 1 and S6 (12,13). However, the involvement of L-leucine in the control of hepatic gene expression remains to be determined.

Two other EAA, L-lysine and L-methionine, were also studied. The sustainability of the growing aquaculture industry currently depends on the progressive reduction of wild fish input into aquafeeds (14,15). Plant proteins are increasingly used in fish feeds to replace expensive fish meal (16,17). However, the EAA profile in plant proteins differs from that of fish meal. The use of high levels of plant proteins in fish feeds often brings about the need to supplement feeds with crystalline amino acids to meet the EAA requirements of the animals (18–20). L-Lysine and L-methionine are generally the first limiting EAA in many feed ingredients. Supplementation with these amino acids in deficient diets has improved the growth of several fish species such as rainbow trout (21). A recent study reported that methionine deficiency in Atlantic salmon results in increased hepatic fatty acid synthase (FAS) activity (22), suggesting methionine's direct or indirect effect on lipid metabolism. However, the addition of L-lysine and L-methionine could have other consequences on hepatic metabolism, especially on the regulation of intermediary metabolism-related gene expression in the rainbow trout liver.

[AQ4]

Our aim in this study was to investigate the specific roles of L-leucine, L-methionine, and L-lysine in the regulation of expression of mRNA encoding genes involved in carbohydrate and lipid metabolism using primary cell cultures of rainbow trout hepatocytes. We examined the phosphorylation of Akt and S6 as markers of efficacy of insulin and TOR pathway activation, respectively, and mRNA expression of metabolism-related genes under stimulation with a pool of essential and nonessential amino acids, L-leucine, L-methionine, or L-lysine, in the presence or absence of insulin. Emphasis was placed on genes related to gluconeogenesis [*Glucose-6-phosphatase* (G6Pase; E.C.3.1.3.9) and mitochondrial form of *phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PEPCK; E.C.4.1.1.32)], glycolysis [*glucokinase* (GK; E.C.2.7.1.1) and *pyruvate kinase* (PK; E.C.2.7.1.40)], lipogenesis (FAS; EC 2.3.1.85), and amino acid degradation [*serine dehydratase* (SDH; EC 4.3.1.13)].

Materials and Methods

Animals. Male rainbow trout (live body weight 250–400 g) were obtained from the INRA experimental fish farm facilities (INRA). Fish were maintained in tanks kept in open circuits at 18°C with well-aerated water under natural photoperiod conditions. Trout were fed to satiety

everyday with a commercial diet (T-3P classic, Trouw; 40% crude protein and 24% crude fat as fed). All experiments were carried out in accordance with legislation governing the ethical treatment of animals, and investigators were certified by the governmental authorities to carry out animal experiments (authority: Prefecture of Pyrénées Atlantiques, 64000 Pau, for INRA St Pée-sur-Nivelle). Animal experiments were in accordance with national regulations (Decret no. 2001–464, May 29, 2001) according to organizational policies (INRA no. 2002–36, April 4, 2002).

Hepatocyte cell culture. Isolated liver cells were prepared from 3-d feed-deprived rainbow trout as previously described (5,23). Cells were finally taken up in 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 1.5 mmol/L CaCl₂, 1% defatted BSA, 3 mmol/L glucose, 1×-MEM EAA solution (600 μ mol/L L-arginine, 100 μ mol/L L-cystine, 200 μ mol/L L-histidine, 400 μ mol/L L-isoleucine, 400 μ mol/L L-leucine, 400 μ mol/L L-lysine, 100 μ mol/L L-methionine, 200 μ mol/L L-phenylalanine, 400 μ mol/L L-threonine, 50 μ mol/L L-tryptophan, 200 μ mol/L L-tyrosine, and 400 μ mol/L L-valine) (Invitrogen), 1×-MEM nonessential amino acids solution (glycine, L-alanine, L-asparagine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, L-proline and L-serine, 100 μ mol/L each) (Invitrogen), and antibiotic antimycotic solution (1×) (Sigma). Cell viability (>98%) was assessed using the trypan blue exclusion method (0.04% in 0.15 mol/L NaCl) and cells were counted using a hemocytometer. The hepatocyte cell suspension was plated in a 6-well Primaria culture dish (BD) at a density of 3.10⁶ cells/well and incubated at 18°C. The incubation medium was replaced every 24 h over the 48 h of primary cell culture. Microscopic examination ensured that hepatocytes progressively reassociated throughout culture to form 2-dimensional aggregates, in agreement with earlier reports (24,25). Osmotic pressure of all cell culture media was verified before experiments and calibrated to 300 mosmol/L using a K7400 osmometer (Knauer) and the final pH of various solutions used was calibrated at 7.6. For experiments, 48-h cultured hepatocytes were subjected to amino acid deprivation in amino acid-free incubation medium for 2 h. According to each experimental design, cells were then maintained in amino acid and insulin-free medium (untreated control cells) or incubated in medium containing 1×-MEM essential and nonessential amino acids (AA), 2 mmol/L of L-leucine, 2 mmol/L of L-methionine, or 2 mmol/L of L-lysine in the presence or absence of 4 nmol/L of bovine insulin (I) (Sigma). In trout, plasma leucine, lysine, and methionine levels measured in portal vein increased from 0.37, 0.36, and 0.06 mmol/L, respectively, in feed-deprived fish to 0.85, 0.76, and 0.23 mmol/L in fed fish (26). To amplify the effect of each specific amino acid, we stimulated hepatocytes with 2 mmol/L leucine, methionine, and lysine as previously performed in other studies (27). The insulin concentration (4 nmol/L) used in the present study corresponds to the level of insulin observed in fed rainbow trout (as measured by RIA using bonito insulin as standard and antibodies raised against bonito insulin) (28). Because of ancestral genome duplication, fish are known to possess 2 independent insulin genes (29,30). Because trout insulin is unfortunately not available, we used bovine insulin, which has been shown to be efficient in vivo by i.p. administration and in vitro on primary culture of rainbow trout hepatocytes (23). Cells were stimulated for 15 min for Western-blot analysis and for 24 h for gene expression analysis, as previously reported (5,23). Cells were prepared for protein extraction at the end of the stimulation period or resuspended in TRIZOL reagent (Invitrogen) and stored at –80°C for subsequent mRNA extraction. Primary hepatocyte cell cultures were repeated 3 times and each cell culture included 6 replicates/treatment.

Gene expression analysis. The mRNA levels for proteins involved in metabolism were determined by real-time q-PCR as previously described (5,23). Primers were designed to overlap an intron if possible (Primer3 software) using known sequences in trout nucleotide databases (Genbank and INRA-Sigenae) as previously described (23,31,32). According to ancestral whole genome duplication, which has occurred in the teleost lineage subsequent to its divergence from mammals, genes

may be found in fish in multiple copies (33), as for *G6Pase* that presents at least 2 isoforms in rainbow trout (5,23). In the present study, analysis of *G6Pase* gene expression was limited to the first isoform of *G6Pase* (Sigenae accession no. tcay0019b.d.18_3.1.s.om.8.1–1693). Elongation factor 1 α (EF1 α) was employed as a nonregulated reference gene, as previously used in rainbow trout (23,34). No changes in EF1 α gene expression were observed in our investigations (data not shown). Relative quantification of target gene expression was performed using the mathematical model described by Pfaffl (35).

Protein extraction and Western blotting. Following incubation, cell pellets were washed with 1 mL of PBS. Then 300 μ L of cell lysis buffer [150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L EDTA, pH 7.4, 100 mmol/L sodium fluoride, 4 mmol/L sodium pyrophosphate, 2 mmol/L sodium orthovanadate, 1% Triton X-100, 0.5% NP-40-IGEPAL (Sigma) and a protease inhibitor cocktail (Roche)] were added before being stored in the culture dish at -80°C overnight. Cells were then scraped, collected, and lysed on ice for 30 min. Lysates were centrifuged at $12,000 \times g$ for 30 min at 4°C . The resulting supernatants were aliquoted and stored at -80°C . Protein concentrations were determined according to the method of Bradford using the Bio-Rad protein assay kit and BSA as reference protein. Cell lysates (20 μ g of protein) were subjected to SDS-PAGE and Western blotting using the appropriate antibody. Anti-phospho Akt (Ser⁴⁷³), anti-carboxyl terminal Akt, anti phosphor-S6 (Ser^{235/236}), anti-S6, and anti-tubulin were purchased from Cell Signaling Technologies (Ozyme). These antibodies have been shown to cross-react successfully with rainbow trout proteins of interest (36). After washing, membranes were incubated with an IRDye infrared secondary antibody (LI-COR Biotechnology). Bands were visualized by Infrared Fluorescence using the Odyssey Imaging system (LI-COR Biotechnology).

Statistical analysis. The results of gene expression and protein phosphorylation analyses were expressed as means $\pm$ SD ($n = 3$ independent observations, each the mean of 6 replications) and analyzed by 1-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test. For all statistical analyses, the level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Akt and S6 protein phosphorylation. Whereas L-leucine, L-methionine, or L-lysine alone did not induce the phosphorylation of Akt on Ser⁴⁷³, the addition of insulin (4 nmol/L) to the medium induced the phosphorylation of Akt (Fig. 1). On the other hand, amino acids plus insulin increased the phosphorylation of S6 on Ser^{235/236} compared with untreated control cells. Moreover, our results showed that leucine alone had no effect on the phosphorylation state of S6, whereas leucine combined with insulin increased it (Fig. 1A). However, this increase was significantly less than that induced by a pool of amino acids plus insulin. Finally, we found that phosphorylation of S6 on Ser^{235/236} was not affected by methionine or lysine in the presence or absence of insulin in the medium (Fig. 1B,C).

Gene expression. *G6Pase* and *PEPCK* gene expression were >3 -fold greater ($P < 0.0001$) in cells treated with a pool of amino acids compared with control untreated cells. The mRNA level of *G6Pase* was 90% ($P < 0.0001$) lower in cells treated with the combination of a pool of amino acids and insulin compared with untreated control cells. The combination of a pool of amino acids and insulin had no significant effect on the expression of *PEPCK* compared with untreated control cells. Moreover, the pool of amino acids alone had no effect on the expression of *GK*, *PK*, *FAS*, or *SDH* genes, whereas expression of these genes was higher in cells treated with the pool of amino acids plus insulin compared with untreated control cells ($P < 0.004$) (Table 1).

Leucine had no effect on the expression of *PK* and *FAS* gene expression, but *G6Pase*, *PEPCK*, *GK*, and *SDH* mRNA levels were higher in cells treated with leucine compared with untreated control cells ($P < 0.0009$). The combination of leucine and insulin increased the expression of *FAS* compared with untreated control cells but reduced *G6Pase* and *GK* mRNA

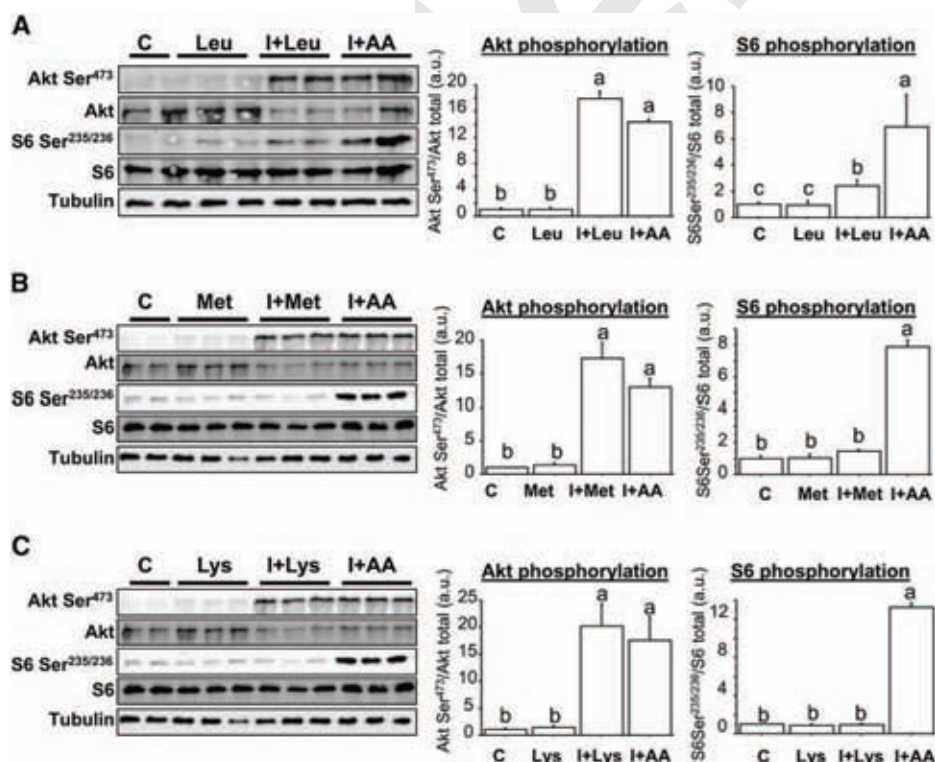


FIGURE 1 Western-blot analysis of Akt and S6 protein phosphorylation in rainbow trout hepatocytes. (A) Comparison of untreated control cells (C) and hepatocytes incubated with leucine (Leu), leucine combined with insulin (I+Leu), or a pool of amino acids combined with insulin (I+AA). (B) Comparison of untreated control cells (C) and hepatocytes incubated with methionine (Met), methionine combined with insulin (I+Met), or a pool of amino acids combined with insulin (I+AA). (C) Comparison of untreated control cells (C) and hepatocytes incubated with lysine (Lys), lysine combined with insulin (I+Lys), or a pool of amino acids combined with insulin (I+AA). Graphs represent the ratio between the phosphorylated protein and the total amount of the targeted protein. a.u., arbitrary unit. Results are mean $\pm$ SD, $n = 3$ (mean of 6 replications). Means without a common letter differ, $P < 0.05$. Membranes were also probed with an anti-tubulin antibody to control gel loading. This figure includes representative blots.

TABLE 1 Effects of a pool of EAA and nonessential amino acids (AA) in the presence (+ I) or absence of insulin on gene expression in rainbow trout hepatocytes compared with untreated control cells^{1,2}

	Fold of untreated control cell ²	
	AA	AA + I
<i>G6Pase</i>	4.7 ± 0.5*	0.1 ± 0.0*†
<i>PEPCK</i>	4.5 ± 1.2*	1.7 ± 0.3†
<i>GK</i>	1.3 ± 0.1	3.4 ± 0.5*†
<i>PK</i>	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.1*†
<i>FAS</i>	0.9 ± 0.2	7.8 ± 1.8*†
<i>SDH</i>	1.5 ± 0.6	2.5 ± 0.5*†

¹ Values are mean ± SD, *n* = 3. *Different from untreated control cells, *P* < 0.05;

[AQ7] †different from AA, *P* < 0.05.

² Untreated control cells were maintained in amino acids and insulin free medium.

levels (*P* < 0.0001). On the other hand, we found that insulin together with leucine had no effect on *PEPCK* and *SDH* gene expression. Compared with leucine-treated cells, the addition of insulin to leucine resulted in significantly lower mRNA levels of *G6Pase*, *PEPCK*, *GK*, and *SDH* but higher expression of *FAS* mRNA. Finally, *PK* mRNA levels remained stable whatever the treatment (Table 2).

G6Pase, *GK*, and *SDH* gene expression were 50% (*P* < 0.0001) lower in cells treated with methionine compared with untreated control cells. The addition of insulin to the methionine stimulation further enhanced the downregulation of *G6Pase* and *GK* gene expression but had no additional action on *SDH* mRNA level. Although methionine alone did not regulate *PEPCK* and *FAS* mRNA levels, we found that the combination of methionine and insulin significantly inhibited *PEPCK* and stimulated *FAS* gene expression. Expression of the *PK* gene was not modulated by methionine in either the presence or absence of insulin in the medium (Table 3).

Lysine alone did not affect *G6Pase* gene expression, but *G6Pase* mRNA levels were 90% (*P* < 0.0001) lower in cells treated with lysine in combination with insulin compared with untreated control cells. Furthermore, lysine slightly down-regulated *PEPCK* gene expression. This inhibitory effect was significantly enhanced in the presence of lysine and insulin. Messenger RNA levels of the 2 glycolytic genes, *GK* and *PK*, were not modified by lysine in the presence or absence of insulin. Finally, lysine had no significant effect on *FAS* or *SDH* gene

TABLE 2 Effects of leucine (Leu) in presence (+ I) or absence of insulin on gene expression in rainbow trout hepatocytes compared with untreated control cells^{1,2}

	Fold of untreated control cell ²	
	Leu	Leu + I
<i>G6Pase</i>	1.9 ± 0.6*	0.1 ± 0.0*†
<i>PEPCK</i>	4.2 ± 1.8*	0.7 ± 0.1†
<i>GK</i>	2.7 ± 0.4*	0.3 ± 0.0*†
<i>PK</i>	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.1
<i>FAS</i>	1.3 ± 0.1	5.6 ± 0.4*†
<i>SDH</i>	3.2 ± 1.3*	1.0 ± 0.4†

¹ Results are mean ± SD and are expressed as fold of untreated control cells, *n* = 3.

*Different from untreated control cells, *P* < 0.05; †different from Leu, *P* < 0.05.

² Untreated control cells were maintained in amino acids and insulin free medium.

TABLE 3 Effects of methionine (Met) in presence (+ I) or absence of insulin on gene expression in rainbow trout hepatocytes compared with untreated control cells¹

	Fold of untreated control cells ²	
	Met	Met + I
<i>G6Pase</i>	0.5 ± 0.2*	0.1 ± 0.0*†
<i>PEPCK</i>	0.9 ± 0.1	0.6 ± 0.1*†
<i>GK</i>	0.5 ± 0.1*	0.2 ± 0.0*†
<i>PK</i>	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.0
<i>FAS</i>	1.0 ± 0.2	1.4 ± 0.1*†
<i>SDH</i>	0.5 ± 0.2*	0.5 ± 0.1*

¹ Untreated control cells were maintained in amino acids and insulin free medium.

² Results are mean ± SD and are expressed as fold of untreated control cells, *n* = 3.

*Different from untreated control cells, *P* < 0.05; †different from Met, *P* < 0.05.

expression, whereas the combination of lysine with insulin significantly increased the expression of these genes (Table 4).

Discussion

There is increasing evidence that dietary amino acids are not only substrates for protein synthesis but they also have an important role in controlling gene expression (4–6). In a previous study, we reported that a pool of amino acids was able to influence rainbow trout hepatic metabolism (5). Whether amino acids were combined with insulin or not, their effects were TOR independent or TOR dependent, respectively. The next step was thus to investigate whether the effects of amino acids could be mimicked by specific EAA. We therefore studied the effects of leucine, methionine, and lysine on the regulation of expression of hepatic genes involved in gluconeogenesis, glycolysis, lipogenesis, and amino acid catabolism using primary cell culture of rainbow trout hepatocytes. Our analysis focused on the branched-chain amino acid leucine, known to regulate protein metabolism through the TOR signaling pathway (2), and methionine and lysine, 2 EAA that are generally the first limiting in plant-based diets (18–20).

Our results clearly demonstrated that leucine mimicked the upregulating effect of amino acids on gluconeogenic gene expression, whereas methionine and lysine did not do so. In mammals, as in fish, gluconeogenic genes are mainly under insulin control (23,37). Insulin inhibits the expression of *PEPCK* and *G6Pase* enzymes at the transcription level through the

TABLE 4 Effects of lysine (Lys) in presence (+ I) or absence of insulin on gene expression in rainbow trout hepatocytes compared with untreated control cells¹

	Fold of untreated control cells ²	
	Lys	Lys + I
<i>G6Pase</i>	0.9 ± 0.2	0.1 ± 0.0*†
<i>PEPCK</i>	0.8 ± 0.1*	0.6 ± 0.0*†
<i>GK</i>	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1
<i>PK</i>	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.0
<i>FAS</i>	1.1 ± 0.3	1.9 ± 0.1*†
<i>SDH</i>	1.0 ± 0.1	2.2 ± 0.2*†

¹ Untreated control cells were maintained in amino acids and insulin free medium.

² Results are mean ± SD and are expressed as fold of untreated control cells, *n* = 3.

*Different from untreated control cells, *P* < 0.05; †different from Lys, *P* < 0.05.

activation of Akt (38,39). Moreover, we recently demonstrated that amino acids also contribute to the regulation of gluconeogenesis by activating the TOR signaling pathway in concert with insulin (5). In the present study, our results indicated that this effect of amino acids could be mimicked by leucine. Indeed, as previously described for a pool of amino acids (5), leucine increased the mRNA levels of *G6Pase* and *PEPCK*, and addition of insulin inhibited expression of these genes. Furthermore, we found that leucine together with insulin activated the TOR signaling pathway as assessed by the phosphorylation of S6 protein. This suggests that, as previously demonstrated for the combination of insulin and a pool of amino acids, the regulation of *G6Pase* and *PEPCK* gene expression by leucine together with insulin might involve several pathways, including the Akt/TOR signaling pathway.

On the other hand, our results demonstrated for the first time that the regulation of gluconeogenesis by methionine and lysine differed from that of a pool of amino acids or leucine. Indeed, in contrast to the above results with leucine or a pool of amino acids, methionine and lysine significantly downregulated *G6Pase* and *PEPCK* gene expression, respectively. As indicated by the absence of Akt and S6 phosphorylation under stimulation by either methionine or lysine stimulation, such decreases were independent of the activation of the Akt/TOR signaling pathway and involved molecular mechanisms requiring further exploration. Moreover, when insulin was combined with methionine or lysine, Akt was phosphorylated as a direct consequence of insulin stimulation but S6 protein remained unphosphorylated, suggesting that, unlike leucine, these 2 amino acids were unable to activate TOR. These findings support the idea that, as in mammals (2), branched chain amino acids participate in the activation of the TOR pathway in fish. The downregulation of *G6Pase* and *PEPCK* gene expression observed under insulin/methionine and insulin/lysine stimulation therefore probably resulted from at least 2 additive mechanisms: the negative action of insulin alone through the activation of the Akt pathway, as previously observed in rainbow trout hepatocytes (5,23), and the inhibitory effects of methionine and lysine on *G6Pase* and *PEPCK* gene expression, respectively.

In terms of lipogenesis, none of the amino acids tested were able to modify the mRNA level of *FAS*. These results were consistent with those of our previous study demonstrating that a pool of amino acids alone had no significant effect on *FAS* gene expression (5). However, the combination of insulin and leucine upregulated the gene expression of *FAS* as observed with a pool of amino acids. Recent findings have suggested that the PI3K-Akt-TOR pathway regulates lipid biosynthesis in an orchestrated manner. Indeed, Porstmann et al. (6) recently demonstrated that mammalian TOR complex 1 positively regulates SREBP1, a transcription factor that controls the expression of genes encoding proteins involved in lipid metabolism, including *FAS*. We confirmed in a recent study that the stimulation of *FAS* gene expression in rainbow trout hepatocytes was associated with the activation of TOR and the increased expression of SREBP1 (5). Thus, as for gluconeogenesis, the fact that, together with insulin, leucine activated the TOR pathway and regulated lipogenesis (as did a mixture of amino acids) led us to hypothesize that the combined effects of leucine and insulin probably involved the TOR pathway. In contrast, because methionine and lysine did not activate the TOR pathway (as indicated by the absence of S6 phosphorylation) in the presence of insulin, the increased effect of insulin/methionine and insulin/lysine probably reflected the well-established Akt-dependent effect of insulin on *FAS* gene expression in rainbow trout hepatocytes (5).

On the other hand, we found that none of the 3 amino acids tested reflected the effects of a pool of amino acids on *GK* and *PK* glycolytic genes and *SDH* gene expression. Unlike a pool of amino acids, the combination of each of these amino acids with insulin did not induce accumulation of *PK* mRNA, suggesting that leucine, methionine, and lysine were probably not involved in the amino acid regulation of *PK* gene expression. Our results regarding *GK* gene expression demonstrated that its regulation by amino acids is probably highly complicated. Indeed, whereas both lysine alone and a pool of amino acids had no effect on *GK* gene expression, leucine and methionine alone activated and downregulated its expression, respectively. For leucine, this result was in agreement with a study performed on β -pancreatic cells, which demonstrated that leucine induced *GK* gene expression after 24 h of stimulation (40). Thus, the fact that a pool of amino acids had no significant effect on the expression of *GK* might possibly result from compensatory opposite effects exerted by different amino acids. Leucine and methionine inhibited the *GK* gene in the presence of insulin. Such down-regulation might be attributed to the specific effects of leucine and methionine on *GK* gene expression cumulated with the surprising but now well-established inhibition of *GK* by insulin in trout (5,23). This inhibitory effect of insulin seems to predominate over the stimulatory effect of leucine.

Complex regulation was also observed for *SDH*. In mammals, *SDH* is involved in the regulation of liver gluconeogenesis from serine in various dietary, hormonal, and developmental states by providing pyruvate (41). In rainbow trout hepatocytes, pyruvate originating from *SDH* activity might instead be also directed to lipid synthesis and contribute to enhanced lipogenesis, as previously proposed for a line of rainbow trout genetically selected for high muscle fat content (32). In the present study, only lysine regulated *SDH* in the same way as a pool of amino acids, whereas we found that methionine downregulated *SDH* gene expression and leucine increased it. The latter result was consistent with the induction of *SDH* activity and increase in *SDH* mRNA levels observed in the rat liver under leucine excess (42).

In conclusion, the present study provides evidence that regulation of intermediary metabolism-related gene expression by amino acids is complex and results from several effects, probably exerted by various amino acids. Our results indeed indicate that, as in mammals, the branched-chain amino acid leucine is able to activate the TOR pathway when combined with insulin and may mimic the effects of a pool of amino acids on at least some gluconeogenic and lipogenic genes but not on *GK* and *PK* glycolytic genes. However, this study also provides evidence that not only leucine but also other amino acids may be involved in the regulation of gene expression. Although, the involvement of the TOR pathway in the regulation of gene expression is now clearly established (5,6), further investigations are needed to identify the other intracellular signaling pathways activated by specific amino acids and contributing to the control of gene expression.

Acknowledgments

We thank M. Larquier and C. Chauvin for technical assistance, F. Terrier, Y. Hontang, and F. Sandres for fish rearing in the INRA experimental farm (Donzacq, France), and Dr. D. Bureau for critical review of the manuscript. S.S.-C. and S.P. designed the research; M.L., E.P.-J., K.D., and I.S. conducted the research; M.L. analyzed the data; M.L., S.S.-C., and S.P. wrote the paper; and S.S.-C. had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

Literature Cited

1. Avruch J, Long X, Ortiz-Vega S, Rapley J, Papageorgiou A, Dai N. Amino acid regulation of TOR complex 1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296:E592–602.
2. Kimball SR, Jefferson LS. Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *J Nutr*. 2006;136:S227–31.
3. Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 2006;124:471–84.
4. Jousse C, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Mordier S, Fafournoux P. Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;313:447–52.
5. Lansard M, Panerat S, Plagnes-Juan E, Seiliez I, Skiba-Cassy S. Integration of insulin and amino acid signals that regulate hepatic metabolism-related gene expression in rainbow trout: role of TOR. *Amino Acids*. 2010;39:801–10.
6. Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leevers S, Griffiths JR, Chung YL, Schulze A. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab*. 2008;8:224–36.
7. Stipanuk MH. Leucine and protein synthesis: mTOR and beyond. *Nutr Rev*. 2007;65:122–9.
8. Kimball SR, Shantz LM, Horetsky RL, Jefferson LS. Leucine regulates translation of specific mRNAs in L6 myoblasts through mTOR-mediated changes in availability of eIF4E and phosphorylation of ribosomal protein S6. *J Biol Chem*. 1999;274:11647–52.
9. Du M, Shen QW, Zhu MJ, Ford SP. Leucine stimulates mammalian target of rapamycin signaling in C2C12 myoblasts in part through inhibition of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *J Anim Sci*. 2007;85:919–27.
10. Xu G, Kwon G, Marshall CA, Lin T-A, Lawrence JC, McDaniel ML. Branched-chain amino acids are essential in the regulation of PHAS-I and p70 S6 kinase by pancreatic b-Cells. *J Biol Chem*. 1998;273:28178–84.
11. Lynch CJ, Fox HL, Vary TC, Jefferson LS, Kimball SR. Regulation of amino acid-sensitive TOR signaling by leucine analogues in adipocytes. *J Cell Biochem*. 2000;77:234–51.
12. Ijichi C, Matsumura T, Tsuji T, Eto Y. Branched-chain amino acids promote albumin synthesis in rat primary hepatocytes through the mTOR signal transduction system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;303:59–64.
13. Krause U, Bertrand L, Maisin L, Rosa M, Hue L. Signalling pathways and combinatory effects of insulin and amino acids in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem*. 2002;269:3742–50.
14. Naylor RL, Goldberg RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beveridge MC, Clay J, Folke C, Lubchenco J, Mooney H, et al. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*. 2000;405:1017–24.
15. New MB, Wijkstroem UN. Use of fishmeal and fish oil in aquafeeds. Further thoughts on the fishmeal trap. Rome: FAO Fisheries Circular no.975; 2002.
16. Gatlin DM, Barrows FT, Brown P, Dabrowski K, Gaylord TG, Hardy RW, Herman E, Hu GS, Kroghdahl A, et al. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquacult Res*. 2007;38:551–79.
17. Naylor RL, Hardy RW, Bureau DP, Chiu A, Elliott M, Farrell AP, Forster I, Gatlin DM, Goldberg RJ, et al. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:15103–10.
18. NRC. Nutrient requirement of fish. Board of Agriculture and NRC, editors. Washington, DC: National Academies Press; 1993.
19. Davies SJ, Morris PC. Influence of multiple amino acid supplementation on the performance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), fed soya based diets. *Aquacult Res*. 1997;28:65–74.
20. Cheng ZJ, Hardy RW, Ury JL. Effects of lysine supplementation in plant protein-based diets on the performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and apparent digestibility coefficients of nutrients. *Aquaculture*. 2003;215:255–65.
21. Gaylord TG, Barrows FT. Multiple amino acid supplementations to reduce dietary protein in plant-based rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, feeds. *Aquaculture*. 2009;287:180–4.
22. Espe M, Rathore R, Du Z-Y, Liaset BR, El-Mowafi A. 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*. 2010;39:449–60.
23. Plagnes-Juan E, Lansard M, Seiliez I, Medale F, Corraze G, Kaushik S, Panerat S, Skiba-Cassy S. Insulin regulates the expression of several metabolism-related genes in the liver and primary hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol*. 2008;211:2510–8.
24. Segner H. Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. *Comp Biochem Physiol A*. 1998;120:71–81.
25. Ferraris M, Radice S, Catalani P, Francolini M, Marabini L, Chiesara E. Early oxidative damage in primary cultured trout hepatocytes: a time course study. *Aquat Toxicol*. 2002;59:283–96.
26. Karlsson A, Eliason EJ, Myrdland LT, Farrell AP, Kiessling A. Postprandial changes in plasma free amino acid levels obtained simultaneously from the hepatic portal vein and the dorsal aorta in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol*. 2006;209:4885–94.
27. Higuchi N, Kato M, Miyazaki M, Tanaka M, Kohjima M, Ito T, Nakamura M, Enjoji M, Kotoh K, et al. Potential role of branched-chain amino acids in glucose metabolism through the accelerated induction of the glucose-sensing apparatus in the liver. *J Cell Biochem*. Epub 2010 May 12.
28. del sol Novoa M, Capilla E, Rojas P, Baro J, Gutierrez J, Navarro I. Glucagon and insulin response to dietary carbohydrate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol*. 2004;139:48–54.
29. Irwin DM. A second insulin gene in fish genomes. *Gen Comp Endocrinol*. 2004;135:150–8.
30. Mommsen TP, Silverstein JT, Plisetskaya EM, Whittaker LJ, Whittaker J, Conlon JM. Two insulins from channel catfish: purification, structures, receptor-binding and cDNA sequences. *Fish Physiol Biochem*. 2001;25:61–70.
31. Polakof S, Skiba-Cassy S, Panerat S. Glucose homeostasis is impaired by a paradoxical interaction between metformin and insulin in carnivorous rainbow trout. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;297:R1769–76.
32. Skiba-Cassy S, Lansard M, Panerat S, Medale F. Rainbow trout genetically selected for greater muscle fat content display increased activation of liver TOR signaling and lipogenic gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;297:R1421–9.
33. Jaillon O, Aury JM, Brunet F, Petit JL, Stange-Thomann N, Mauclé E, Bouneau L, Fischer C, Ozouf-Costaz C, et al. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature*. 2004;431:946–57.
34. Gabillard JC, Rescan PY, Fauconneau B, Weil C, Le Bail PY. Effect of temperature on gene expression of the Gh/Igf system during embryonic development in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Zool*. 2003;298:134–42.
35. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:E45.
36. Seiliez I, Gabillard JC, Skiba-Cassy S, Garcia-Serrana D, Gutierrez J, Kaushik S, Panerat S, Tesseraud S. An in vivo and in vitro assessment of TOR signaling cascade in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295:R329–35.
37. Barthel A, Schmoll D. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;285:E685–92.
38. Liao J, Barthel A, Nakatani K, Roth RA. Activation of protein kinase B/Akt is sufficient to repress the glucocorticoid and cAMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *J Biol Chem*. 1998;273:27320–4.
39. Schmoll D. Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase B[alpha] and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. *J Biol Chem*. 2000;275:36324–33.
40. Yang J, Wong RK, Park M, Wu J, Cook JR, York DA, Deng S, Markmann J, Naji A, et al. Leucine regulation of glucokinase and ATP synthase sensitizes glucose-induced insulin secretion in pancreatic b-Cells. *Diabetes*. 2006;55:193–201.
41. Snell K. Enzymes of serine metabolism in normal, developing and neoplastic rat tissues. *Adv Enzyme Regul*. 1984;22:325–400.
42. Zhong B, Sakai S, Saeki T, Kanamoto R. Excess leucine intake induces serine dehydratase in rat liver. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007;71:2614–7.

[AQ5]

[AQ6]

PRINCIPAUX RESULTATS ET CONCLUSIONS

Effets d'un mélange d'acides aminés, de la leucine, de la méthionine et de la lysine, en présence ou absence d'insuline sur la phosphorylation d'Akt et de S6 dans des hépatocytes de truite

Afin d'évaluer les effets d'un mélange d'acides aminés, de la leucine, de la méthionine et de la lysine, en présence ou absence d'insuline sur la phosphorylation d'Akt et de S6, des hépatocytes de truite en culture primaire ont été placés dans un milieu dépourvu d'acides aminés et d'insuline pendant deux heures avant d'être soumis à une courte stimulation (15 min) par les différents acides aminés en présence ou absence d'insuline. Comme attendu, alors que la leucine, la méthionine et la lysine seules n'ont aucun effet sur la phosphorylation d'Akt, l'association de l'insuline avec ces différents acides aminés active la phosphorylation de cette protéine. D'autre part, en accord avec ce que nous avons décrit dans le précédent article (Lansard et al. 2010), un mélange d'acides aminés induit, en présence d'insuline, la phosphorylation de S6235/236. De façon similaire, alors que la leucine seule n'a pas d'effet sur le statut de la protéine S6, on observe une induction de la phosphorylation de S6235/236 lorsqu'elle est combinée à de l'insuline. Cependant, cette induction semble plus faible que celle induite par la combinaison d'un mélange d'acides aminés et de l'insuline. En revanche, ni la méthionine, ni la lysine n'ont d'effet sur la phosphorylation de S6 en Serine 235/236.

- **Ainsi, en accord avec ce qui est décrit chez les mammifères (Ijichi et al. 2003; Krause et al. 2002), la leucine est capable de mimer en présence d'insuline les effets d'un mélange d'acides aminés sur la phosphorylation de la protéine S6. Il a été récemment démontré dans des cellules musculaires de mammifère que la lysine et la méthionine sont également capables d'induire la phosphorylation de S6 mais dans une moindre mesure que la leucine (Atherton et al. 2010). Dans notre modèle, ces deux acides aminés n'induisent pas significativement la phosphorylation de la protéine S6. Ces données montrent ainsi l'implication de seulement certains acides aminés dans l'activation de la voie TOR dans les hépatocytes de truite.**

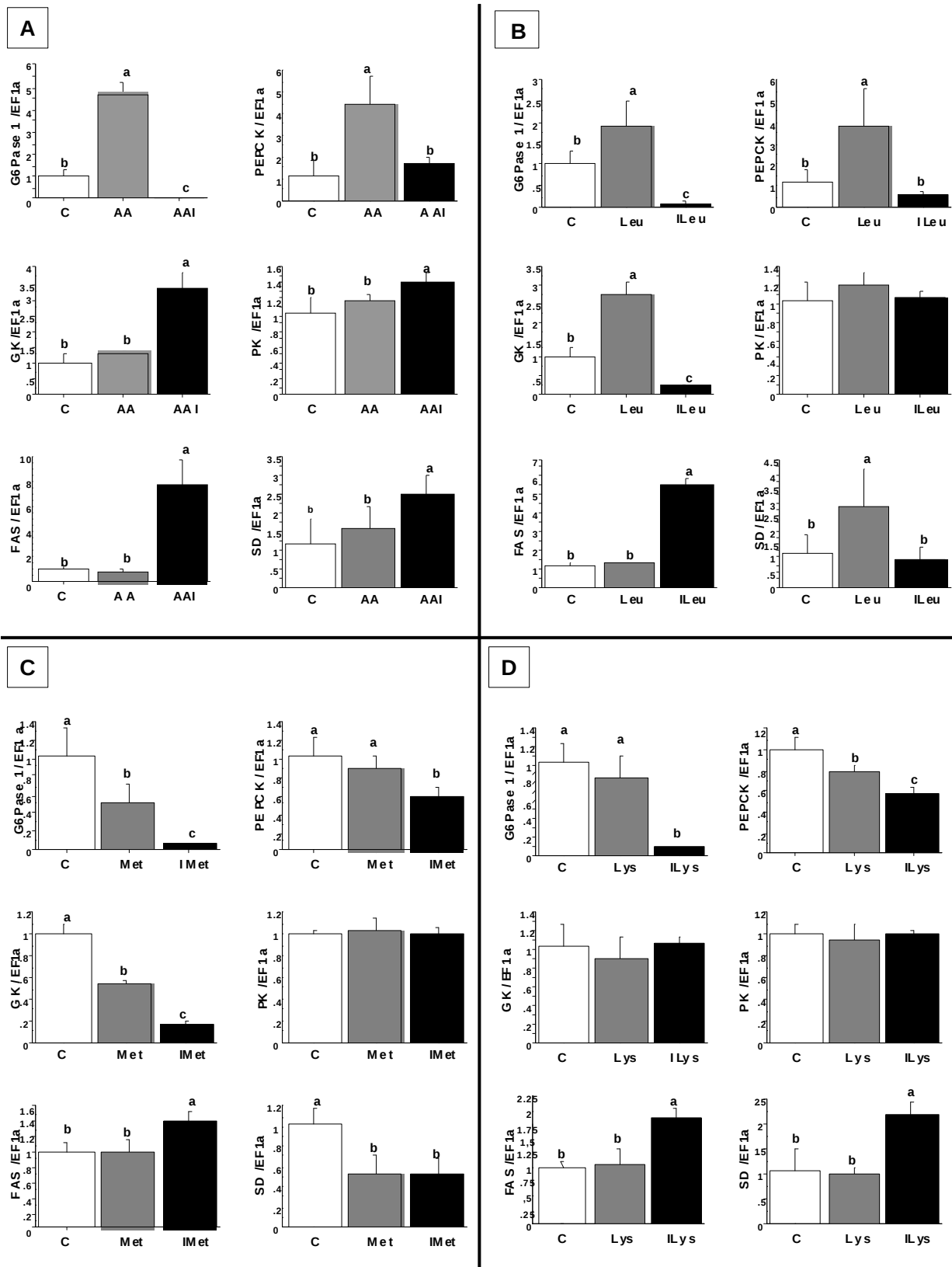


Figure 27 : Effet d'un mélange d'acides aminés (AA), de la leucine (Leu), de la méthionine (Met) et de la lysine (Lys) en présence ou absence d'insuline sur l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire.

Pour plus d'informations se reporter au tableau 1 de l'article 2.

Effets d'un mélange d'acides aminés, de la leucine, de la méthionine et de la lysine, en présence ou absence d'insuline sur l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire dans des hépatocytes de truite.

Nous avons également procédé à une stimulation plus longue de ces hépatocytes (24h) afin d'évaluer les conséquences sur l'expression de certains gènes du métabolisme (GK, PK, G6Pase, PEPCK, FAS et SD) (Figure 27). Concernant l'effet d'un mélange d'acides aminés sur l'expression de ces gènes, nos résultats confirment ceux publiés dans l'article précédent. En effet, les acides aminés seuls, augmentent l'expression des gènes codant pour la G6Pase et la PEPCK d'un facteur 4 par rapport à la condition contrôle. La combinaison insuline/mélange d'acides aminés inhibe fortement l'expression de G6Pase mais n'a pas d'effet significatif sur l'expression de PEPCK. De plus, les gènes GK, PK, FAS et SD sont régulés de la même façon : alors qu'un mélange d'acides aminés seul n'a aucun effet sur l'expression de ces gènes, combiné à de l'insuline il augmente significativement les niveaux d'ARNm codant pour la GK, la PK, la FAS et la SD respectivement d'un facteur 3,5 ; 1,4 ; 8 et 2,5 par rapport à la condition contrôle.

Comparativement à la condition contrôle, la leucine seule induit l'expression des gènes G6Pase (x2), PEPCK (x3,5), GK (x2,5) et SD (x3) mais n'a aucun effet spécifique sur les niveaux d'ARNm codant pour la PK et la FAS. Combinée à de l'insuline la leucine augmente l'expression du gène FAS, diminue celle de G6Pase et de GK et n'a aucun effet sur l'expression de PEPCK et SD. Comparée à la leucine seule, la combinaison leucine/insuline inhibe l'expression des gènes G6Pase, PEPCK, GK et SD mais induit l'expression de FAS d'un facteur 5. Enfin, la leucine, en présence ou absence d'insuline, n'a aucun effet sur les niveaux d'ARNm codant pour la PK.

La méthionine induit une inhibition de l'expression des gènes G6Pase, GK et SD. Cet effet inhibiteur est significativement renforcé par l'ajout d'insuline dans les cas de la G6Pase et de la GK mais reste inchangé pour la SD. Par rapport au contrôle, la méthionine seule ne semble pas pouvoir réguler l'expression des gènes PEPCK et FAS mais combinée à l'insuline elle inhibe d'un facteur 2 l'expression de PEPCK et stimule d'un facteur 1,4 celle de FAS. Enfin, la méthionine avec ou sans insuline, ne semble avoir aucun effet sur les niveaux d'ARNm codant pour la PK.

Alors que l'expression du gène G6Pase ne semble pas être affectée par la lysine seule, celle-ci est considérablement inhibée (facteur 10 par rapport au contrôle) par la présence conjointe de lysine et d'insuline dans le milieu de culture. De plus, la lysine diminue le taux

d'ARNm codant pour la PEPCK et cet effet est significativement plus important après l'ajout d'insuline. Par ailleurs, la lysine diminue l'expression des gènes FAS et SD en présence d'insuline, mais ne présente aucun effet seule. Enfin, nous n'observons aucun effet de la lysine, en présence ou absence d'insuline sur l'expression des gènes glycolytiques GK et PK.

- **La leucine mime les effets d'un mélange d'acides aminés sur la régulation de l'expression de certains gènes impliqués dans les voies de la néoglucogenèse et de la lipogenèse, ce n'est en revanche pas le cas pour les gènes de la glycolyse GK et PK. La méthionine seule est également capable de réguler l'expression de certains gènes du métabolisme, mais ses effets sont différents de ceux générés par un mélange d'acides aminés. Enfin la lysine, ne présente que peu d'effet sur la régulation de l'expression des gènes étudiés.**

En conclusion, il semble que la leucine soit capable de mimer les effets d'un mélange d'acides aminés sur la régulation de l'expression des gènes de la néoglucogenèse et la lipogenèse, ce qui ne semble pas être le cas de la méthionine et de la lysine. De part l'implication de la voie TOR dans la régulation de l'expression des gènes de la G6Pase, PEPCK et FAS par un mélange d'acides aminés et d'insuline (cf article 1), et l'aptitude de la leucine à activer TOR en présence d'insuline, il est possible que l'inhibition de l'expression de G6Pase et PEPCK et l'activation de l'expression de FAS en présence de leucine et d'insuline soit dépendante de la voie TOR. Par ailleurs, les effets observés pour la méthionine seule sur l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire semblent être transmis par une voie autre que la voie TOR dans la mesure où la méthionine n'est pas capable d'induire la phosphorylation de S6 en présence d'insuline.

III. Effet du remplacement partiel ou total des huiles et farines de poisson par des produits d'origines végétales dans l'aliment pour truite sur la signalisation cellulaire et l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire (Publication n°3)

Comparés aux animaux d'élevage terrestres, les poissons ont un besoin protéique alimentaire beaucoup plus élevé. Dans les aliments pour salmonidés, la farine et l'huile de poissons, utilisées respectivement comme sources majeures de protéines et de lipides, présentent de nombreux atouts. En effet, la farine de poissons est riche en protéines, et présente un profil en acides aminés ainsi qu'un équilibre entre acides aminés essentiels et non essentiels idéal pour couvrir les besoins des poissons et promouvoir leur croissance. L'huile de poisson possède un profil en acides gras capable de couvrir les besoins des poissons notamment en acides gras polyinsaturés n-3 à longue chaîne (EPA et DHA) (NRC 1993). Cependant dans le contexte actuel, on cherche à diminuer la dépendance de l'aquaculture vis-à-vis des ressources halieutiques (Naylor et al. 2000; Naylor et al. 2009; Tidwell et al. 2001). Ainsi, de nombreuses études ont décrit l'effet du remplacement des farines (Gomez-Requeni et al. 2004; Kaushik et al. 2004; Kaushik et al. 1995; Panserat et al. 2008; Vilhelmsson et al. 2004; Watanabe et al. 1997) ou des huiles (Bell et al. 2001; Menoyo et al. 2005; Panserat et al. 2008; Regost et al. 2003; Richard et al. 2006) de poisson par des ingrédients d'origine végétale mais, l'effet d'un remplacement conjoint n'avait jamais été étudié.

Nous savons que le profil en acides aminés des protéines végétales diffère de celui des farines de poisson, ce qui nécessite souvent l'ajout d'acides aminés (principalement lysine et méthionine) sous forme cristalline dans l'aliment (Cheng et al. 2003; Davies et al. 1997; NRC 1993). Or, nos études *in vitro* ont montré un effet important et complexe des acides sur la régulation de l'expression des gènes du métabolisme. L'effet observé pour un mélange d'acides aminés semble être le résultat de différents effets produits par divers acides aminés. L'objectif de cette étude était donc d'analyser les effets de la substitution conjointe partielle ou totale des huiles et farines de poisson par des matières premières d'origine végétale sur le métabolisme intermédiaire dans le foie de truite arc-en-ciel. Ces travaux ont été réalisés dans le cadre du programme 1 du projet européen Aquamax. Pour cela, des truites ont été nourries pendant 12 semaines avec un des quatre aliments expérimentaux, isoprotéiques, isolipidiques et isoénergétiques correspondant à :

- Aucun remplacement des huiles et protéines de poisson par des ingrédients végétaux, aliment 0/0
- L'incorporation de 50% d'huiles et protéines végétales, aliment 50/50

- Un remplacement partiel de la farine de poisson et un remplacement total des huiles de poisson, aliment 50/100
- Un remplacement total des matières premières de poissons par des huiles et protéines végétales, aliment 100/100
-

Les protéines végétales étaient composées d'un mélange de gluten de maïs et blé, blé entier extrudé, soja et maïs. Les huiles végétales étaient quant à elles composées d'un mélange d'huile de colza, lin et palme.

Après 12 semaines d'alimentation avec les aliments expérimentaux, les poissons ont été prélevés pour des études portant sur la composition de la chair (analyse des profils en acides gras principalement) et la détermination des acteurs du transport/métabolisme des lipides afin de vérifier la qualité du produit. Parallèlement, nous avons étudié chez ces mêmes poissons l'effet du remplacement des produits d'origine halieutique par des produits végétaux sur la régulation du métabolisme intermédiaire.

Ces travaux ont fait l'objet de la publication suivante :

Hepatic protein kinase B (Akt) - target of rapamycin (TOR)-signalling pathways and intermediary metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) are not significantly affected by feeding plant-based diets. British Journal of Nutrition, 2009; 102: 1564-73. Lansard Marine, Panserat Stéphane, Seilliez Iban, Polakof Sergio, Plagnes-Juan Elisabeth, Geurden Inge, Médale Françoise, Kaushik Sadasivam, Corraze Geneviève, Skiba-Cassy Sandrine.

Hepatic protein kinase B (Akt)–target of rapamycin (TOR)–signalling pathways and intermediary metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) are not significantly affected by feeding plant-based diets

Marine Lansard^{1,2,3}, Stéphane Panserat^{1,2,3}, Iban Seiliez^{1,2,3}, Sergio Polakof^{1,2,3,4}, Elisabeth Plagnes-Juan^{1,2,3,4}, Inge Geurden^{1,2,3}, Françoise Médale^{1,2,3}, Sadasivam Kaushik^{1,2,3}, Geneviève Corraze^{1,2,3} and Sandrine Skiba-Cassy^{1,2,3*}

¹INRA, UMR1067 Nutrition Aquaculture et Génomique, Pôle d'hydrobiologie, CD918, F-64310 St-Pée-sur-Nivelle, France

²IFREMER, UMR1067 Nutrition Aquaculture et Génomique, F-29280 Plouzané, France

³Université Bordeaux 1, UMR 1067 Nutrition Aquaculture et Génomique, F-33405 Talence, France

⁴Laboratorio de Fisiología Animal, Departamento de Biología Funcional Ciencias da saúde, Facultade de Biología, Universidade de Vigo, Vigo, Spain

(Received 9 March 2009 – Revised 11 June 2009 – Accepted 12 June 2009 – First published online 10 August 2009)

The aim of the present study was to analyse the effects of partial or total replacement of fish meal (FM) and fish oil (FO) by a mixture of plant protein (PP) and a mixture of vegetable oils (VO) on the hepatic insulin–nutrient–signalling pathway and intermediary metabolism-related gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Triplicate groups of fish were fed four practical diets containing graded levels of replacement of FM and FO by PP and VO for 12 weeks: diet 0/0 (100 % FM, 100 % FO); diet 50/50 (50 % FM and 50 % PP, 50 % FO and 50 % VO); diet 50/100 (50 % FM and 50 % PP, 100 % VO); diet 100/100 (100 % PP, 100 % VO). Samplings were performed on trout starved for 5 d then refed with their allocated diet. In contrast to partial substitution (diet 50/50), total substitution of FM and FO (diet 100/100) led to significantly lower growth compared with diet 0/0. The insulin–nutrient–signalling pathway (protein kinase B (Akt), target of rapamycin (TOR), S6 protein kinase 1 (S6K1) and S6) was characterised in trout liver and found to be activated by refeeding. However, changes in diet compositions did not differentially affect the Akt–TOR–signalling pathway. Moreover, expression of genes encoding fructose-1,6-bisphosphatase, mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase, glucokinase, pyruvate kinase and carnitine palmitoyl transferase 1 were not affected by refeeding or by dietary changes. Refeeding down- and up-regulated the expression of gluconeogenic glucose-6-phosphatase isoform 1 and lipogenic fatty acid synthase genes, respectively. Expression of both genes was also increased with partial replacement of FM and total replacement of FO (diet 50/100). These findings indicate that plant-based diets barely affect glucose and lipid metabolism in trout.

Insulin–signalling pathway: Plant-based diets: Hepatic gene expression: Rainbow trout

Teleosts in general are known to have high dietary protein and specific essential fatty acid requirements⁽¹⁾. In intensively farmed fish, the indispensable amino acids and essential fatty acids are generally supplied by fish meal (FM) and fish oil (FO) derived from marine fishery resources⁽²⁾. Such a practice is considered controversial^(3,4) because fishery resources cannot meet the increasing demands for such feedstuffs, and reliance on wild fisheries thus needs to be reduced in order to ensure sustainable development of aquaculture. This has increased the interest in research into alternatives to FM and FO such as plant feedstuffs, i.e. plant proteins (PP) and vegetable oils (VO)⁽⁵⁾. Compared with FM, most PP sources are characterised by relatively low protein content, amino

acid imbalance, low palatability, presence of endogenous anti-nutritional factors and large amounts of carbohydrates^(5,6), and the fatty acid profiles of VO do not fulfil the essential fatty acid needs of fish^(7–9). Despite these disadvantages, much progress has been made in the use of plant products in aquafeeds to replace either FM by PP or FO by VO^(7,10–17). However, recent studies have revealed changes in patterns of expression of several genes involved in N and fat metabolism and their corresponding protein profiles in the livers of salmonids fed feeds with low levels of FO or FM^(18–21). These findings strongly suggest changes in intermediary metabolism as a consequence of high levels of plant feedstuffs in the diets of teleosts⁽²²⁾. The aim of the present study was therefore to

Abbreviations: Akt, protein kinase B; CPT1, carnitine palmitoyl transferase 1; diet 0/0, fish meal and fish oil as the main protein and fat sources; diet 50/50, 50 % supply of proteins by a mixture of plant protein sources and 50 % of fish oil substituted by a mixture of vegetable oil; diet 50/100, 50 % supply of proteins by a mixture of plant protein sources and all fish oil substituted by vegetable oil; diet 100/100, total replacement of both fish meal and fish oil by plant protein and vegetable oil; EF1 α , elongation factor 1 α ; FAS, fatty acid synthase; FBPAse, fructose-1,6-bisphosphatase; FM, fish meal; FO, fish oil; GK, glucokinase; G6Pase, glucose-6-phosphatase; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; PK, pyruvate kinase; PP, plant protein; TOR, target of rapamycin; VO, vegetable oil.

* **Corresponding author:** Dr Sandrine Skiba-Cassy, fax +33 5 59 54 51 52, email skiba@st-pee.inra.fr

analyse the effects of partial or total combined replacement of FM and FO by a blend of plant ingredients on intermediary metabolism, which has yet to be fully explored in fish, even in salmonids. The present study was focused on the liver since it is the centre of intermediary metabolism and lipogenesis.

The liver intermediary metabolism in mammals is mainly regulated by insulin and nutrients. Insulin acts through a tyrosine kinase membrane receptor. When activated by insulin binding, tyrosine kinase recruits and phosphorylates intracellular substrates known as IRS (insulin receptor substrates). Phosphorylated IRS are used as docking sites for proteins which then transmit the insulin signal through several molecules, including successively the phosphatidylinositol-3-kinase and protein kinase B (Akt)⁽²³⁾. Through this pathway insulin regulates hepatic gene expression, especially that of intermediary metabolism. Gluconeogenic genes are mainly under insulin control⁽²⁴⁾. Indeed, in mammals, insulin inhibits expression of glucose-6-phosphatase (G6Pase), and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) enzymes at the transcriptional level^(24,25) through the activation of the protein Akt^(26,27), a critical node in the insulin-signalling pathway⁽²³⁾. In the same way, insulin regulation of fatty acid synthase (FAS) transcription in mammals is mediated by the phosphatidylinositol-3-kinase–Akt-signalling pathway⁽²⁵⁾. However, increasing evidence has emerged in recent years to show that nutrients are able to regulate hepatic gene expression in a transcriptional manner. Indeed, glycolytic and lipogenic genes are reciprocally regulated by glucose and fatty acids in the liver⁽²⁸⁾. Nutrients may also interact with insulin function. For example, excessive levels of amino acids have detrimental effects on glucose homeostasis by promoting insulin resistance and increasing gluconeogenesis⁽²⁹⁾, which could be due to the activation of complex 1 of the mammalian target of rapamycin (mTORC1). mTORC1 is regulated by both nutrients (i.e. amino acids) and growth factors (i.e. insulin) and plays a key role in the control of cell growth and protein translation through the subsequent activation of p70 ribosomal S6 protein kinase 1 and ribosomal protein S6⁽³⁰⁾. Moreover, recent findings have indicated that activation of mTORC1 also contributes to the regulation of insulin target gene expression⁽³¹⁾. No findings have been published to date concerning the nutritional regulation of Akt–TOR pathways in the livers of teleosts, normally requiring high dietary levels of amino acid.

The aim of the present study was therefore to address whether diet substitution could affect the nutrient and insulin-signalling pathways and metabolism-related gene expression, on which very little information is available for any teleost. Several key enzymes of glucose and lipid metabolism known to be under insulin control in mammals and in fish were analysed⁽³²⁾. Gluconeogenesis was investigated by studying the gene expression of G6Pase, fructose-1,6-biphosphatase (FBPase) and PEPCK. We also analysed mRNA levels of glucokinase (GK) and pyruvate kinase (PK) which catalyse the phosphorylation of glucose and the conversion of phosphoenolpyruvate to pyruvate, the first and the final steps in glycolysis, respectively⁽³³⁾. We also investigated the gene expression levels of two enzymes involved in fatty acid metabolism: (i) FAS, which is a key enzyme in fatty acid synthesis and promotes the synthesis of palmitate, through the condensation of malonyl-CoA and

acetyl-CoA⁽³⁴⁾; (ii) carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT1), which is responsible for the entry of long-chain fatty acids into the mitochondria and is considered to be a rate-limiting enzyme of fatty acid β -oxidation.

Experimental methods

Studies with animals were carried out in accordance with legislation governing the ethical treatment of animals, and investigators were certified by the French Government to carry out animal experiments (authority: Prefecture of Pyrénées Atlantiques, 64000 Pau, for INRA St Pée-sur-Nivelle). Animal experiments were in accordance with national law Decret no. 2001-464 of 29 May 2001, as applicable in INRA according to INRA no. 2002-36, of 4 April 2002.

Feeding trial

In order to investigate the effects of partial or total replacement of FM and FO by a mixture of PP and VO, we used

Table 1. Composition of the four diets with the proportions of plant protein (PP) and the proportions of vegetable oil (VO) indicated for each diet

Diet (PP/VO)...	0/0	50/50	50/100	100/100
Ingredients (%)				
Fish meal LT (CP 70%)*	59	29	29	–
Maize gluten meal (CP 57%)†	–	20	20	20
Soyabean meal (CP 46%)‡	–	8	8	15.4
Wheat gluten (CP 78%)‡	–	7.8	7.8	26
Maize§	7	7	7	7
Extruded whole wheat†	12	3.2	3.2	0.1
Fish oil*	19	11	–	–
Rapeseed oil	–	5.5	11	11.6
Linseed oil	–	2.2	4.4	4.6
Palm oil	–	3.3	6.6	7
Soyabean lecithin¶	–	–	–	1
L-Lysine**	–	–	–	1.2
L-Arginine**	–	–	–	0.1
CaHPO ₄ ·2H ₂ O (18 % P)	–	–	–	3
Astaxanthin††	0.03	0.04	0.05	0.03
Mineral premix‡‡	1	1	1	1
Vitamin premix§§	1	1	1	1
Analytical composition				
DM (%)	94.1	94.3	93.9	90.9
CP (% DM)	45.9	46.7	45.9	44.4
Crude fat (% DM)	26.6	27.4	27.6	27.8
Crude starch (% DM)	12.1	10.4	11.2	11.3
Gross energy (kJ/g DM)	24.1	25.4	25.5	25.7

CP, crude protein.

* Sopropêche (Lorient, France).

† Inzo (Argentan, France).

‡ Roquette (Lestrem, France).

§ Lacadee Agro Industrie (Mont, France).

|| Daudruy (Dunkerque, France).

¶ Louis François (Saint Maur, France).

** Eurolysine (Paris, France).

†† Carophyll pink (DSM, Courbevoie, France).

‡‡ Supplied the following (per kg diet): calcium carbonate (40 % Ca), 2.15 g; magnesium hydroxide (60 % Mg), 1.24 g; potassium chloride, 0.9 g; ferric citrate, 0.2 g; potassium iodide, 4 mg; sodium chloride, 0.4 g; calcium hydrogen phosphate, 50 g; copper sulfate, 0.3 mg; zinc sulfate, 40 mg; cobalt sulfate, 2 mg; manganese sulfate, 30 mg; sodium selenite, 0.3 mg.

§§ Supplied the following (mg/kg diet): retinyl acetate, 2.58; DL-cholecalciferol, 0.037; DL- α -tocopheryl acetate, 30; menadione sodium bisulfite, 2.5; thiamin, 7.5; riboflavin, 15; pyridoxine, 7.5; nicotinic acid, 87.5; folic acid, 2.5; calcium pantothenate, 2.5; vitamin B₁₂, 0.025; ascorbic acid, 250; inositol, 500; biotin, 1.25; choline chloride, 500.

juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), having a mean initial body weight of 121 (SD 2) g, reared in our experimental fish farm facilities (INRA, Donzacq, France) at 18°C under natural photoperiod conditions. Trout were distributed into twelve circular tanks (500 litres; three tanks per diet) in groups of 100 fish each. Triplicate groups of fish were randomly allocated to one of the four isonitrogenous, isolipidic and isoenergetic diets, formulated and manufactured in our experimental facilities of Donzacq, France (Table 1) and fed for 12 weeks. Diets were constituted as follows and named by the percentage of plant feedstuff (PP/VO) incorporated: diet 0/0, in which FM and FO were the main protein and fat sources; diet 50/50, corresponding to 50 % supply of proteins by a mixture of PP sources and 50 % of FO substituted by a mixture of VO; diet 50/100, comparable with diet 50/50, except that FO was totally replaced by VO; diet 100/100, corresponding to total replacement of both FM and FO by PP and VO. Each diet was distributed by hand to visual satiation for 6 or 7 d and feed consumption was recorded every week. To follow growth and feed utilisation, fish were counted and group weighed every 3 weeks, and on the last day of the experiment the final body weight was measured. According to their size (± 450 g), fish were left unfed for 5 d in order to obtain basal levels of plasma metabolites, reached later in fish than in mammals due to their slower transit and longer gastric emptying time at low temperature compared with endothermic animals. This fasting period also contributed to homogeneity of the metabolic response of all the fish within the same group. Fish were refed a single meal to visual satiation of their allocated diet and sampled (n 6) 2 h after the meal for the signalling analysis (short-term regulation) and 8 h after the meal for molecular studies (long-term regulation). Six fish from each dietary group were sampled before refeeding and served as controls. Blood was collected from the caudal vein using a syringe pre-treated with a solution containing 4 % NaF and 4 % potassium oxalate, then centrifuged, and

plasma was kept frozen at -20°C until further analysis. Liver samples were collected, snap-frozen in liquid N_2 and then stored at -80°C before further mRNA and protein analyses.

Plasma metabolite levels

Plasma glucose, TAG and NEFA levels were measured with Glucose RTU (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France), PAP 150 (BioMérieux) and NEFA C (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany) kits, respectively, according to the recommendations of each manufacturer.

Gene expression analysis

Total RNA samples were extracted from livers of 8 h refed trout, using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. A quantity of 1 μg of the resulting total RNA was reverse transcribed into cDNA using the SuperScriptTM III RNaseH- RT kit (Invitrogen) and oligo dT primers (Promega, Charbonnières, France) according to the manufacturers' instructions. Target gene expression levels were determined by quantitative RT-PCR using specific real-time PCR primers (Table 2). To avoid amplification of genomic DNA, when possible, primer pairs included one intron-spanning oligonucleotide. Quantitative RT-PCR was carried out on an iCycler iQTM real-time PCR detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using iQTM SYBR[®] Green Supermix. mRNA levels of G6Pase isoforms 1 and 2, FBPase, mitochondrial PEPCK, GK, PK, FAS and CPT1 isoforms A and B were evaluated. Elongation factor 1 α (EF1 α) was employed as a non-regulated reference gene, as previously used in rainbow trout. No changes in EF1 α gene expression were observed in our studies (data not shown). PCR was performed using 10 μl of the diluted cDNA mixed with 5 pmol of each primer in a final volume

Table 2. Primers used to amplify rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) target genes by real-time RT-PCR

Gene	Primer sequences	Hybridisation temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Amplicon size (bp)	GenBank or Sigena accession no.
EF1 α	F: 5'-TCCTCTTGGTCGTTTCGCTG-3' R: 5'-ACCCGAGGGACATCCTGTG-3'	59°C	159	AF498320
GK	F: 5'-TGAAGGATCAGAGGTGGGTGATT-3' R: 5'-GAAGGTGAAACCCAGAGGAAGC-3'	59°C	253	AF135403
PK	F: 5'-CCATCGTCGCGGTAACAAGA-3' R: 5'-ACATAGGAAAGGCCAGGGGC-3'	59°C	158	AF246146
mPEPCK	F: 5'-GTTGGTGCTAAAGGGCACAC-3' R: 5'-CCCCTCTTCTGATAAGTCCAA-3'	59°C	149	AF246149
G6Pase-1	F: 5'-CTCAGTGGCGACAGAAAGG-3' R: 5'-TACACAGCAGCATCCAGAGC-3'	55°C	77	tcay0019b.d.18_3.1.s.om.8.1-1693
G6Pase-2	F: 5'-TAGCCATCATGCTGACCAAG-3' R: 5'-CAGAAGAACGCCACAGAGT-3'	55°C	82	AF120150
FBPase	F: 5'-GCTGGACCCCTTCATCGG-3' R: 5'-CGACATAACGCCACCATAGG-3'	59°C	182	AF333188
FAS	F: 5'-TGATCTGAAGGCCGTGTCA-3' R: 5'-GGGTGACGTTGCCGTGGTAT-3'	60°C	161	tcab0001c.e.06_5.1.s.om.8
CPT1A	F: 5'-TCGATTTTCAAGGGTCTTCG-3' R: 5'-CACACGATCAGCAAAGTGG-3'	55°C	166	AF327058
CPT1B	F: 5'-CCCTAAGCAAAAGGGTCTTCA-3' R: 5'-CATGATGTCACTCCCAGACAG-3'	55°C	149	AF606076

F, forward primer; R, reverse primer. EF1 α , elongation factor 1 α ; GK, glucokinase; PK, pyruvate kinase; mPEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase, mitochondrial isoform; G6Pase-1, glucose 6-phosphatase 1; G6Pase-2, glucose 6-phosphatase 2; FBPase, fructose 1,6-bisphosphatase; FAS, fatty acid synthase; CPT1A, carnitine palmitoyltransferase 1A; CPT1B, carnitine palmitoyltransferase 1B.

of 25 µl. The PCR protocol was initiated at 95°C for 3 min for initial denaturation of the cDNA and hot-start iTaq™ DNA polymerase activation and continued with a two-step amplification programme (20 s at 95°C followed by 30 s at specific primer hybridisation temperature) repeated forty times. Melting curves were systematically monitored (temperature gradient at 0.5°C per 10 s from 55 to 94°C) at the end of the last amplification cycle to confirm the specificity of the amplification reaction. The different PCR products were initially checked by sequencing to confirm the nature of the amplicon. Each PCR run included replicate samples (duplicate of reverse transcription and PCR amplification, respectively) and negative controls (RT- and RNA-free samples, respectively).

Relative quantification of target gene expression was performed using the mathematical model described by Pfaffl⁽³⁵⁾. The relative expression ratio (R) of a target gene was calculated based on real-time PCR efficiency (E) and the cycle threshold deviation (ΔCT) of the unknown sample v. a control sample and expressed in comparison with the EF1α reference gene:

$$R = \frac{((E_{\text{target gene}})^{\Delta CT_{\text{target gene}} (\text{control} - \text{sample})})}{((E_{\text{EF1}\alpha})^{\Delta CT_{\text{EF1}\alpha}} (\text{control} - \text{sample}))}$$

PCR efficiency (E) was measured by the slope of a standard curve using serial dilutions of cDNA. PCR efficiency values ranged between 1.90 and 2.

Protein extraction and Western blotting

Frozen livers (300 mg) from 2 h refed trout were homogenised on ice with an Ultraturrax homogeniser in a buffer containing 150 mM-NaCl, 10 mM-2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1, 3-diol, 1 mM-ethylene-glycol-bis(a-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 1 mM-EDTA (pH 7.4), 100 mM-sodium fluoride, 4 mM-sodium pyrophosphate, 2 mM-sodium orthovanadate, 1 % Triton X-100, 0.5 % NP-40-Igepal and a protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland). Homogenates were centrifuged at 1000 g for 30 min at 4°C and supernatant fractions were then centrifuged for 45 min at 150 000 g. The resulting supernatant fractions were sampled and stored at -80°C. Protein concentrations were determined using the Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Lysates (20 µg protein) were subjected to SDS-PAGE and Western blotting using the appropriate antibody. All antibodies used were obtained from Cell Signaling Technologies (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France). Rabbit anti-phospho-Akt (Ser⁴⁷³) and Akt antibodies were directed against synthetic peptides corresponding to residues surrounding phosphorylated Ser⁴⁷³ of mouse Akt and the carboxyterminal sequence of mouse Akt, respectively. Rabbit anti-phospho-mTOR (Ser²⁴⁴⁸), anti-mTOR, antiphospho-S6 protein kinase 1 (Thr³⁸⁹), anti-S6 protein kinase 1, anti-phospho-S6 (Ser^{235/236}) and anti-S6 were directed against synthetic human peptides. These antibodies have been shown to successfully cross-react with rainbow trout proteins of interest⁽³⁶⁾. After washing, membranes were incubated with an IRDye Infrared secondary antibody (LI-COR Inc. Biotechnology, Lincoln, NE, USA). Bands were visualised by Infrared Fluorescence using the Odyssey® Imaging System (LI-COR Inc. Biotechnology) and quantified by Odyssey® Infrared imaging system software (version 1.2; LI-COR Inc. Biotechnology).

Statistical analysis

Results of growth performance were expressed as mean values and standard deviations (three tanks) and analysed by

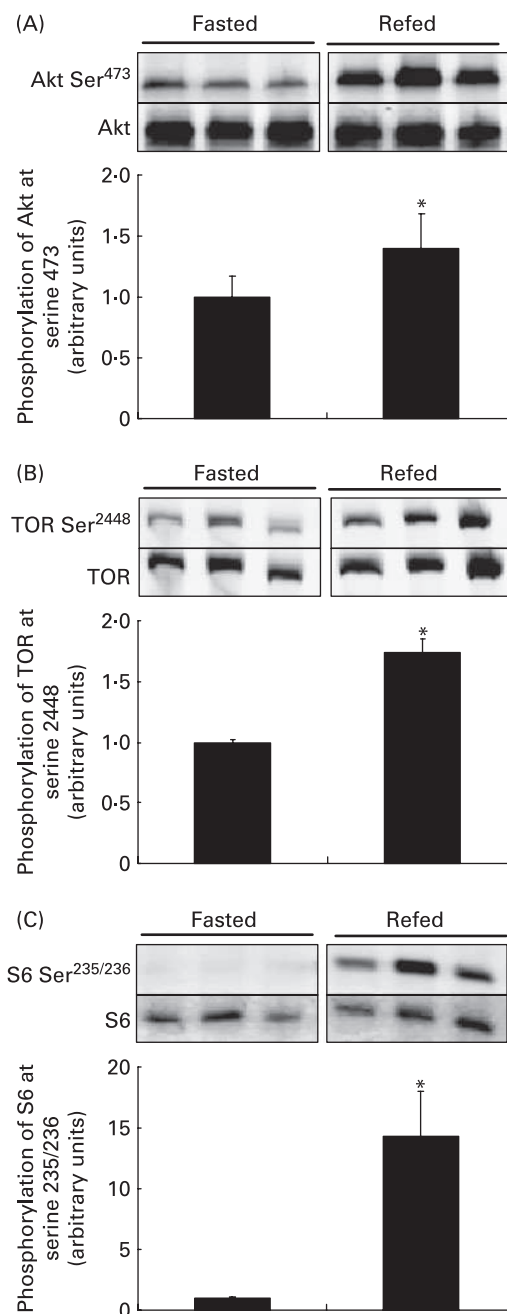


Fig. 1. Phosphorylation of protein kinase B (Akt) at Ser⁴⁷³ (A), target of rapamycin (TOR) at Ser²⁴⁴⁸ (B) and S6 at Ser^{235/236} (C) in the livers of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) deprived of food for 5 d, refed *ad libitum* and sampled 2 h after administration of the 100 % fish meal–100 % fish oil diet (diet 0/0). The gel was loaded with 40 µg of total protein per lane. Phosphorylation levels of Akt at Ser⁴⁷³, Akt, TOR at Ser²⁴⁴⁸, TOR, S6 at Ser^{235/236} and S6 were quantified and data were normalised to total amounts of Akt, TOR and S6, respectively. Western blots were performed on six individual samples and similar results were obtained; representative blots are shown. Results are means (*n* 6), with standard errors represented by vertical bars. * Mean value was significantly different from that of the fasted group (*P* < 0.05; Mann–Whitney test).

one-way ANOVA. Means were compared by the Student–Newman–Keuls comparison test. Results of plasma metabolite levels, protein phosphorylation and gene expression analysis were expressed as mean values with their standard errors (n 6) and analysed by the Mann–Whitney and Kruskal–Wallis non-parametric tests. For all statistical analyses, the level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Characterisation and regulation of the protein kinase B–target of rapamycin–signalling pathway

As illustrated in Fig. 1, proteins of the insulin–signalling pathway including Akt, TOR, and the ribosomal protein S6 were

identified in rainbow trout liver. Phosphorylation of Akt (Ser⁴⁷³), TOR (Ser²⁴⁴⁸) and S6 (Ser^{235/236}) was significantly increased ($P < 0.005$) in the livers of refed fish compared with 5 d fasted fish. Levels of total Akt, TOR and S6 were not significantly modified by refeeding.

Postprandial regulation of metabolism-related hepatic gene expression

The effects of refeeding with the standard diet (diet 0/0) on G6Pase isoforms 1 and 2, FBPase, mitochondrial PEPCK, GK, PK, FAS, CPT1A and CPT1B gene expression in the liver are presented in Fig. 2. In 8 h refed fish, G6Pase-1 gene expression was 3-fold decreased ($P < 0.05$) and FAS gene expression was 4-fold increased ($P = 0.002$) compared

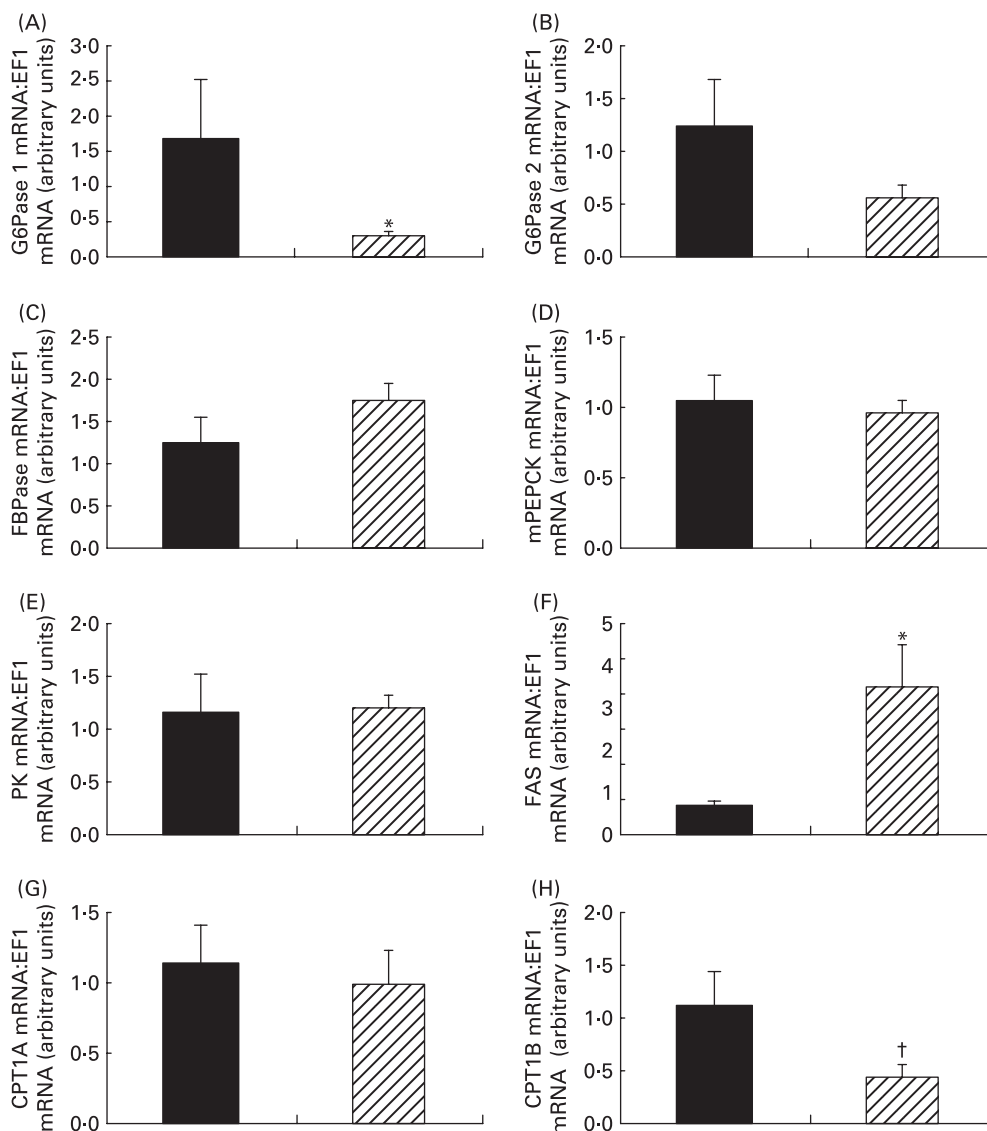


Fig. 2. Levels of expression of mRNA encoding hepatic genes in the livers of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) deprived of food for 5 d (■), refed *ad libitum* and sampled 8 h after administration of the 100 % fish meal–100 % fish oil diet (diet 0/0) (▨). Glucose 6-phosphatase isoform 1 (G6Pase-1) (A), glucose 6-phosphatase isoform 2 (G6Pase-2) (B), fructose 1,6-bisphosphatase (FBPase) (C), mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (mPEPCK) (D), pyruvate kinase (PK) (E), fatty acid synthase (FAS) (F), carnitine palmitoyltransferase 1 isoform A (CPT1A) (G) and carnitine palmitoyltransferase 1 isoform B (CPT1B) (H) mRNA levels were estimated using real-time RT-PCR. Expression values were normalised with elongation factor 1 α (EF1 α)-expressed transcripts. Results are means (n 6), with standard errors represented by vertical bars. * Mean value was significantly different from that of the fasted group ($P < 0.05$; Mann–Whitney test). † Mean value was marginally different from that of the fasted group ($P = 0.06$; Mann–Whitney test).

with fasted fish. No significant changes were noted for the other genes. GK mRNA levels are not reported in Fig. 2, since expression of GK was close to the limit of real-time PCR detection in all fish of the group.

Effects on rainbow trout of partial or total replacement of fish meal and fish oil by plant ingredients in the diet

After the 12-week growth trial, fish fed with diet 100/100 exhibited the lowest final body weight (Table 3). Fish fed with diet 50/100 displayed significantly lower final body weight in comparison with fish fed diet 0/0 whereas fish fed with diet 50/50 showed no significant difference from those fed with diet 0/0. Feed efficiency in trout fed with diet 100/100 was significantly lower than in the other three groups and feed intake significantly decreased with graded increases in the inclusion of PP and VO in diets.

Findings on postprandial plasma glucose, NEFA and TAG levels are presented in Table 3. Plasma glucose levels increased slightly between 2 and 8 h after a meal in each dietary group, and no difference in plasma glucose levels was observed between the four groups 2 or 8 h after feeding. Plasma NEFA levels showed a significant increase between 2 and 8 h only in fish fed with diet 0/0. On the other hand, there was no difference between the effects of diets 2 h after a meal, whereas 8 h after refeeding, trout fed with diet 0/0 displayed significantly higher plasma NEFA levels than those fed with diet 50/50. Moreover, there was no difference in plasma TAG levels at either sampling time between the four groups. There was only a significant increase in plasma TAG levels between 2 and 8 h in fish fed diet 50/50.

Phosphorylated forms of Akt, TOR and S6 were detected in the livers of rainbow trout re-fed with each of the four diets (Fig. 3). At 2 h after refeeding, phosphorylation levels of Akt (Ser⁴⁷³), TOR (Ser²⁴⁴⁸) and S6 (Ser^{235/236}) displayed no significant differences between the four dietary groups (Fig. 3).

Hepatic mRNA levels of G6Pase-1 and G6Pase-2, FBPase, mitochondrial PEPCK, GK, PK, CPT1A and CPT1B and FAS were estimated in each group 8 h after refeeding (Fig. 4). Fish fed with diet 50/100 displayed significant up-regulation of G6Pase-2 only compared with fish fed diet 50/50, and up-regulation of G6Pase-1 and FAS gene expression compared with fish fed the other three experimental diets. No significant difference between dietary groups was found for the other genes analysed.

Discussion

In the context of sustainable aquaculture, partial or total replacement of FM and FO by plant products has been the subject of several studies in many fish species⁽²²⁾. Nevertheless, no study has to date investigated the effects of total substitution of FM and FO by PP and VO in fish diets. The aim of the present study was thus to analyse the possible physiological and hepatic metabolic consequences of such dietary substitutions in rainbow trout.

In the present study in rainbow trout we found that up to 50 % replacement of dietary FM and FO by plant ingredients had no significant consequences on final body weight. On the other hand, total substitution of fish products by plant products led to reduced growth and feed utilisation. These results are in line with some recent studies on Atlantic salmon⁽³⁷⁾ where fish

Table 3. Growth performance and plasma parameters measured over the 12-week feeding trial (Mean values and standard deviations)

Diet...	0/0		50/50		50/100		100/100	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Zootechnical parameters (three tanks with 100 fish per tank per group)								
IBW (g)	121.7	1.5	121.5	1.4	121	3.6	121.7	3.8
FBW (g)	509.10 ^a	7.10	489.20 ^{a,b}	4.40	466 ^b	25.70	427.2 ^c	2.80
SGR†	1.93 ^a	0.03	1.88 ^b	0.01	1.82 ^c	0.03	1.70 ^d	0.03
Feed efficiency‡	1.17 ^a	0.04	1.14 ^a	0.02	1.14 ^a	0.01	1.03 ^b	0.01
Feed intake§	5.45 ^a	0.13	4.50 ^b	0.02	4.48 ^b	0.02	4.94 ^b	0.04
Plasma parameters (six fish per group) 								
Glucose (g/l)								
2 h	0.79	0.18	0.82	0.12	0.71	0.06	0.89	0.11
8 h	1.09*	0.27	1.09*	0.16	0.95*	0.22	1.39*	0.40
NEFA (g/l)								
2 h	0.18	0.06	0.15	0.03	0.19	0.07	0.22	0.07
8 h	0.27 ^{a*}	0.07	0.16 ^b	0.04	0.22 ^{a,b}	0.10	0.24 ^{a,b}	0.02
TAG (g/l)								
2 h	1.68	0.51	1.86	1.05	1.55	0.55	1.32	0.39
8 h	2.27	1.34	3.71*	1.53	2.37	1.12	2.03	0.87

Diet 0/0, fish meal and fish oil as the main protein and fat sources; diet 50/50, 50 % supply of proteins by a mixture of plant protein sources and 50 % of fish oil substituted by a mixture of vegetable oil; diet 50/100, 50 % supply of proteins by a mixture of plant protein sources and all fish oil substituted by vegetable oil; diet 100/100, total replacement of both fish meal and fish oil by plant protein and vegetable oil; IBW, initial body weight; FBW, final body weight; SGR, specific growth rate.

^{a,b,c,d} Mean values within a row with unlike superscript letters were significantly different ($P < 0.05$; ANOVA followed by Student–Newman–Keuls mean comparison and Kruskal–Wallis non-parametric test for zootechnical parameters and plasma parameters, respectively).

* Significant difference in plasma parameters between 2 and 8 h after refeeding for each experimental diet ($P < 0.05$; Mann–Whitney test).

† SGR = $100 \times ((\ln(\text{FBW}) - \ln(\text{IBW}))/\text{d})$.

‡ Feed efficiency = weight gain (g)/dry feed intake (g).

§ Feed intake = g feed intake/fish per d.

|| Plasma parameters measured 2 and 8 h after refeeding.

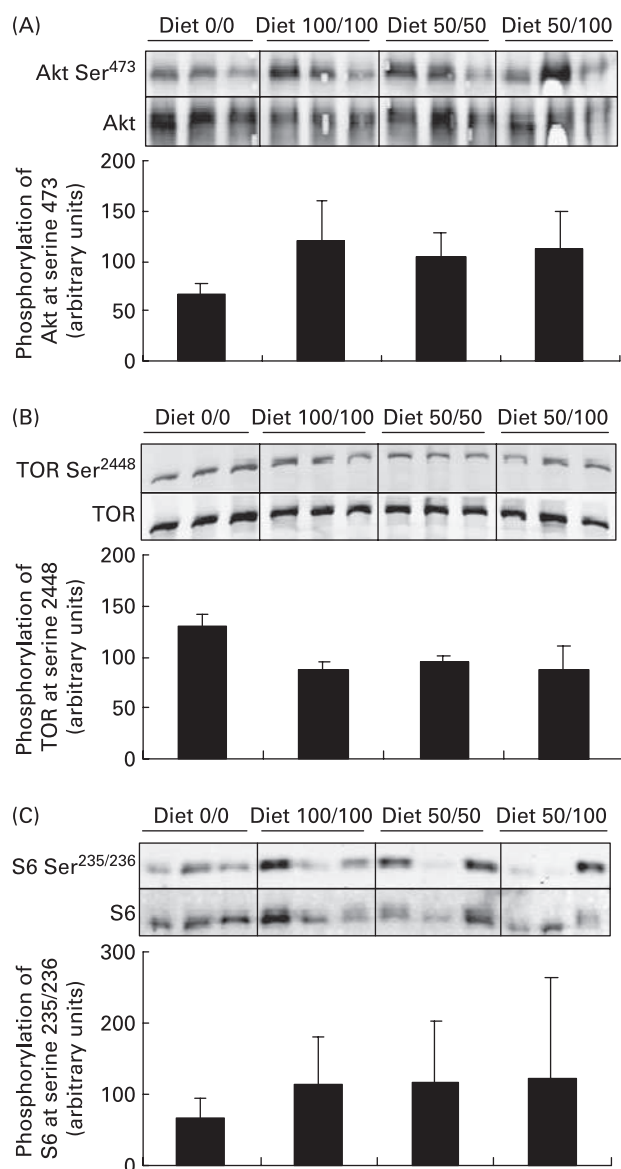


Fig. 3. Effects of diet 0/0 (100% fish meal (FM), 100% fish oil (FO)), diet 50/50 (50% FM and 50% plant protein (PP), 50% FO and 50% vegetable oil (VO)), diet 50/100 (50% FM and 50% PP, 100% VO) and diet 100/100 (100% PP, 100% VO) on phosphorylation of protein kinase B (Akt) at Ser⁴⁷³ (A), target of rapamycin (TOR) at Ser²⁴⁴⁸ (B) and S6 at Ser^{235/236} (C) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) livers, 2 h after refeeding. The gel was loaded with 20 µg of total protein per lane. Phosphorylation levels of Akt at Ser⁴⁷³, Akt, TOR at Ser²⁴⁴⁸, TOR, S6 at Ser^{235/236} and S6 were quantified and data were normalised to total amounts of Akt, TOR and S6, respectively. Western blots were performed on six individual samples and similar results were obtained; representative blots are shown. Results are means (n 6), with standard errors represented by vertical bars. Results were analysed by the Kruskal–Wallis test; there were no significant differences between the groups.

fed with 40% PP and 70% VO showed no statistically significant differences in growth whereas those fed with 80% PP and 70% VO had significantly reduced growth and final body weight. Lower growth performance seemed to be due to both reduced feed intake and lower feed efficiency, particularly with diets devoid of FM and FO. This has been previously reported in another study with rainbow trout fed a low-FM diet⁽¹⁹⁾. Such reduced growth performance is

possibly more linked to PP than to VO since total substitution of FO by VO does not have any adverse effects on growth in salmonids^(10,13,18,19,38). Given the low feed efficiency with PP, our objective was to analyse the effects of such changes on hepatic insulin–nutrient intracellular-signalling pathways as well as on the expression of genes encoding key metabolic enzymes.

We report in the present study for the first time the existence and the nutritional–hormonal regulation of the hepatic Akt–TOR-signalling pathway in the liver of a teleost, as already reported in mammals^(23,30). The present study showed that the Akt–TOR-signalling pathway was activated in the livers of refed rainbow trout whereas it was not in trout starved for 5 d, in agreement with the recent characterisation of the TOR-signalling pathway in rainbow trout muscle⁽³⁶⁾. The refeeding activation of this pathway was probably mainly related to the well-known insulin secretion and postprandial aminoacidaemia peak that occurs in refed sea bass as in refed trout^(36,39).

Characterisation of the Akt–TOR-signalling pathway in the livers of rainbow trout allowed us to investigate the effects of dietary FM and FO substitution on the regulation of this transduction pathway. Our findings suggest that replacement of FM and FO in diets had no specific effect on the activation of Akt–TOR-signalling pathways. This could be explained by the fact that, although the four diets differed in terms of ingredient sources, they were similar in terms of macronutrient composition, i.e. they were isonitrogenous, isolipidic and isoenergetic diets.

The expression of only a few genes was affected. Indeed, except for the first isoform of G6Pase, the present study confirms earlier findings showing the absence of significant postprandial inhibition of gluconeogenic gene expression in rainbow trout^(40,41). In terms of the glycolytic pathway, GK gene expression was close to the limit of detection and was not stimulated by refeeding. As previously described⁽⁴²⁾, induction of the regulation of PK, the last enzyme of glycolysis⁽³³⁾, was also absent in refed trout. These results may be due to the low levels of carbohydrates (about 10%) present in all four diets, leading to only a small increase in postprandial glycaemia (about 1 g per litre). Indeed, we have previously demonstrated that glucose is essential in the control of GK and PK gene expression in the rainbow trout liver⁽³²⁾. Lipogenesis and lipolysis are known to be under insulin control in mammals, and probably also in fish, since in rainbow trout insulin enhances FAS gene expression while it inhibits expression of CPT1, involved in lipid synthesis and oxidation, respectively⁽³²⁾. The phosphatidylinositol-3-kinase–Akt-signalling pathway mediates insulin regulation of FAS transcription in mammals⁽²⁵⁾. We demonstrated in the present study that refeeding concomitantly activated Akt and stimulated FAS gene expression, suggesting that refeeding probably induced insulin secretion, and its subsequent signalling pathway resulted in the up-regulation of FAS gene expression. Although we found that the expression of CPT1B mRNA tended to be down-regulated in the refed state ($P=0.06$), we cannot conclude that refeeding modified CPT1 gene expression in our conditions.

As for refeeding, we found no effect of FM and FO substitution on hepatic levels of mitochondrial PEPCK, FBPase, PK, CPT1A and CPT1B mRNA. We demonstrated only that total substitution of FO combined with half substitution of FM

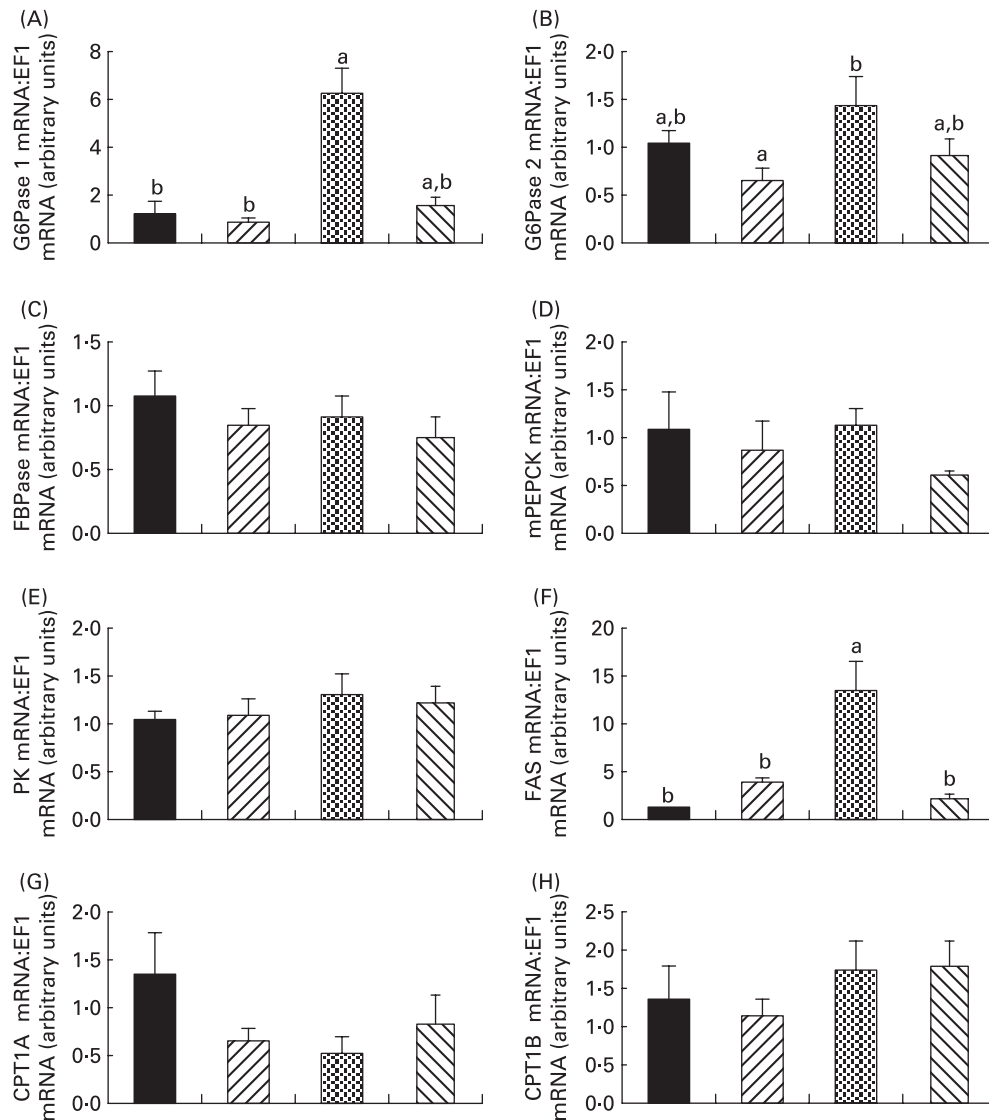


Fig. 4. Effects of diet 0/0 (100% fish meal (FM), 100% fish oil (FO)) (■), diet 50/50 (50% FM and 50% plant protein (PP), 50% FO and 50% vegetable oil (VO)) (▨), diet 50/100 (50% FM and 50% PP, 100% VO) (▩) and diet 100/100 (100% PP, 100% VO) (▪) on the levels of expression of mRNA encoding hepatic metabolism-related genes. Glucose 6-phosphatase isoform 1 (G6Pase-1) (A), glucose 6-phosphatase isoform 2 (G6Pase-2) (B), fructose 1,6-bisphosphatase (FBPase) (C), mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (mPEPCK) (D), pyruvate kinase (PK) (E), fatty acid synthase (FAS) (F), carnitine palmitoyltransferase 1 isoform A (CPT1A) (G) and carnitine palmitoyltransferase 1 isoform B (CPT1B) (H) mRNA levels were estimated using real-time RT-PCR. Expression values were normalised with elongation factor 1 α (EF1 α)-expressed transcripts. Results are means (n 6), with standard errors represented by vertical bars. ^{a,b} Mean values with unlike letters were significantly different ($P < 0.05$; Kruskal–Wallis test).

(diet 50/100) significantly increased FAS and G6Pase-1 gene expression compared with the other three groups (and also G6Pase-2 but only compared with diet 50/50). These results were somewhat surprising since we found no effect of total replacement of FM and FO (diet 100/100). It is interesting to note that both genes (G6Pase and FAS) identified as regulated by refeeding were the same as those regulated by diet composition. Although no relationship was found between higher levels of G6Pase-1 mRNA (and potentially increased endogenous glucose production) and plasma glucose level, increased FAS gene expression in fish fed with 100% PP and 50% VO may have been related to the higher levels of peri-visceral fat accumulation observed in fish fed with this diet (data not shown). Finally, compared with previous studies based on the partial replacement of FM or FO in the rainbow

trout diet, especially those analysing hepatic transcriptomes⁽¹⁹⁾, we confirmed that plant-based diets had no drastic effects on glucose or lipid metabolism at a molecular level.

In conclusion, we showed that, despite a significant decrease on growth performance of combined FM and FO substitution by plant ingredients in rainbow trout diets, hepatic metabolism-related gene expression was weakly affected. These results are in accordance with a recent complementary study showing that the same diet substitutions weakly modified hepatic transcriptomic profiles⁽⁴³⁾. Similarly, as indicated by the analysis of the Akt–TOR-signalling pathway, insulin and nutrient transduction signals were not affected by such gross dietary changes, suggesting that modifications which could explain lower growth performance in fish fed 100% plant products may occur in other metabolic processes.

Acknowledgements

We thank C. Vachot for her excellent technical assistance, and F. Terrier, Y. Hontang and F. Sandres for fish rearing in the INRA experimental farm (Donzacq, France).

The present study was supported by the European Union 6th Framework project (contract no. 016249-2, Sustainable aquafeeds to maximise the health benefits of farmed fish for consumers – AQUAMAX) and the Aquitaine Region (no. CCRRDT-20051303004AB). The AQUAMAX European project (contract no. 016249-2) also provided M. L. with a fellowship. S. Polakof was the recipient of a predoctoral fellowship from the Xunta de Galicia (Program Maria Barbeito).

M. L. was responsible for the writing of the manuscript. M. L. and I. S. generated Western blot analysis data. E. P.-J., S. Polakof and M. L. generated the quantitative RT-PCR data. I. G. was in charge of zootechnical parameter analysis. G. C., F. M. and S. K. were responsible for the design of the diets and conducted the nutritional experiments in fish. S. S.-C. and S. Panserat were responsible for project development, and drafted and corrected the manuscript. S. S.-C. is the corresponding author.

There are no conflicts of interest.

References

- Committee on Animal Nutrition, Board of Agriculture & National Research Council (1993) *Nutrient Requirement of Fish*. Washington, DC: National Academic Press.
- Sargent JR & Tacon AG (1999) Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. *Proc Nutr Soc* **58**, 377–383.
- Naylor RL, Goldburg RJ, Primavera JH, *et al.* (2000) Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* **405**, 1017–1024.
- New MB & Wijkstroem UN (2002) *Use of Fishmeal and Fish Oil in Aquafeeds. Further Thoughts on the Fishmeal Trap*. Food and Agriculture Organization Fisheries Circular no. 975. Rome: FAO.
- Gatlin DM, Barrows FT, Brown P, *et al.* (2007) Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Res* **38**, 551–579.
- Francis G, Makkar HPS & Becker K (2001) Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* **199**, 197–227.
- Bell JG, Tocher DR, Henderson RJ, *et al.* (2003) Altered fatty acid compositions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing linseed and rapeseed oils can be partially restored by a subsequent fish oil finishing diet. *J Nutr* **133**, 2793–2801.
- Glencross BD, Hawkins WE & Curnow JG (2003) Restoration of the fatty acid composition of red seabream (*Pagrus auratus*) using a fish oil finishing diet after grow-out on plant oil based diets. *Aquaculture Nutr* **9**, 409–418.
- Regost C, Arzel J, Cardinal M, *et al.* (2003) Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in turbot (*Psetta maxima*) 2. Flesh quality properties. *Aquaculture* **220**, 737–747.
- Bell JG, Henderson RJ, Tocher DR, *et al.* (2002) Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects muscle fatty acid composition and hepatic fatty acid metabolism. *J Nutr* **132**, 222–230.
- Torstensen BE, Lie O & Froyland L (2000) Lipid metabolism and tissue composition in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) – effects of capelin oil, palm oil, and oleic acid-enriched sunflower oil as dietary lipid sources. *Lipids* **35**, 653–664.
- Menoyo D, Lopez-Bote CJ, Obach A, *et al.* (2005) Effect of dietary fish oil substitution with linseed oil on the performance, tissue fatty acid profile, metabolism, and oxidative stability of Atlantic salmon. *J Anim Sci* **83**, 2853–2862.
- Kaushik SJ, Cravedi JP, Lalles JP, *et al.* (1995) Partial or total replacement of fish-meal by soybean protein on growth, protein-utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow-trout, *Oncorhynchus-mykiss*. *Aquaculture* **133**, 257–274.
- Kaushik SJ, Coves D, Dutto G, *et al.* (2004) Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* **230**, 391–404.
- Gomez-Requeni P, Mingarro M, Caldach-Giner JA, *et al.* (2004) Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotrophic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **232**, 493–510.
- Watanabe T, Aoki H, Shimamoto K, *et al.* (1998) A trial to culture yellowtail with non-fishmeal diets. *Fish Sci* **64**, 505–512.
- Watanabe T, Verakunpiriya V, Watanabe K, *et al.* (1997) Feeding of rainbow trout with non-fish meal diets. *Fish Sci* **63**, 258–266.
- Vilhelmsson OT, Martin SA, Medale F, *et al.* (2004) Dietary plant-protein substitution affects hepatic metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br J Nutr* **92**, 71–80.
- Panserat S, Kolditz C, Richard N, *et al.* (2008) Hepatic gene expression profiles in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed fishmeal or fish oil-free diets. *Br J Nutr* **100**, 953–967.
- Leaver MJ, Villeneuve LA, Obach A, *et al.* (2008) Functional genomics reveals increases in cholesterol biosynthetic genes and highly unsaturated fatty acid biosynthesis after dietary substitution of fish oil with vegetable oils in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics* **9**, 299.
- Jordal AE, Torstensen BE, Tsoi S, *et al.* (2005) Dietary rapeseed oil affects the expression of genes involved in hepatic lipid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J Nutr* **135**, 2355–2361.
- Barrows FT, Bellis D, Kroghdahl ÅS, *et al.* (2008) Report of the Plant Products in Aquafeed Strategic Planning Workshop: an integrated, interdisciplinary research roadmap for increasing utilization of plant feedstuffs in diets for carnivorous fish. *Rev Fish Sci* **16**, 449–455.
- Taniguchi CM, Emanuelli B & Kahn CR (2006) Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 85–96.
- Barthel A & Schmoll D (2003) Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**, E685–E692.
- Sul HS, Latasa MJ, Moon Y, *et al.* (2000) Regulation of the fatty acid synthase promoter by insulin. *J Nutr* **130**, 315S–320S.
- Liao J, Barthel A, Nakatani K, *et al.* (1998) Activation of protein kinase B/Akt is sufficient to repress the glucocorticoid and cAMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *J Biol Chem* **273**, 27320–27324.
- Schmoll D (2000) Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase B α and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. *Biol Chem* **275**, 36324–36333.
- Dentin R, Denechaud P-D, Benhamed F, *et al.* (2006) Hepatic gene regulation by glucose and polyunsaturated fatty acids: a role for ChREBP. *J Nutr* **136**, 1145–1149.
- Tremblay F, Lavigne C, Jacques H, *et al.* (2007) Role of dietary proteins and amino acids in the pathogenesis of insulin resistance. *Annu Rev Nutr* **27**, 293–310.

30. Wullschlegel S, Loewith R & Hall MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**, 471–484.
31. Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, *et al.* (2008) SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab* **8**, 224–236.
32. Plagnes-Juan E, Lansard M, Seiliez I, *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.
33. Towle HC, Kaytor EN & Shih H (1997) Regulation of the expression of lipogenic enzyme genes by carbohydrate. *Annu Rev Nutr* **17**, 405–433.
34. Smith S, Witkowski A & Joshi AK (2003) Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Prog Lipid Res* **42**, 289–317.
35. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, E45.
36. Seiliez I, Gabillard JC, Skiba-Cassy S, *et al.* (2008) An *in vivo* and *in vitro* assessment of TOR signaling cascade in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**, R329–R335.
37. Torstensen BE, Espe M, Sanden M, *et al.* (2008) Novel production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) protein based on combined replacement of fish meal and fish oil with plant meal and vegetable oil blends. *Aquaculture* **285**, 193–200.
38. Richard N, Kaushik S, Larroquet L, *et al.* (2006) Replacing dietary fish oil by vegetable oils has little effect on lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br J Nutr* **96**, 299–309.
39. Gutierrez J, Carrillo M, Zanuy S, *et al.* (1984) Daily rhythms of insulin and glucose levels in the plasma of sea bass *Dicentrarchus labrax* after experimental feeding. *Gen Comp Endocrinol* **55**, 393–397.
40. Panserat S, Medale F, Breque J, *et al.* (2000) Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Nutr Biochem* **11**, 22–29.
41. Panserat S, Plagnes-Juan E, Breque J, *et al.* (2001) Hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression is not repressed by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* **204**, 359–365.
42. Panserat S, Plagnes-Juan E & Kaushik S (2001) Nutritional regulation and tissue specificity of gene expression for proteins involved in hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* **204**, 2351–2360.
43. Panserat S, Hortopan GA, Plagnes-Juan E, *et al.* (2009) Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Aquaculture* **294**, 123–131.

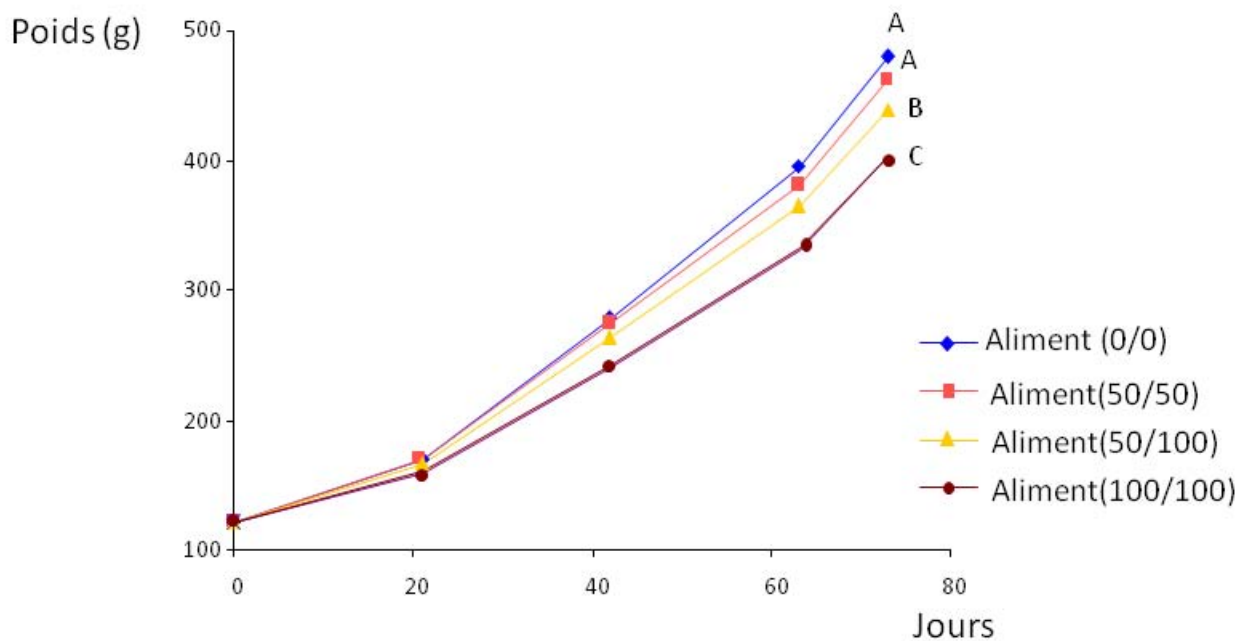


Figure 28 : Effet de l'incorporation conjointe des huiles et protéines végétales dans l'aliment pour truite sur les performances de croissance des animaux pendant 12 semaines d'alimentation.

Aliment 0/0 : contient 100% d'huiles et farines de poisson

Aliment 50/50 : contient 50% d'huile et de protéines végétales

Aliment 50/100 : contient 50% de protéines végétales et 100% d'huiles végétales

Aliment 100/100 : contient 100% d'huiles et protéines végétales

PRINCIPAUX RESULTATS ET CONCLUSIONS

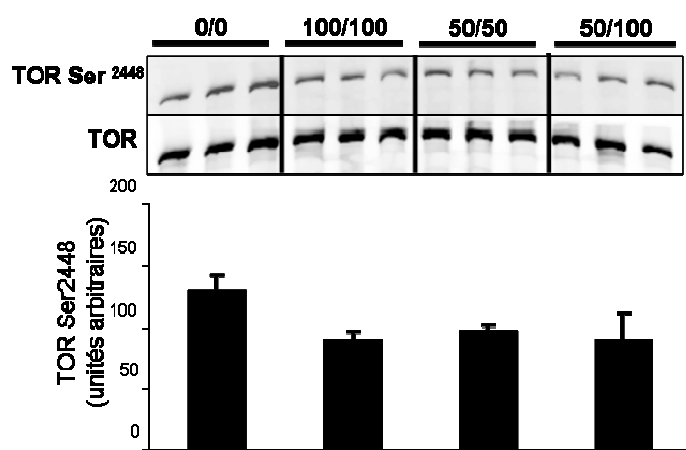
Effet d'un remplacement total ou partiel des huiles et farines de poissons par des huiles et protéines végétales dans l'aliment pour truite sur les performances de croissance et les paramètres zootechniques

Après 12 semaines d'alimentation, les poissons nourris avec l'aliment totalement substitué (100/100) présentent un poids final significativement inférieur à celui des poissons nourris avec les trois autres aliments (Figure 28). Les poissons nourris avec l'aliment semi substitué (50/50) affichent un poids non différent de ceux ayant reçu l'aliment marin standard (0/0). Enfin les poissons nourris avec le régime 50/100 (50% de protéines végétales et 100% d'huiles végétales) présentent un poids final significativement inférieur à ceux ayant été nourris avec l'aliment marin (0/0). Il semblerait que cette diminution des performances de croissance soit liée à une diminution de l'efficacité et de la prise alimentaires. Une altération de l'efficacité alimentaire pourrait coïncider avec des modifications au niveau du métabolisme. Nous avons donc étudié l'effet de tels remplacements sur les voies de signalisation Akt/TOR et l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire dans le foie de truite.

Effet sur la signalisation Akt/TOR

Cette expérience a été l'occasion de caractériser, pour la première fois *in vivo* les protéines Akt, TOR et S6 et leur régulation postprandiale dans le foie de truite. Les truites nourries depuis 12 semaines avec l'aliment marin 0/0 ont été mises à jeun pendant 5 jours puis re-nourries avec l'aliment 0/0. Deux heures après la réalimentation, nous avons observé une induction de la phosphorylation des protéines Akt (Ser473), TOR (Ser2448) et S6 (Ser 235/236) par rapport aux truites restées à jeun, sans modification des niveaux de protéines totales Akt, TOR et S6. La présence de ces trois protéines, ainsi que l'induction de leur phosphorylation 2h après la réalimentation, ont également été observés dans le foie des poissons ayant reçu chacun des trois aliments partiellement ou totalement substitués par des produits végétaux. Cependant, deux heures après le repas, aucune différence significative du taux de protéines phosphorylées n'a été constatée entre les quatre groupes (Figure 29A).

A



B

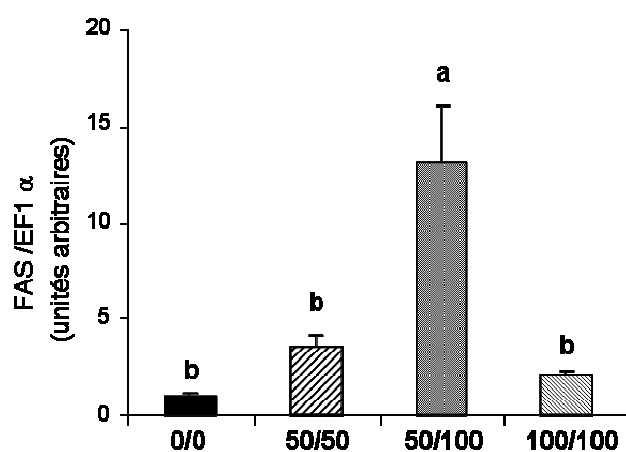


Figure 29 : Effet du remplacement conjoint, partiel ou total, de l'huile et de la farine de poisson par des matières premières d'origine végétale dans l'aliment pour truite sur A) la phosphorylation de la protéine TOR, B) l'expression du gène FAS.

Exemples tirés des Figures 3 et 4 de l'article 3, représentatifs de l'absence d'effet de l'incorporation de végétaux sur les voies de signalisation et l'expression des gènes.

- Comme ce qui est décrit chez d'autres espèces mammifères ou chez les oiseaux, les protéines des voies Akt/TOR existent et sont phosphorylées après un repas, chez la truite arc-en-ciel. La substitution conjointe, partielle ou totale, des huiles et farines de poissons par des huiles et protéines végétales n'affecte pas la régulation de ces voies de signalisation.

Effet d'un remplacement total ou partiel des huiles et farines de poissons par des huiles et protéines végétales dans l'aliment pour truite sur l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire.

D'autres poissons ont également été sacrifiés 8h après réalimentation afin d'étudier la régulation postprandiale et l'effet du remplacement des matières premières sur l'expression de certains gènes du métabolisme hépatique. Ainsi, 8h après leur réalimentation, les poissons nourris avec l'aliment marin 0/0 présentent une diminution significative de l'expression du gène codant pour l'isoforme 1 de la G6Pase (G6Pase1) et une augmentation de celle du gène FAS comparée à des animaux à jeun depuis 5 jours. La réalimentation n'induit en revanche pas de changement significatif de l'expression des gènes G6Pase2, FBPase, mPEPCK, PK, CPT1a et CPT1b 8h après le repas. Par ailleurs, les poissons nourris avec l'aliment 50/100 (50% de protéines végétales et 100% d'huiles végétales) présentent une expression du gène codant pour la G6Pase2 significativement supérieure à celle mesurée dans le foie des poissons nourris avec l'aliment semi-substitué 50/50. De plus, ce même aliment 50/100 induit une augmentation significative de l'expression des gènes G6Pase 1 et FAS comparée aux trois autres régimes. Concernant les autres gènes étudiés, aucune différence significative n'a été constatée entre les quatre groupes (Figure 29B).

- L'expression des gènes du métabolisme intermédiaire est peu régulée aussi bien par le statut nutritionnel (à jeun/nourris) que par la composition de l'aliment. Il est cependant à noter que les deux gènes G6Pase 1 et FAS, dont l'expression est régulée par la réalimentation, sont également les deux seuls gènes dont l'expression est affectée par la nature de l'aliment (aliment 50/100). Enfin, chez des truites nourries pendant 12 semaines avec les mêmes aliments et n'ayant pas subi de jeûne et de réalimentation, il a également été constaté une surexpression du gène FAS uniquement avec l'aliment 50/100 (Corraze, communication personnelle) confortant ainsi nos données.

En conclusion, nous avons démontré dans cette étude que la diminution des performances de croissance des poissons observée lors de la substitution des matières premières halieutiques par des produits végétaux n'est pas associée à des modifications des voies de signalisation Akt/TOR et de l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire dans le foie. Une approche transcriptomique réalisée au laboratoire sur ces mêmes poissons suggère également un faible effet d'une substitution totale sur le profil d'expression des gènes hépatiques (Panserat et al. 2009) (Article en annexe).

DISCUSSION GENERALE

Ce travail de thèse avait pour objectif de déterminer le rôle des acides aminés dans la régulation de l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire dans le foie de truite arc-en-ciel. Afin d'appréhender cette question, nous avons choisi d'utiliser des hépatocytes en culture primaire pour être en conditions contrôlées et ainsi pouvoir séparer clairement les effets de chaque facteur étudié, à savoir les acides aminés et l'insuline. Nous avons donc analysé, dans un premier temps, l'effet séparé puis conjoint de l'insuline et des acides aminés sur les voies de signalisation Akt/TOR ainsi que sur l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la néoglucogenèse, la glycolyse, la lipogenèse et le métabolisme des acides aminés. Après avoir constaté un effet significatif des acides aminés, en présence ou absence d'insuline, nous avons étudié l'effet de certains acides aminés en particulier afin d'observer s'ils pouvaient mimer l'effet d'un mélange d'acides aminés sur la régulation du métabolisme hépatique. Nous nous sommes donc intéressés à l'effet de la leucine, acide aminé à chaîne ramifiée, connue pour être une molécule « signale » chez les mammifères qui stimule la synthèse protéique *via* la voie de signalisation mTOR (Crozier et al. 2005; Kimball et al. 2006b; Proud 2004; Stipanuk 2007). Nous avons également étudié l'effet de la lysine et de la méthionine, deux acides aminés connus pour être limitant et souvent ajoutés dans les aliments pour poisson à base de végétaux (Cheng et al. 2003; Davies et al. 1997; NRC 1993). Enfin, dans le cadre du projet européen AQUAMAX, nous avons étudié l'effet de la substitution conjointe partielle ou totale des huiles et farines de poisson par des protéines et huiles végétales sur le métabolisme intermédiaire dans le foie de truite arc-en-ciel. En effet, cette substitution pourrait entraîner une modification de la disponibilité en nutriments et plus particulièrement en acides aminés. Nos études *in vitro* ayant montré un effet important et complexe des acides aminés (résultant probablement des différents effets produits par divers acides aminés) sur la régulation de l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire, il était intéressant d'analyser si l'incorporation de matières premières d'origine végétale pouvait avoir un impact sur le métabolisme hépatique chez la truite.

I. Effets de l'insuline et/ou des acides aminés sur la régulation de l'expression des gènes du métabolisme hépatique *in vitro*

I.1.Effet de l'insuline

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de l'insuline dans notre modèle cellulaire. En effet, alors que les effets transcriptionnels de l'insuline étaient bien décrits chez les mammifères, très peu de données étaient disponibles chez les poissons et encore moins chez la truite. Ainsi, les travaux réalisés au cours de ma thèse ont permis de démontrer que

l'effet de l'insuline sur l'expression des gènes du métabolisme dans les hépatocytes de truite correspond globalement à ce qui est décrit chez les mammifères (Barthel et al. 2003; Fougère et al. 2002; Griffin et al. 2004; Pilkis et al. 1992) et *in vivo* chez la truite (Plagnes-Juan et al. 2008; Polakof et al. 2010), soit une inhibition de l'expression des gènes de la néoglucogénèse et une activation des gènes de la lipogénèse et de la glycolyse (exception faite de la GK). En effet, alors que chez les mammifères, l'expression de la GK est induite par l'insuline (Printz et al. 1993), elle est, de façon surprenante, fortement inhibée dans notre modèle cellulaire. Ce résultat vient d'être confirmé *in vivo* au laboratoire par injection intrapéritonéale d'une dose physiologique d'insuline (1.4 IU/kg) (Polakof et al. 2010). En revanche, l'activité et l'expression de la GK augmentent de façon importante en présence de glucides alimentaires indépendamment des taux d'insuline plasmatique qui s'élèvent que le repas contienne ou non des glucides (Capilla et al. 2003; Panerai et al. 2000b). Il semble donc que, chez les poissons, l'insuline soit nécessaire mais pas suffisante pour induire l'expression de la GK. Elle serait en revanche davantage contrôlée par les glucides, ce qui constituerait une originalité du contrôle de la GK chez la truite car une telle régulation n'a jamais été mise en évidence chez les espèces mammifères.

Les résultats obtenus en culture primaire d'hépatocytes de truite confirment l'efficacité de l'insuline à induire sa voie de signalisation et à réguler l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire. L'absence d'inhibition postprandiale de l'expression des gènes de la néoglucogénèse observée dans le foie de truite semble donc indépendante d'un problème de fonctionnalité de l'insuline. Ainsi, les particularités métaboliques de la truite concernant sa faible capacité à utiliser les glucides pourraient être liées à d'autres facteurs et notamment la présence en quantité importante d'acides aminés dans son alimentation.

I.2. Effet des acides aminés

Chez les procaryotes et les eucaryotes inférieurs, la régulation de l'expression des gènes par les acides aminés a été largement étudiée chez la levure. Dans cet organisme, les voies de signalisation TOR et GCN2 se comportent comme des senseurs de la concentration intracellulaire d'acides aminés et la privation d'un seul acide aminé stimule l'expression de tout un groupe de gènes (Forsberg et al. 2001; Hinnebusch 1988; Iraqui et al. 1999). Au début de mon travail de thèse, le rôle des acides aminés sur la régulation de l'expression des gènes des mammifères était beaucoup moins connu et globalement limité au contrôle de la transcription des gènes codant pour l'asparagine synthase et la protéine Chop (CCAAT/enhancer binding protein homologous protein) (Jousse et al.).

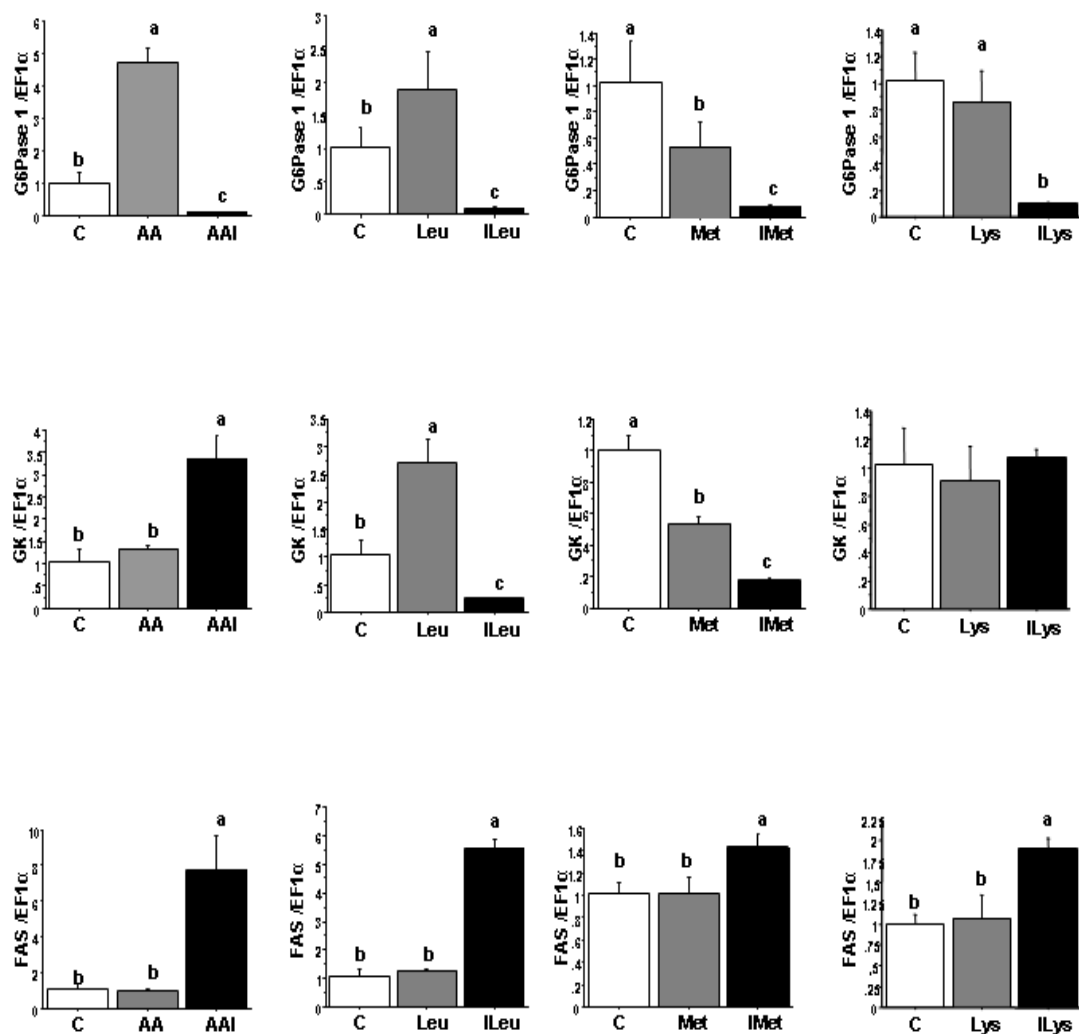


Figure 30 : Effet d'un mélange d'acides aminés (AA), de la leucine (Leu), de la méthionine (Met) et de la lysine (Lys), en présence ou absence d'insuline (I), sur l'expression des gènes G6Pase, GK et FAS.

La régulation transcriptionnelle de ces gènes par les acides aminés fait intervenir la voie de signalisation GCN2, activée par l'accumulation d'ARN de transfert libres c'est-à-dire non associés à un acide aminé. Les études sur la régulation de l'expression des gènes par les acides aminés s'étaient donc concentrées sur l'effet d'une privation en acides aminés et, à notre connaissance, aucune étude ne s'était intéressée aux effets d'un apport en acides aminés sur l'expression des gènes. L'originalité de ce travail a donc été d'étudier dans le foie l'effet des acides aminés sur la régulation de l'expression des gènes insulino-dépendants impliqués dans le métabolisme glucido-lipidique.

Les résultats obtenus en culture primaire d'hépatocytes de truite montrent qu'un mélange d'acides aminés peut contrôler les niveaux d'ARNm codant pour différentes enzymes du métabolisme hépatique. Ainsi, un mélange d'acides aminés induit de façon dose-dépendante l'expression de la plupart des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose, avec un effet plus important sur la néoglucogénèse que sur la glycolyse. En revanche, aucun effet des acides aminés n'a été observé sur les acteurs lipogéniques. Nous avons aussi montré que les effets de la leucine, à la différence de la méthionine et de la lysine reflètent dans l'ensemble ceux obtenus avec un mélange d'acides aminés sur l'expression des gènes néoglucogéniques et lipogéniques mais pas glycolytiques. Cependant, des effets spécifiques sur certains gènes ont été observés pour chacun des trois acides aminés testés (Figure 30). A notre connaissance, ces données montrant l'effet des acides aminés seuls (sans insuline, glucagon par exemple) sont originales.

I.3. Effet combiné de l'insuline et des acides aminés

Partant de notre hypothèse d'une potentielle interaction entre acides aminés et insuline, nous nous sommes intéressés à l'effet combiné de ces deux facteurs sur la régulation de l'expression des gènes du métabolisme. Lorsque l'on combine les acides aminés avec de l'insuline, le mélange d'acides aminés contrecarre l'effet inhibiteur de l'insuline dans les cas des gènes néoglucogéniques alors qu'il le potentialise pour les acteurs glycolytiques et lipogéniques. L'effet conjoint de l'insuline et des acides aminés versus acides aminés seuls confirme ce qui avait déjà été observé (indirectement) au cours d'une étude à laquelle j'ai participé au début de ma thèse (Plagnes-Juan et al. 2008) (article en annexe).

En présence d'insuline, la leucine mime l'effet d'un mélange d'acides aminés excepté pour la glycolyse dont l'expression des gènes n'est pas activée. D'autre part, l'effet de l'insuline semble être prépondérant sur l'effet méthionine ou lysine seule (Figure 30). Des données récentes, réalisées *in vivo* dans le foie de rat et *in vitro* sur lignée cellulaire HepG2, ont

suggéré un effet inducteur des acides aminés à chaîne ramifiée en présence de glucose sur les acteurs lipogéniques (Srebp1c et FAS) et glycolytiques (GK), correspondant à ce que nous avons observé dans notre modèle stimulé par un mélange d'acides aminés en présence d'insuline (Higuchi et al. 2010, in press).

En conclusion, ces données montrent que l'expression des gènes du métabolisme non protéique (glucido-lipidique) est non seulement régulée par l'insuline mais également par les acides aminés. L'insuline et les acides aminés présentent parfois des effets inverses comme pour les gènes de la néoglucogenèse ou coopératifs comme pour les gènes de la glycolyse et de la lipogenèse.

II) Quelles sont les voies de signalisation impliquées dans l'effet des acides aminés en présence ou absence d'insuline : implication de la voie TOR ?

L'effet des acides aminés sur l'expression des gènes du métabolisme hépatique ayant été montré, nous nous sommes alors intéressés aux voies de signalisation pouvant être impliquées dans ces régulations.

Ainsi, nos données ont montré que les acides aminés seuls (mélange, leucine, méthionine ou lysine) n'activaient pas la voie de signalisation TOR/S6K/S6. L'effet des acides aminés seuls sur l'expression des gènes du métabolisme semble donc être véhiculé par une voie indépendante de TOR. On pourrait ainsi supposer que l'effet des acides aminés puisse être véhiculé *via* une inhibition de la voie GCN2. En effet, c'est ce que suggère l'effet inhibiteur des acides aminés sur l'expression du gène AS, connu pour être régulé par l'activation de GCN2 lors d'un déficit en acides aminés. Cependant cette hypothèse semble finalement peu probable car i) la régulation de l'expression de ce gène a été récemment décrite comme étant partiellement indépendante de la voie GCN2 (Deval et al. 2009) et ii) il a récemment été démontré dans des hépatocytes de rat que la déphosphorylation de GCN2 nécessite la présence conjointe d'un fort taux d'acides aminés mais également d'insuline (Chotechuan et al. 2009). L'implication de l'AMPK, dont la phosphorylation semble être inhibée par les acides aminés (Chotechuan et al. 2009), représente également une piste à explorer. Ainsi, la voie par laquelle passe l'effet des acides aminés seuls reste à déterminer. Enfin, le fait que la régulation de l'expression des gènes du métabolisme soit différente selon le type d'acides aminés suggère l'existence de plusieurs voies de régulations.

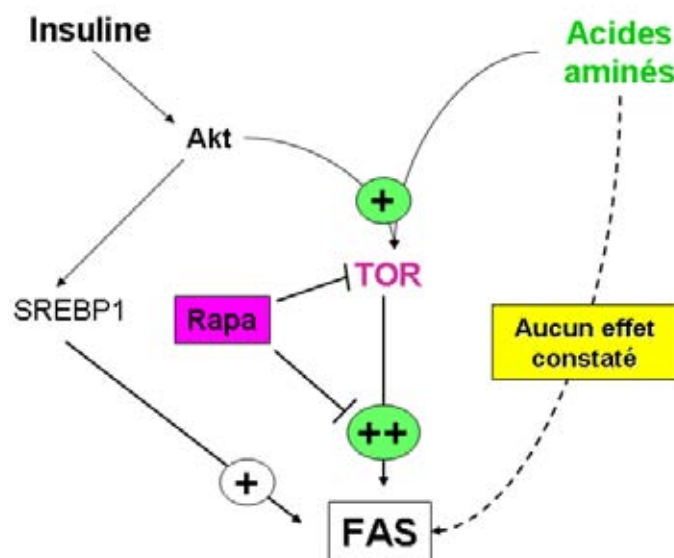
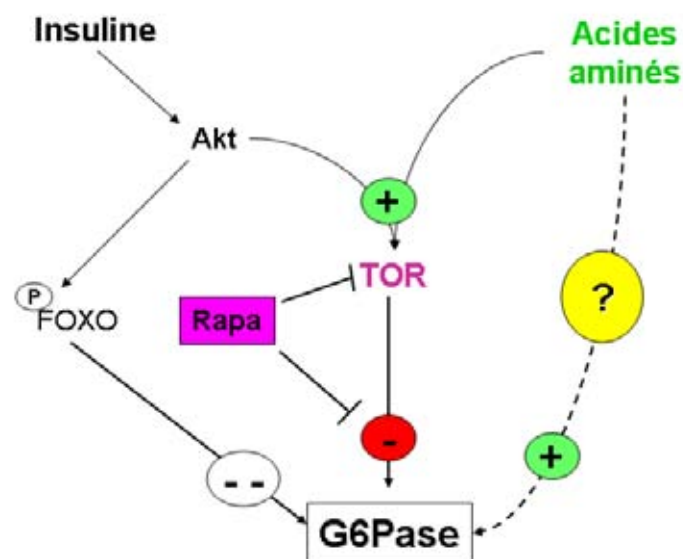


Figure 31 : Hypothèse de régulation de l'expression des gènes glucose-6-phosphatase (G6Pase) et fatty acid synthase (FAS) par l'insuline et les acides aminés dans les hépatocytes de truite arc-en-ciel.

Par ailleurs, nous avons démontré l'aspect indispensable de l'association entre insuline et acides aminés (mélange ou leucine) pour activer la voie de signalisation TOR dans les hépatocytes de truite, correspondant à ce qui a été décrit dans des cellules hépatiques de rat (Chotechuang et al. 2009; Patti et al. 1998). D'après des études récentes portant sur l'implication des protéines Rag dans l'activation de mTORC1, ces résultats semblent être « logiques ». En effet, l'activation du TORC1 nécessite que le complexe soit relocalisé par les acides aminés (par un mécanisme non encore élucidé) au niveau des compartiments endosomaux où les protéines Rag lui servent alors de point d'encrage (Sancak et al. 2010). C'est ainsi qu'il peut être activé par Rheb, lui-même activé en présence d'insuline *via* la voie PI3K/Akt. La présence conjointe d'insuline et d'acides aminés est donc indispensable à l'activation du complexe TORC1, chez les mammifères comme dans les hépatocytes de truite.

Finalement, l'utilisation de la rapamycine, molécule inhibitrice de la protéine TOR, a permis de mettre en évidence l'implication de la voie TOR dans la régulation de la plupart des gènes du métabolisme intermédiaire étudiés. En effet, l'effet combiné de l'insuline et des acides aminés sur les gènes impliqués dans la lipogenèse, la glycolyse et la néoglucogenèse est abolie en présence de rapamycine, démontrant que cet effet combiné est dépendant de la voie TOR. Nos données confirment ainsi l'implication du complexe TOR dans le contrôle de l'expression des gènes FAS et ACLY, cibles du facteur de transcription SREBP1, comme ce qui a été décrit chez les mammifères au cours de ma thèse (Porstmann et al. 2008). De plus, notre résultat montrant que l'expression de SREBP1 est également régulée *via* la voie TOR a récemment été confirmé dans des hépatocytes de rats (Li et al. 2009). L'originalité de notre travail a donc été d'élargir l'implication de la voie TOR dans le contrôle de l'expression d'autres gènes liés au métabolisme glucidique.

En conclusion, l'hépatocyte est un carrefour métabolique qui intègre de multiples signaux générés d'une part par les nutriments (acides aminés, glucose et acides gras) et d'autre part par les hormones (insuline, glucagon etc...) afin de réguler l'expression des gènes du métabolisme. Ainsi, d'après nos résultats, il semblerait que dans les hépatocytes de truite, l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire soit contrôlée à la fois par i) l'insuline *via* la voie PI3K/Akt/ et différents facteurs de transcription, ii) les acides aminés *via* des voies non encore élucidées et iii) la combinaison de l'insuline et des acides aminés dont l'effet serait en partie véhiculé par la voie de signalisation TOR. Cette hypothèse est illustrée par deux exemples montrant une régulation possible de l'expression des gènes G6Pase et FAS (Figure 31). Ainsi, pour l'expression du gène G6Pase, en présence d'insuline et d'acides aminés dans le

milieu, il y aurait : un effet inhibiteur de l'insuline seule par la voie Akt/FoxO, un effet activateur des acides aminés et un effet également inhibiteur lié à l'activation de TOR. L'effet activateur des acides aminés seuls serait prépondérant par rapport à l'effet inhibiteur de l'insuline seule. En effet, lorsque, en présence d'insuline et d'acides aminés dans le milieu, on supprime l'effet inhibiteur véhiculé par TOR, l'expression du gène G6Pase retrouve sensiblement le même niveau d'expression que celui induit par les acides aminés en absence d'insuline dans le milieu. La régulation de l'expression du gène FAS semble moins complexe avec une absence d'effet des acides aminés seuls, un effet activateur de l'insuline *via* Akt/SREBP et un effet activateur beaucoup plus important lié à l'activation de TOR.

III. Implication de nos travaux *in vitro* dans la nutrition protéique

III.1. Retour sur l'Hypothèse de travail

Différentes études suggèrent un rôle des protéines alimentaires sur l'apparition et le maintien de l'insulino-résistance chez les mammifères (Tremblay et al. 2007b; Um et al. 2006; Um et al. 2004). En effet, comme décrit précédemment, la sur-activation de la voie TOR/S6K1 liée à un excès en acides aminés, induirait un rétrocontrôle négatif des protéines TOR et S6K1 sur les éléments précoces de la voie de signalisation de l'insuline. (Patti et al. 1998; Tremblay et al. 2001a). Ce rétrocontrôle s'effectue au niveau d'IRS-1 par l'intermédiaire de phosphorylations sur différents résidus sérine provoquant la séparation physique d'IRS-1 et du récepteur de l'insuline et le blocage de la propagation du signal insulinique (Carlson et al. 2004; Tremblay et al. 2005a; Tremblay et al. 2005b). Ces données nous ont amené à poser l'hypothèse, en début de thèse, que **la forte proportion d'acides aminés alimentaires plasmatiques au niveau postprandial pourrait interagir (négativement) avec l'insuline et perturber ses effets sur la régulation de l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire (métabolisme gluco-lipidique en particulier) dans le foie**. Cette hypothèse était d'ailleurs encouragée par la restauration de l'inhibition de l'expression des gènes néoglucogéniques en phase post-prandiale lorsque que pour des proportions équivalentes de glucides dans l'alimentation on diminuait significativement le taux de protéines (Kirchner et al. 2003b).

Contrairement à cette hypothèse, *in vitro*, nous avons observé un effet synergique activateur de l'insuline et des acides aminés sur l'expression des gènes de la glycolyse et de la lipogenèse. Cependant, concernant la néoglucogénèse, l'effet activateur des acides aminés s'oppose à l'effet inhibiteur de l'insuline. En effet, en présence d'insuline et d'acides aminés on observe une activation des gènes FBPase et mPEPCK et une inhibition moins importante

de G6Pase comparé à l'effet de l'insuline seule. De tels résultats pourraient expliquer les données obtenues précédemment, *in vivo*, montrant une absence d'inhibition postprandiale de ces gènes dans le foie de truites nourries avec un fort taux de glucides (Panserat et al. 2001a; Panserat et al. 2000c; Panserat et al. 2001b; Tranulis et al. 1996). Ces résultats sont également concordant avec la restauration de cette inhibition observée lorsque l'on diminue significativement le taux de protéines alimentaires (Kirchner et al. 2003b).

D'autre part, nous n'avons pas pu tester la présence d'un rétrocontrôle négatif sur IRS1 induit par les acides aminés *via* la sur-activation de la voie TOR/S6K1 car les tests préliminaires réalisés au laboratoire avec des anticorps commerciaux dirigés contre IRS1 n'ont pour le moment pas permis d'obtenir des résultats interprétables (Skiba-Cassy, communication personnelle).

III.2. Nutrition protéique : comparaison truite vs rat

Il est intéressant de noter qu'un régime standard pour la truite contient 30% de protéines (soit 30g pour 100g d'aliment) alors que pour le rat le taux standard de protéines dans l'aliment est de 15% (Blouet et al. 2006). La truite est donc un modèle original pour la nutrition protéique. Nos travaux ont montré que les acides aminés jouent un rôle dans la régulation de l'expression des gènes du métabolisme hépatique suggérant ainsi que ces nutriments peuvent avoir un impact fort sur le contrôle du métabolisme non seulement protéique mais également glucido-lipidique chez cet animal naturellement nourri avec un fort taux d'acides aminés alimentaires.

Cependant, ces données peuvent aussi être intéressantes dans le domaine de la nutrition du rat ou de l'homme. En effet, un rôle potentiel des acides aminés sur l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire a également été suggéré *in vivo* chez le rat nourris avec un régime hyperprotéique. Ainsi, dans le foie de rat, il existe une inhibition postprandiale de l'expression du gène G6Pase chez des animaux nourris avec un taux normal (14%) ou élevé (53%) en protéines. En revanche, cette même étude démontre que l'expression du gène PEPCK est également inhibée après un repas à teneur normale en protéines, mais pas chez des rats nourris avec un régime à teneur élevée en protéines (Azzout-Marniche et al. 2007). Ces données suggèrent un effet du taux de protéines sur la formation de glycogène à partir de précurseurs néoglucogéniques confortant ainsi nos résultats sur l'existence d'un effet des acides aminés sur le métabolisme glucidique dans le foie.

Par ailleurs, l'activation de l'expression des gènes FAS et SREBP1c, en présence d'insuline et d'acides aminés dans des hépatocytes de truite semble contradictoire avec ce qui est décrit *in vivo* chez les mammifères. En effet, on observe une expression hépatique des gènes FAS et SREBP1c significativement plus faible chez des rats nourris avec un fort taux de protéines comparés à ceux recevant un aliment à teneur normale en protéines (Blouet et al. 2006). Nos résultats obtenus *in vitro* ont été récemment corroborés par une étude *in vivo* chez la truite. L'expression des gènes FAS et de SREBP1c est induite de façon postprandiale uniquement dans le foie de truites nourries avec un fort taux de protéines (65%) mais pas chez des truites recevant des aliments contenant 36% et 17% de protéines (Seiliez et al., communication personnelle). **Nous avons donc clairement une régulation par les protéines de la lipogenèse opposée entre les deux espèces truite et rat.**

IV. Intérêts de nos résultats pour la nutrition des poissons en aquaculture

IV.1. Implications de ces travaux dans le développement de nouveaux aliments piscicoles.

Nos résultats ont mis en évidence *in vitro* que les acides aminés peuvent réguler l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans le métabolisme intermédiaire (cf articles 1 et 2). Ces actions sont dépendantes de la quantité d'acides aminés (article 1) mais aussi du type d'acides aminés, en particulier pour les acides aminés essentiels présents en quantité limitante dans les matières premières végétales (méthionine et lysine) (article 2). Or, lors des changements de matières premières (farine de poisson versus protéines végétales), il est probable que la disponibilité postprandiale en acides aminés plasmatiques soit modifiée. Cela peut être dû au profil spécifique en acides aminés des différents types de protéines retrouvés majoritairement dans chaque matière première. Mais aussi certaines matières premières sont plus ou moins facilement digérées ce qui change alors la cinétique d'apparition des acides aminés dans le plasma. Enfin les acides aminés rajoutés sous forme cristalline dans les aliments à base de végétaux (comme la méthionine et lysine) n'ont pas besoin d'être digérés et sont donc théoriquement absorbés plus rapidement. C'est donc dans ce contexte que nous avons étudié, pour la première fois *in vivo* chez les poissons, l'impact de la substitution conjointe et graduelle des farine et huile de poisson par des produits végétaux sur la voie de signalisation Akt-TOR et l'expression des gènes du métabolisme glucidique, lipidique et énergétique dans le foie de truite (cf article 3). Nous avons observé un effet significatif et négatif de cette substitution sur les performances de croissance (en particulier avec l'aliment totalement substitué). Ce résultat était attendu dans la mesure où des études précédentes portant sur le seul remplacement des farines de poisson avaient

déjà démontré qu'il n'était pas possible de remplacer cette matière première au-delà d'un certain seuil sans affecter la croissance (Gatlin et al. 2007; Kaushik et al. 2004; Watanabe et al. 1998; Watanabe et al. 1997). Nous n'avons toutefois pas pu démontrer de corrélations entre une diminution de la croissance et des modifications du métabolisme hépatique (signalisation, expression des gènes). Il serait toutefois intéressant de faire ce même type d'étude avec des aliments dont la proportion en protéines totales serait différente car nos données ne sont représentatives que d'un aliment à 45% de protéines.

Nos résultats sont pour le moment trop préliminaires pour aider les producteurs dans la formulation des aliments. Par contre, nos données suggèrent fortement que les acides aminés peuvent impacter le métabolisme nutritionnel dans différents domaines. Il faudra ainsi tenir compte dans les nouveaux aliments (dans lesquels les sources protéiques pourront encore varier, exemple : algues, protéines de levures...) (Naylor et al. 2009) de la composition/disponibilité en acides aminés spécifiques afin d'aboutir à un aliment dans lequel les acides aminés s'orientent préférentiellement vers l'accrétion protéique. Il est aussi a priori important maintenant de garder en mémoire que les taux et qualités d'acides aminés dans les aliments peuvent avoir un effet, via leur action sur les métabolismes non protéiques (lipidiques, glucidiques et énergétiques), sur l'utilisation des autres macronutriments.

VI.2.Existe-t-il un polymorphisme de la régulation par les acides aminés via la voie Akt-TOR du métabolisme intermédiaire chez la truite ?

Le caractère récent de la mise en élevage de la truite (comme la plupart des autres poissons d'élevage) implique l'existence d'une variabilité génétique non négligeable des caractères zootechniques (croissance, résistance aux maladies etc...) (Vandeputte et al. 2004). Dans le domaine de la nutrition des poissons, la sélection génétique a été principalement réalisée sur des critères tels que la performance de croissance, la prise alimentaire ou encore la qualité de la chair. En effet, récemment grâce à une sélection génétique basée sur l'indice d'adiposité musculaire, deux lignées expérimentales de truites ont été caractérisées. Ainsi, la lignée dite « grasse » (FL, fat muscle line) possède un taux plus élevé de lipides dans le muscle que la lignée dite « maigre » (LL, lean muscle ligne) (Quillet et al. 2005). Cependant, le processus de sélection s'accompagne de modifications d'un grand nombre de caractères, mais dont les mécanismes génétiques ne sont pas toujours maîtrisés. En effet, lors de la caractérisation métabolique de ces deux lignées, il a été suggéré des différences dans l'utilisation des sources énergétiques (Kolditz et al. 2008a; Kolditz et al. 2008b; Skiba-Cassy et al. 2009). J'ai ainsi participé à une étude dont l'objectif était d'analyser l'effet de la sélection génétique sur la teneur en lipides du muscle sur la régulation des voies de

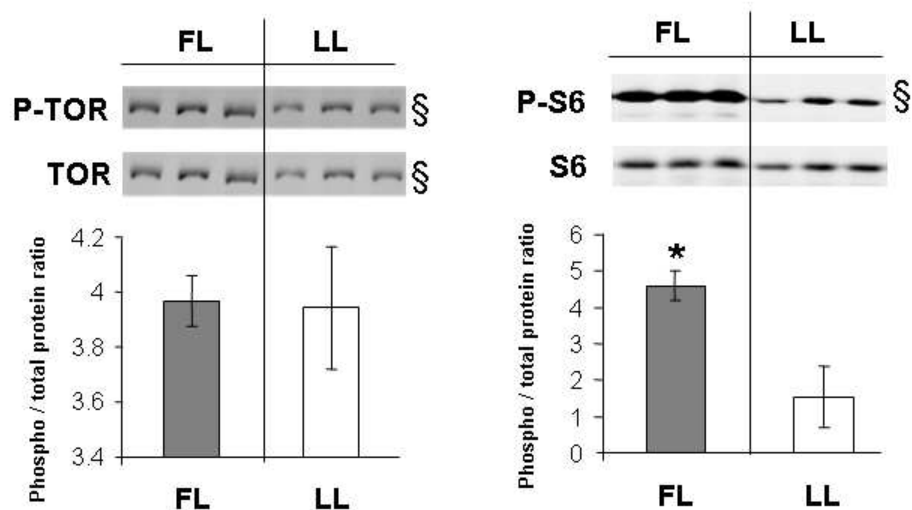


Figure 32 : Effet d'une sélection divergente sur la teneur en lipides du muscle sur la phosphorylation des protéines TOR et S6 dans le foie de truite re-nourries.

*Différence significative ($p < 0,05$) pour le rapport protéines phosphorylées/protéines totales entre la lignée grasse (FL) et la lignée maigre (LL). §Différence significative ($p < 0,05$) pour les protéines phosphorylées ou les protéines totales entre la lignée grasse (FL) et la lignée maigre (LL). Figure extraite de l'article (Skiba-Cassy et al. 2009), présenté en annexe)

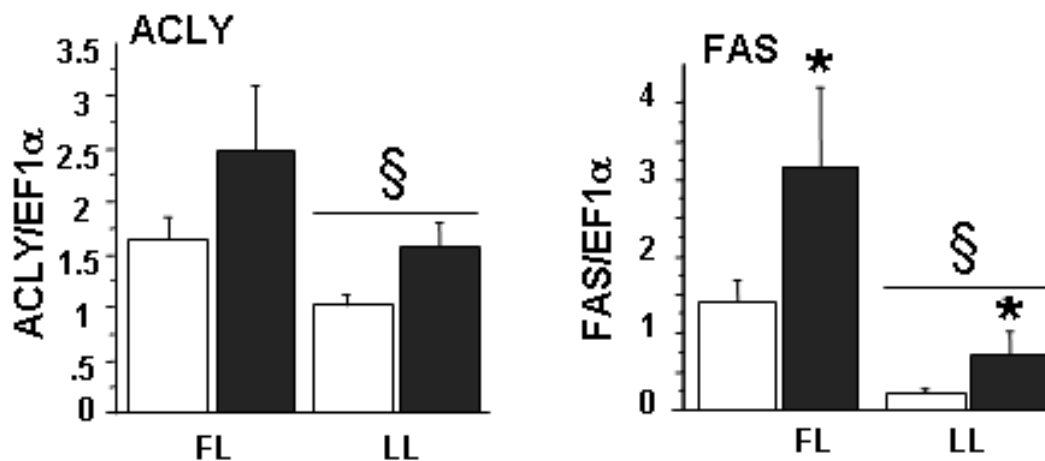


Figure 33 : Effet d'une sélection divergente sur la teneur en lipides du muscle sur l'expression des gènes ACLY et FAS dans le foie de truite à jeun (□) ou re-nourries (■).

*Différence significative ($p < 0,05$) entre des poissons à jeun et re-nourris. §Différence significative ($p < 0,05$) entre la lignée grasse (FL) et la lignée maigre (LL)

signalisation insuline/acides aminés et de l'expression des gènes du métabolisme dans le foie (article Skiba et al. (2009) en annexe).

Nous avons ainsi pu mettre en évidence que chez les truites re-nourries, bien que les quantités de protéines totales et phosphorylées Akt ne varient pas entre les deux lignées, celles de la protéine TOR sont plus importantes dans le foie de truite de la lignée « grasse » (Figure 32). Il est à noter que le rapport de protéines TOR (protéines TOR phosphorylées/protéines TOR totales) est le même entre les deux lignées. Cette quantité plus importante de TOR chez la lignée « grasse » induit une phosphorylation de la protéine S6 plus élevée (Figure 32). De plus, ces données sont associées à une expression plus forte des gènes codant pour les enzymes de la lipogenèse FAS, ACLY et SD chez la lignée « grasse » (Figure 33).

Avec nos données *in vitro* montrant un lien entre l'activité de la voie TOR et l'induction moléculaire des acteurs de la lipogenèse, cette étude conforte l'existence d'un lien entre TOR et la lipogenèse dans le foie de truite. D'autre part, la lignée « grasse » a été décrite comme ayant des activités des enzymes glycolytiques plus élevées dans le muscle (Kolditz et al. 2008a) suggérant que cette lignée aux capacités lipogéniques plus importantes puisse utiliser plus efficacement le glucose alimentaire. La sélection génétique ayant eu comme corollaire de modifier le taux de protéines TOR, il serait aussi intéressant de regarder l'effet d'une telle sélection sur l'utilisation des acides aminés alimentaires.

Parallèlement, des résultats obtenus récemment au laboratoire montrent que des clones de truites peuvent utiliser de façon différente les aliments à bases de végétaux avec des efficacités alimentaires variables (Dupont-Nivet et al. 2009). Ces données prouvent donc qu'il est possible de sélectionner des génotypes plus performants pour l'utilisation des aliments à base de végétaux. Il serait alors intéressant d'étudier la régulation nutritionnelle du métabolisme par les acides aminés et l'implication de la voie Akt-TOR chez ces animaux.

Ainsi, la régulation de la voie TOR par les acides aminés et leurs effets sur le métabolisme est un domaine de recherche prometteur dans le cadre des recherches d'interaction génétique-nutrition chez la truite.

VI.3. La régulation par les acides aminés via la voie Akt-TOR du métabolisme intermédiaire varie-t-elle en fonction des espèces de poisson ?

La truite n'est pas la seule espèce de poisson élevée en aquaculture. En effet, depuis 1950 le nombre d'espèces de poisson en production est passé de 42 à 186 en 2004 (Vandeputte et al. 2004). En effet, d'autres salmonidés comme le saumon atlantique (*Salmo salar*) et de nombreuses autres espèces d'eau douce comme la carpe commune (*Cyprinus carpio*), le tilapia (*Oreochromis sp*) mais également d'eau de mer (daurade royale (*Sparus aurata*), bar européen (*Dicentrarchus labrax*)...) sont élevées à travers le monde. Toutes ces espèces ne se situent pas au même niveau trophique dans la chaîne alimentaire. Ainsi certaines espèces sont omnivores (comme la carpe commune), herbivores (comme la carpe chinoise (*Ctenopharingodon idella*)), ou détritivores (comme la carpe africaine (*Labeo lineatus*)). Leurs besoins en protéines sont inférieures (et souvent leur capacité à utiliser le glucose supérieure) à la truite. En effet, alors que la truite a des besoins en protéines d'environ 40%, les besoins de la carpe commune sont à environ 31% (Cahu 2004). **Nos données sur l'effet des acides aminés sur la régulation du métabolisme chez la truite (carnivore) ne peuvent donc pas être généralisées aux autres espèces et devront faire l'objet d'études complémentaires.**

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'ensemble des travaux réalisés au cours de ma thèse ont permis de mettre en évidence *in vitro* un effet des acides aminés (aux niveaux quantitatif et qualitatif) dans la régulation moléculaire du métabolisme intermédiaire (glycolyse, gluconéogenèse, lipogenèse) dans des hépatocytes de truite arc-en-ciel et de tester *in vivo* l'effet de différents types d'aliments sur ces mêmes voies. Ces données sont originales dans le domaine des sciences nutritionnelles, mettant clairement en exergue l'effet des acides aminés sur la régulation du métabolisme glucido-lipidique. Ceci pourrait (si cela est validé *in vivo*) avoir des conséquences sur l'utilisation des autres macronutriments comme les glucides et les lipides et donc impacter la composition des aliments piscicoles.

Nos données devraient cependant être complétées afin d'aller plus loin dans la compréhension de l'effet des acides aminés (protéines) sur le métabolisme et l'utilisation des nutriments ainsi que pour vérifier *in vivo* certaines de nos observations :

- Les études dans le cadre de cette thèse ont porté uniquement sur le rôle des acides aminés dans la régulation de l'expression des gènes codant pour des enzymes du métabolisme intermédiaire dans les hépatocytes. Une étude fonctionnelle (biochimique) portant entre autres sur les mesures de taux de protéines synthétisées et d'activités enzymatiques serait nécessaire afin de corrélérer les mesures d'expression moléculaire aux activités enzymatiques. Des mesures de flux (bien que compliquées à mettre en place) pourraient également compléter le dispositif.

- Il serait intéressant d'établir une liste élargie des cibles moléculaires potentielles des acides aminés *in vitro* sur les hépatocytes. En particulier, une analyse de l'effet des acides aminés sur d'autres gènes candidats portant – par exemple - sur les transporteurs des nutriments et en particulier les transporteurs du glucose (comme Glut2 (Krasnov et al. 2001; Panserat et al. 2001c)) et des acides aminés apporterait des données complémentaires pertinentes à notre travail. Enfin une approche transcriptomique pourrait être développée pour tenter d'identifier de nouvelles cibles moléculaires des acides aminés.

- Concernant spécifiquement les mécanismes liés à l'effet des acides aminés sur la régulation de l'expression des gènes du métabolisme, il serait aussi intéressant de tester l'importance de la voie TOR *in vivo* en utilisant des inhibiteurs comme la rapamycine ou d'autres molécules thérapeutiques, plus spécifiques des molécules présentes dans mTORC1 et actuellement en cours de développement pour le traitement de certains cancers par exemple (Dowling et al. 2010; Guertin et al. 2007). Ce travail *in vivo* pourrait être réalisé par

traitement aigu (administration intra-péritonéale) ou chronique (micro-pompes osmotiques) chez le poisson.

- Dans le cadre de ma thèse, j'ai étudié l'effet de l'interaction entre l'insuline et les acides aminés sur l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire. Pour aller plus loin dans l'analyse des interactions entre nutriments, et afin de rechercher si un fort taux de protéines alimentaires pourrait avoir un effet négatif sur l'utilisation des glucides (question ayant initié ce travail de thèse), il serait intéressant d'étudier l'interaction entre l'insuline, les acides aminés et le glucose dans les hépatocytes de truite mais également *in vivo*.

- Enfin, l'étude *in vivo* que nous avons réalisée a porté principalement sur l'effet du remplacement des matières premières d'origine halieutique par des ingrédients d'origine végétale. Ces données étaient très importantes dans le cadre du développement de nouveaux aliments pour une aquaculture durable. Cependant, il serait utile d'étudier *in vivo* l'effet de l'excès des acides aminés ou de certains acides aminés sur le métabolisme par la mise en place d'expérimentations nutritionnelles spécifiques : effets de différents taux de protéines alimentaires, ajout en excès de certains acides aminés (comme la leucine, la méthionine, la lysine) dans l'aliment et/ou exposition du poisson à des doses « pharmacologiques » d'acides aminés (utilisation de gélules, canulation, force-feeding). Ces études devraient être réalisées au niveau du foie mais également étendues à d'autres tissus jouant un rôle important dans l'utilisation métabolique des acides aminés comme l'intestin et le muscle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abraham RT (2010) Lysosomal Rag-ulation of mTOR complex 1 activity. *Cell Metabolism* 11:341-342

Acosta-Jaquez HA, Keller JA, Foster KG, Ekim B, Soliman GA, Feener EP, Ballif BA, Fingar DC (2009) Site-specific mTOR phosphorylation promotes mTORC1-mediated signaling and cell growth. *Molecular and Cellular Biology* 29:4308-4324

Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF (2000) The c-Jun NH2-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser307. *Journal of Biological Chemistry* 275:9047-9054

Akimoto K, Nakaya M, Yamanaka T, Tanaka J, Matsuda S, Weng QP, Avruch J, Ohno S (1998) Atypical protein kinase C lambda binds and regulates p70 S6 kinase. *Biochemical Journal* 335:417-424

Alexia C, Fourmatgeat P, Delautier D, Groyer A (2006) Insulin-like growth factor-I stimulates H4II rat hepatoma cell proliferation: Dominant role of PI-3'K/Akt signaling. *Experimental Cell Research* 312:1142-1152

Andoh T (2007) Amino acids are more important insulinotropins than glucose in a teleost fish, barfin flounder (*Verasper moseri*). *General and Comparative Endocrinology* 151:308-317

Araki E, Lipes M, Patti M, Bruning J, Haag B, Johnson R, Kahn C (1994) Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 372:186 - 190

Arcaro A, Volinia S, Zvelebil MJ, Stein R, Watton SJ, Layton MJ, Gout I, Ahmadi K, Downward J, Waterfield MD (1998) Human phosphoinositide 3-kinase C2 β , the role of calcium and the C2 domain in enzyme activity. *Journal of Biological Chemistry* 273:33082-33090

Atherton P, Smith K, Etheridge T, Rankin D, Rennie M (2010) Distinct anabolic signalling responses to amino acids in C2C12 skeletal muscle cells. *Amino Acids* 38:1533-1539

Averous J, Bruhat A, Jousse C, Carraro V, Thiel G, Fafournoux P (2004) Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 279:5288-5297

Avruch J (1998) Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Molecular and Cellular Biochemistry* 182:31-48

Avruch J, Long X, Ortiz-Vega S, Rapley J, Papageorgiou A, Dai N (2009) Amino acid regulation of TOR complex 1. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 296:E592-E602

Azzout-Marniche D, Bécard D, Guichard C, Foretz M, Ferré P, Foufelle F (2000) Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochemical Journal* 350:389-393

Azzout-Marniche D, Gaudichon C, Blouet C, Bos C, Mathe V, Huneau J-F, Tome D (2007) Liver glycconeogenesis: a pathway to cope with postprandial amino acid excess in high-protein fed rats? *American Journal of Physiology* *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 292:R1400-1407

Backer J, Wjasow C, Zhang Y (1997) In vitro binding and phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by the insulin receptor. Role of interactions mediated by the phosphotyrosine-binding domain and the pleckstrin-homology domain. *European Journal of Biochemistry* 245:91 - 96

Backer JM (2008) The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochemical Journal* 410:1-17

Bae SS, Cho H, Mu J, Birnbaum MJ (2003) Isoform-specific regulation of insulin-dependent glucose uptake by Akt/Protein Kinase B. *Journal of Biological Chemistry* 278:49530-49536

Bai X, Jiang Y (2010) Key factors in mTOR regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67:239-253

Balage M, Sinaud S, Prod'Homme M, Dardevet D, Vary TC, Kimball SR, Jefferson LS, Grizard J (2001) Amino acids and insulin are both required to regulate assembly of the eIF4E {middle dot} eIF4G complex in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 281:E565-574

Balbis A, Baquiran G, Bergeron JJM, Posner BI (2000) Compartmentalization and insulin-induced translocations of insulin receptor substrates, phosphatidylinositol 3-Kinase, and protein kinase B in rat liver. *Endocrinology* 141:4041-4049

Barbosa-Tessmann IP, Chen C, Zhong C, Siu F, Schuster SM, Nick HS, Kilberg MS (2000) Activation of the human asparagine synthetase gene by the amino acid response and the endoplasmic reticulum stress response pathways occurs by common genomic elements. *Journal of Biological Chemistry* 275:26976-26985

Barthel A, Schmoll D (2003) Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *American Journal of Physiology* 285:E685-E692

Barthel A, Schmoll D, Unterman TG (2005) FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 16:183-189

Bell JG, McEvoy J, Tocher DR, McGhee F, Campbell PJ, Sargent JR (2001) Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *Journal of Nutrition* 131:1535-1543

Bell JG, Tocher DR, Henderson RJ, Dick JR, Crampton VO (2003) Altered fatty acid compositions in atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing linseed and rapeseed oils can be partially restored by a subsequent fish oil finishing diet. *Journal of Nutrition* 133:2793-2801

Bergot F (1979) Effects of dietary carbohydrates and of their mode of distribution on glycaemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri richardson*). *Comparative Biochemistry and Physiology. A: Comparative Physiology* 64:543-547

Berlanga JJ, Santoyo J, Haro Cd (1999) Characterization of a mammalian homolog of the GCN2 eukaryotic initiation factor eIF203B1; kinase. *European Journal of Biochemistry* 265:754-762

Blouet C, Mariotti F, Azzout-Marniche D, Bos C, Mathe V, Tome D, Huneau J-F (2006) The reduced energy intake of rats fed a high-protein low-carbohydrate diet explains the lower fat deposition, but macronutrient substitution accounts for the improved glycemic control. *Journal of Nutrition* 136:1849-1854

Boulton CA, Ratledge C (1981) Correlation of lipid-accumulation in yeasts with possession of ATP-citrate lyase. *Journal of General Microbiology* 127:169-176

Brazil DP, Yang Z-Z, Hemmings BA (2004) Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends in Biochemical Sciences* 29:233-242

Brennan L, Shine A, Hewage C, Malthouse JPG, Brindle KM, McClenaghan N, Flatt PR, Newsholme P (2002) A nuclear magnetic resonance-based demonstration of substantial oxidative l-alanine metabolism and l-alanine-enhanced glucose metabolism in a clonal pancreatic β -cell line. *Diabetes* 51:1714-1721

Brown RA, Domin J, Arcaro A, Waterfield MD, Shepherd PR (1999) Insulin activates the α isoform of class II phosphoinositide 3-kinase. *Journal of Biological Chemistry* 274:14529-14532

Brown RA, Shepherd PR (2001) Growth factor regulation of the novel class II phosphoinositide 3-kinases. *Biochemical Society Transactions* 29:535-537

Bruhat A, Jousse C, Carraro V, Reimold AM, 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

Buddington RK, Kroghdahl A, Bakke-Mckellep AM (1997) The intestines of carnivorous fish: structure and functions and the relations with diet. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum* 638:67-80

Buerger C, DeVries B, Stambolic V (2006) Localization of Rheb to the endomembrane is critical for its signaling function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 344:869-880

Bun-Ya M, Harashima S, Oshima Y (1992) Putative GTP-binding protein, Gtr1, associated with the function of the Pho84 inorganic phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 12:2958-2966

Byfield MP, Murray JT, Backer JM (2005) hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *Journal of Biological Chemistry* 280:33076-33082

Cahill CM, Tzivion G, Nasrin N, Ogg S, Dore J, Ruvkun G, Alexander-Bridges M (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase signaling inhibits DAF-16 DNA binding and function via 14-3-3-dependent and 14-3-3-independent pathways. *Journal of Biological Chemistry* 276:13402-13410

Cahu C (2004) Domestication et fonction nutrition chez les poissons. *INRA Productions Animales*:205-210

Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE (2003) Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *Journal of Biological Chemistry* 278:25323-25330

Cantrell D (2001) Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *Journal of Cell Science* 114:1439-1445

Capilla E, Medale F, Navarro I, Panzerat S, Vachot C, Kaushik S, Gutierrez J (2003) Muscle insulin binding and plasma levels in relation to liver glucokinase activity, glucose metabolism and dietary carbohydrates in rainbow trout. *Regulatory Peptides* 110:123-132

Carlson CJ, White MF, Rondinone CM (2004) Mammalian target of rapamycin regulates IRS-1 serine 307 phosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 316:533-539

Carpenter CL, Auger KR, Chanudhuri M, Yoakim M, Schaffhausen B, Shoelson S, Cantley LC (1993) Phosphoinositide 3-kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit. *Journal of Biological Chemistry* 268:9478-9483

Casamayor A, Morrice NA, Alessi DR (1999) Phosphorylation of Ser-241 is essential for the activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1: identification of five sites of phosphorylation in vivo. *Biochemical Journal* 342 (Pt 2):287-292

Castro AF, Rebhun JF, Clark GJ, Quilliam LA (2003) Rheb binds tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) and promotes S6 kinase activation in a rapamycin- and farnesylation-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry* 278:32493-32496

Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN (1999) AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: Kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annual Review of Biochemistry* 68:965-1014

Charles S, Henquin JC (1983) Distinct effects of various amino acids on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ fluxes in rat pancreatic islets. *Biochemical Journal* 214:899-907

Cheadle JP, Reeve MP, Sampson JR, Kwiatkowski DJ (2000) Molecular genetic advances in tuberous sclerosis. *Human Genetics* 107:97-114

Chen D, Van Horn DJ, White MF, Backer JM (1995) Insulin receptor substrate 1 rescues insulin action in CHO cells expressing mutant insulin receptors that lack a juxtamembrane NPXY motif. *Molecular and Cellular Biology* 15:4711-4717

Chen G, Liang G, Ou J, Goldstein JL, Brown MS (2004) Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:11245-11250

Chen WS, Xu P-Z, Gottlob K, Chen M-L, Sokol K, Shiyanova T, Roninson I, Weng W, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T, Hay N (2001) Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the akt1 gene. *Genes and Development* 15:2203-2208

Cheng SWY, Fryer LGD, Carling D, Shepherd PR (2004) Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status. *Journal of Biological Chemistry* 279:15719-15722

Cheng ZJ, Hardy RW, Usry JL (2003) Effects of lysine supplementation in plant protein-based diets on the performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and apparent digestibility coefficients of nutrients. *Aquaculture* 215:255-265

Cherrington AD (1999) Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. *Diabetes* 48:1198-1214

Chiang GG, Abraham RT (2005) Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *Journal of Biological Chemistry* 280:25485-25490

Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB, III, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ (2001a) Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB β). *Science* 292:1728-1731

Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ (2001b) Akt1/PKB α is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *Journal of Biological Chemistry* 276:38349-38352

Chotechuan N, Azzout-Marniche D, Bos C, Chaumontet C, Gausseres N, Steiler T, Gaudichon C, Tome D (2009) mTOR, AMPK, and GCN2 coordinate the adaptation of hepatic energy metabolic pathways in response to protein intake in the rat. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 297:E1313-1323

Chuang LM, Myers MG, Jr., Backer JM, Shoelson SE, White MF, Birnbaum MJ, Kahn CR (1993) Insulin-stimulated oocyte maturation requires insulin receptor substrate 1 and interaction with the SH2 domains of phosphatidylinositol 3-kinase. *Molecular and Cellular Biology* 13:6653-6660

Copp J, Manning G, Hunter T (2009) TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2. *Cancer Research* 69:1821-1827

Cowey C, Walton M (1989) Intermediary metabolism. In: *Intermediary Metabolism* (Cowey, C. & Walton, M., eds.), pp. 259-329. Academic Press, New York.

Cowey CB, Knox D, Walton MJ, Adron JW (1977) The regulation of gluconeogenesis by diet and insulin in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *British Journal of Nutrition* 38:463-470

Craparo A, Freund R, Gustafson TA (1997) 14-3-3 (epsilon) interacts with the insulin-like growth factor I receptor and insulin receptor substrate I in a phosphoserine-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry* 272:11663-11669

Cross DAE, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785-789

Crozier SJ, Kimball SR, Emmert SW, Anthony JC, Jefferson LS (2005) Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *Journal of Nutrition* 135:376-382

Czech MP, Corvera S (1999) Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *Journal of Biological Chemistry* 274:1865-1868

Davies SJ, Morris PC (1997) Influence of multiple amino acid supplementation on the performance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), fed soya based diets. *Aquaculture Research* 28:65-74

del sol Novoa M, Capilla E, Rojas P, Baro J, Gutierrez J, Navarro I (2004) Glucagon and insulin response to dietary carbohydrate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 139:48-54

Dentin R, Girard J, Postic C (2005) Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie* 87:81-86

Desvergne B, Michalik L, Wahli W (2006) Transcriptional Regulation of Metabolism. *Physiological Reviews* 86:465-514

Deval C, Chaveroux C, Maurin A-C, Cherasse Y, Parry L, Carraro V, Milenkovic D, Ferrara M, Bruhat A, Jousse C, Fafournoux P (2009) Amino acid limitation regulates the expression of genes involved in several specific biological processes through GCN2-dependent and GCN2-independent pathways. *FEBS Journal* 276:707-718

Dias J, Alvarez MJ, Diez A, Arzel J, Corraze G, Bautista JM, Kaushik SJ (1998) Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein/energy in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 161:169-186

Dixon G, Nolan J, McClenaghan N, Flatt P, Newsholme P (2003) A comparative study of amino acid consumption by rat islet cells and the clonal beta-cell line BRIN-BD11 - the functional significance of L-alanine. *Journal of Endocrinology* 179:447-454

Donaton MCV, Holsbeeks I, Lagatie O, Zeebroeck GV, Crauwels M, Winderickx J, Thevelein JM (2003) The Gap1 general amino acid permease acts as an amino acid sensor for

activation of protein kinase A targets in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 50:911-929

Dong J, Qiu H, Garcia-Barrio M, Anderson J, Hinnebusch AG (2000) Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Molecular Cell* 6:269-279

Dowling RJO, Topisirovic I, Fonseca BD, Sonenberg N (2010) Dissecting the role of mTOR: Lessons from mTOR inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1804:433-439

Ducluzeau P-H, Perretti N, Laville M, Andreelli F, Vega N, Riou J-P, Vidal H (2001) Regulation by Insulin of Gene Expression in Human Skeletal Muscle and Adipose Tissue. *Diabetes* 50:1134-1142

Dufner A, Thomas G (1999) Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Experimental Cell Research* 253:100-109

Dupont-Nivet M, Medale F, Leonard J, Le Guillou S, Tiquet F, Quillet E, Geurden I (2009) Evidence of genotype-diet interactions in the response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) clones to a diet with or without fishmeal at early growth. *Aquaculture* 295:15-21

Eaton S (2002) Control of mitochondrial beta-oxidation flux. *Progress in Lipid Research* 41:197-239

Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferré P, Foufelle F (2004) SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86:839-848

Elshourbagy NA, Near JC, Kmetz PJ, Sathe GM, Southan C, Strickler JE, Gross M, Young JF, Wells TN, Groot PH (1990) Rat ATP citrate-lyase. Molecular cloning and sequence analysis of a full-length cDNA and mRNA abundance as a function of diet, organ, and age. *Journal of Biological Chemistry* 265:1430-1435

Erikson E, Maller JL (1989) In vivo phosphorylation and activation of ribosomal protein S6 kinases during *Xenopus* oocyte maturation. *Journal of Biological Chemistry* 264:13711-13717

Esser V, Britton CH, Weis BC, Foster DW, McGarry JD (1993) Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver carnitine palmitoyltransferase I. Direct evidence that a single polypeptide is involved in inhibitor interaction and catalytic function. *Journal of Biological Chemistry* 268:5817-5822

Esser V, Brown NF, Cowan AT, Foster DW, McGarry JD (1996) Expression of a cDNA isolated from rat brown adipose tissue and heart identifies the product as the muscle isoform of carnitine palmitoyltransferase I (M-CPT I). M-CPT I is the predominant CPT I isoform expressed in both white (epididymal) and brown adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 271:6972-6977

Falasca M, Maffucci T (2007) Role of class II phosphoinositide 3-kinase in cell signalling. *Biochemical Society Transactions* 35:211-214

Fantin VR, Lavan BE, Wang Q, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Keller SR, Lienhard GE (1999) Cloning, tissue expression, and chromosomal location of the mouse insulin receptor substrate 4 gene. *Endocrinology* 140:1329-1337

Farese RV (2002) Function and dysfunction of aPKC isoforms for glucose transport in insulin-sensitive and insulin-resistant states. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 283:E1-11

Ferrari S, Bandi HR, Hofsteenge J, Bussian BM, Thomas G (1991) Mitogen-activated 70K S6 kinase. Identification of in vitro 40 S ribosomal S6 phosphorylation sites. *Journal of Biological Chemistry* 266:22770-22775

Ferraris M, Radice S, Catalani P, Francolini M, Marabini L, Chiesara E (2002) Early oxidative damage in primary cultured trout hepatocytes: a time course study. *Aquatic Toxicology* 59:283-296

Fideu MD, Soler G, Ruiz-Amil M (1983) Nutritional regulation of glycolysis in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Comparative Biochemistry and Physiology. B. Biochemistry and Molecular Biology* 74:795-799

Findlay GM, Yan L, Procter J, Mieulet V, Lamb RF (2007) A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signalling. *Biochemical Journal* 403:13-20

Fleischmann M, Iynedjian PB (2000) Regulation of sterol regulatory-element binding protein 1 gene expression in liver: role of insulin and protein kinase B/cAkt. *Biochemical Journal* 349:13-17

Floyd JC, Fajans SS, Conn JW, Knopf RF, Rull J (1966) Stimulation of insulin secretion by amino acids. *The Journal of Clinical Investigation* 45:1487-1502

Foretz M, Pacot C, Dugail I, Lemarchand P, Guichard C, le Liepvre X, Berthelier-Lubrano C, Spiegelman B, Kim JB, Ferre P, Foufelle F (1999) ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Molecular and Cellular Biology* 19:3760-3768

Forsberg H, Ljungdahl P (2001) Sensors of extracellular nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* 40:91-109

Foster FM, Traer CJ, Abraham SM, Fry MJ (2003) The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. *Journal of Cell Science* 116:3037-3040

Foster JD, Nordlie RC (2002) The Biochemistry and Molecular Biology of the Glucose-6-Phosphatase System. *Experimental Biology and Medicine* 227:601-608

Foster KG, Acosta-Jaquez HA, Romeo Y, Ekim B, Soliman GA, Carriere A, Roux PP, Ballif BA, Fingar DC (2010) Regulation of mTOR complex 1 (mTORC1) by Raptor Ser863 and multisite phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 285:80-94

Foufelle F, Ferre P (2002) New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochemical Journal* 366:377-391

Frame S, Cohen P (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochemical Journal* 359:1-16

Francis G, Makkar HPS, Becker K (2001) Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199:197-227

Garami A, Zwartkruis FJT, Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Stocker H, Kozma SC, Hafen E, Bos JL, Thomas G (2003) Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Molecular Cell* 11:1457-1466

Garvey WT, Maianu L, Zhu JH, Brechtel-Hook G, Wallace P, Baron AD (1998) Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation* 101:2377-2386

Gatlin DM, Barrows FT, Brown P, Dabrowski K, Gaylord TG, Hardy RW, Herman E, Hu GS, Kroghdahl A, Nelson R, Overturf K, Rust M, Sealey W, Skonberg D, Souza EJ, Stone D, Wilson R, Wurtele E (2007) Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research* 38:551-579

Gelineau A, Corraze G, Boujard T, Larroquet L, Kaushik S (2001) Relation between dietary lipid level and voluntary feed intake, growth, nutrient gain, lipid deposition and hepatic lipogenesis in rainbow trout. *Reproduction, Nutrition, Development* 41:487-503

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

Girard J, Ferre P, Fougelle F (1997) Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Annual Review of Nutrition* 17:325-352

Glencross BD, Hawkins WE, Curnow JG (2003) Restoration of the fatty acid composition of red seabream (*Pagrus auratus*) using a fish oil finishing diet after grow-out on plant oil based diets. *Aquaculture Nutrition* 9:409-418

Goberdhan DCI, Meredith D, Boyd CAR, Wilson C (2005) PAT-related amino acid transporters regulate growth via a novel mechanism that does not require bulk transport of amino acids. *Development* 132:2365-2375

Gomez-Requeni P, Mingarro M, Caldach-Giner JA, Medale F, Martin SAM, Houlihan DF, Kaushik S, Perez-Sanchez J (2004) Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotrophic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 232:493-510

Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. *Molecular and Cellular Biology* 11:6059-6066

Greene DHS, Selivonchick DP (1987) Lipid-Metabolism in Fish. *Progress in Lipid Research* 26:53-85

Griffin MJ, Sul HS (2004) Insulin Regulation of Fatty Acid Synthase Gene Transcription: Roles of USF and SREBP-1c. *IUBMB Life* 56:595-600

Grove JR, Banerjee P, Balasubramanyam A, Coffey PJ, Price DJ, Avruch J, Woodgett JR (1991) Cloning and expression of two human p70 S6 kinase polypeptides differing only at their amino termini. *Molecular and Cellular Biology* 11:5541-5550

Guerrini L, Gong SS, Mangasarian K, Basilico C (1993) *Cis*- and *trans*-acting elements involved in amino acid regulation of asparagine synthetase gene expression. *Molecular and Cellular Biology* 13:3202-3212

Guertin DA, Sabatini DM (2007) Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 12:9-22

Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, Brown M, Fitzgerald KJ, Sabatini DM (2006) Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC[α], but not S6K1. *Developmental Cell* 11:859-871

Guillaume J, Kaushik S, Bergot P, Métaillat R (1999) *Nutrition et alimentation des poissons et crustacés*, INRA ed.

Guillet-Deniau I, Mieulet V, Le Lay S, Achouri Y, Carré D, Girard J, Fougère F, Ferré P (2002) Sterol regulatory element binding protein-1c expression and action in rat muscles: insulin-like effects on the control of glycolytic and lipogenic enzymes and UCP3 gene expression. *Diabetes* 51:1722-1728

Gulati P, Gaspers LD, Dann SG, Joaquin M, Nobukuni T, Natt F, Kozma SC, Thomas AP, Thomas G (2008) Amino acids activate mTOR complex 1 via Ca²⁺/CaM signaling to hVps34. *Cell Metabolism* 7:456-465

Guo F, Cavener DR (2007) The GCN2 eIF2[α] kinase regulates fatty-acid homeostasis in the liver during deprivation of an essential amino acid. *Cell Metabolism* 5:103-114

Gutieres S, Damon M, Panserat S, Kaushik S, Medale F (2003) Cloning and tissue distribution of a carnitine palmitoyltransferase I gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology. B. Biochemistry and Molecular Biology* 135:139-151

Hanks S, Hunter T (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB Journal* 9:576-596

Hanson RW, Reshef L (1997) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annual Review of Biochemistry* 66:581-611

Hao S, Sharp JW, Ross-Inta CM, McDaniel BJ, Anthony TG, Wek RC, Cavener DR, McGrath BC, Rudell JB, Koehnle TJ, Gietzen DW (2005) Uncharged tRNA and Sensing of Amino Acid Deficiency in Mammalian Piriform Cortex. *Science* 307:1776-1778

Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K-i, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K (2002) Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110:177-189

Harrington LS, Findlay GM, Gray A, Tolkacheva T, Wigfield S, Rebholz H, Barnett J, Leslie NR, Cheng S, Shepherd PR, Gout I, Downes CP, Lamb RF (2004) The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *Journal of Cell Biology* 166:213-223

Haruta T, Uno T, Kawahara J, Takano A, Egawa K, Sharma PM, Olefsky JM, Kobayashi M (2000) A rapamycin-sensitive pathway down-regulates insulin signaling via phosphorylation and proteasomal degradation of insulin receptor substrate-1. *Molecular Endocrinology* 14:783-794

Häussinger D (2008) Osmosensing and osmosignaling in the liver. *WMW Wiener Medizinische Wochenschrift* 158:549-552

Hay N, Sonenberg N (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes and Development* 18:1926-1945

Helliwell S, Wagner P, Kunz J, Deuter-Reinhard M, Henriquez R, Hall M (1994) TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Molecular Biology of the Cell* 5:105-118

Hemre G-I, Mommsen TP, Krogdahl A (2002) Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nutrition* 8:175-194

Henderson RJ, Sargent JR (1981) Lipid biosynthesis in rainbow trout, *Salmo gairdnerii*, fed diets of differing lipid content. *Comparative Biochemistry and Physiology. C: Comparative Pharmacology* 69C:31-37

Henderson RJ, Tocher DR (1987) The lipid-composition and biochemistry of fresh-water fish. *Progress in Lipid Research* 26:281-347

Henquin J (2009) Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia* 52:739-751

Higuchi N, Kato M, Miyazaki M, Tanaka M, Kohjima M, Ito T, Nakamuta M, Enjoji M, Kotoh K, Takayanagi R (2010, in press) Potential role of branched-chain amino acids in glucose metabolism through the accelerated induction of the glucose-sensing apparatus in the liver. *Journal of Cellular Biochemistry*

Hillgartner F, Salati LM, Goodridge AG (1995) Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty-acid synthesis. *Physiological Reviews* 75:47-76

Hilton JW, Atkinson JL (1982) Response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to increased levels of available carbohydrate in practical trout diets. *British Journal of Nutrition* 47:597-607

Hinnebusch AG (1988) Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 52:248-273

Hirose E, Nakashima N, Sekiguchi T, Nishimoto T (1998) RagA is a functional homologue of *S. cerevisiae* Gtr1p involved in the Ran/Gsp1-GTPase pathway. *Journal of Cell Science* 111:11-21

Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420:333-336

Holz MK, Blenis J (2005) Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase. *Journal of Biological Chemistry* 280:26089-26093

Hotta K, Nakajima H, Yamasaki T, Hamaguchi T, Kuwajima M, Noguchi T, Tanaka T, Kono N, Tarui S (1991) Rat-liver-type phosphofructokinase mRNA. *European Journal of Biochemistry* 202:293-298

Hribal ML, Federici M, Porzio O, Lauro D, Borboni P, Accili D, Lauro R, Sesti G (2000) The Gly->Arg972 amino acid polymorphism in insulin receptor substrate-1 affects glucose metabolism in skeletal muscle cells. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 85:2004-2013

Hua X, Wu J, Goldstein JL, Brown MS, Hobbs HH (1995) Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13. *Genomics* 25:667-673

Hundal HS, Taylor PM (2009) Amino acid transceptors: gate keepers of nutrient exchange and regulators of nutrient signaling. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 296:E603-613

Hyde R, Cwiklinski EL, MacAulay K, Taylor PM, Hundal HS (2007) Distinct sensor pathways in the hierarchical control of SNAT2, a putative amino acid transceptor, by amino acid availability. *Journal of Biological Chemistry* 282:19788-19798

Hyde R, Taylor PM, Hundal HS (2003) Amino acid transporters: roles in amino acid sensing and signalling in animal cells. *Biochemical Journal* 373:1-18

Ijichi C, Matsumura T, Tsuji T, Eto Y (2003) Branched-chain amino acids promote albumin synthesis in rat primary hepatocytes through the mTOR signal transduction system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 303:59-64

Inoki K, Li Y, Xu T, Guan K-L (2003) Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes and Development* 17:1829-1834

Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan K-L (2002) TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology* 4:648-657

Iraqi I, Vissers S, Andre B, Urrestarazu A (1999) Transcriptional induction by aromatic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 19:3360-3371

Iritani N, Ikeda Y, Fukuda H, Katsurada A (1984) Comparative study of lipogenic enzymes in several vertebrates. *Lipids* 19:828-835

Iynedjian PB, Roth RA, Fleischmann M, Gjinojci A (2000) Activation of protein kinase B/cAkt in hepatocytes is sufficient for the induction of expression of the gene encoding glucokinase. *Biochemical Journal* 351:621-627

Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, Huang Q, Qin J, Su B (2006) SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 127:125-137

Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, Hall MN (2004) Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biology* 6:1122-1128

Jaeschke A, Hartkamp J, Saitoh M, Roworth W, Nobukuni T, Hodges A, Sampson J, Thomas G, Lamb R (2002) Tuberous sclerosis complex tumor suppressor-mediated S6 kinase inhibition by phosphatidylinositol-3-OH kinase is mTOR independent. *Journal of Cell Biology* 159:217-224

Jiang X, Sun Y, Chen S, Roy K, Price BD (2006) The FATC domains of PIKK proteins are functionally equivalent and participate in the Tip60-dependent activation of DNA-PKcs and ATM. *Journal of Biological Chemistry* 281:15741-15746

Jousse C, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Mordier S, Fafournoux P (2004) Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313:447-452

Karlsson A, Eliason EJ, Mydland LT, Farrell AP, Kiessling A (2006) Postprandial changes in plasma free amino acid levels obtained simultaneously from the hepatic portal vein and the

dorsal aorta in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* 209:4885-4894

Kaushik S (2002) Feed for farmed fish tomorrow. In: 7th Bordeaux aquaculture, Bordeaux.

Kaushik SJ, Coves D, Dutto G, Blanc D (2004) Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 230:391-404

Kaushik SJ, Cravedi JP, Lalles JP, Sumpter J, Fauconneau B, Laroche M (1995) Partial or total replacement of fish-meal by soybean protein on growth, protein-utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow-trout, *Oncorhynchus-mykiss*. *Aquaculture* 133:257-274

Khamzina L, Veilleux A, Bergeron S, Marette A (2005) Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology* 146:1473-1481

Kilberg MS, Shan J, Su N (2009) ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 20:436-443

Kim D-H, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KVP, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM (2003) GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between Raptor and mTOR. *Molecular Cell* 11:895-904

Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM (2002) mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110:163-175

Kim E (2009) Mechanisms of amino acid sensing in mTOR signaling pathway. *Nutrition Research and Practice* 3:64-71

Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan K-L (2008) Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nature Cell Biology* 10:935-945

Kim JB, Sarraf P, Wright M, Yao KM, Mueller E, Solanes G, Lowell BB, Spiegelman BM (1998) Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *Journal of Clinical Investigation* 101:1-9

Kimball SR, Jefferson LS (2002) Control of protein synthesis by amino acid availability. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 5:63-67

Kimball SR, Jefferson LS (2006a) New functions for amino acids: effects on gene transcription and translation. *American Journal of Clinical Nutrition* 83:500S-507

Kimball SR, Jefferson LS (2006b) Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *Journal of Nutrition* 136:227S-231S

Kirchner S, Kaushik S, Panerat S (2003a) Effect of partial substitution of dietary protein by a single gluconeogenic dispensable amino acid on hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology* 134:337-347

Kirchner S, Kaushik S, Panerat S (2003b) Low protein intake is associated with reduced hepatic gluconeogenic enzyme expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Nutrition* 133:2561-2564

Kirchner S, Seixas P, Kaushik S, Panerat S (2005) Effects of low protein intake on extra-hepatic gluconeogenic enzyme expression and peripheral glucose phosphorylation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology. B. Biochemistry and Molecular Biology* 140:333-340

Koh H, Jee K, Lee B, Kim J, Kim D, Yun YH, Kim JW, Choi HS, Chung J (1999) Cloning and characterization of a nuclear S6 kinase, S6 kinase-related kinase (SRK); a novel nuclear target of Akt. *Oncogene* 18:5115-5119

Kok K, Geering B, Vanhaesebroeck B (2009) Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease. *Trends in Biochemical Sciences* 34:115-127

Koketsu Y, Sakoda H, Fujishiro M, Kushiyaama A, Fukushima Y, Ono H, Anai M, Kikuchi T, Fukuda T, Kamata H, Horike N, Uchijima Y, Kurihara H, Asano T (2008) Hepatic

overexpression of a dominant negative form of raptor enhances Akt phosphorylation and restores insulin sensitivity in K/K^{ay} mice. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 294:E719-725

Kolditz C, Borthaire M, Richard N, Corraze G, Panserat S, Vachot C, Lefevre F, Medale F (2008a) Liver and muscle metabolic changes induced by dietary energy content and genetic selection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 294:R1154-1164

Kolditz CI, Paboeuf G, Borthaire M, Esquerre D, SanCristobal M, Lefevre F, Medale F (2008b) Changes induced by dietary energy intake and divergent selection for muscle fat content in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), assessed by transcriptome and proteome analysis of the liver. *BMC Genomics* 9:506

Kotzka J, Lehr S, Roth G, Avci H, Knebel B, Muller-Wieland D (2004) Insulin-activated Erk-mitogen-activated Protein Kinases Phosphorylate Sterol Regulatory Element-binding Protein-2 at Serine Residues 432 and 455 in Vivo. *Journal of Biological Chemistry* 279:22404-22411

Krasnov A, Teerijoki H, Mölsä H (2001) Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatic glucose transporter. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1520:174-178

Krause U, Bertrand L, Maisin L, Rosa M, Hue L (2002) Signalling pathways and combinatory effects of insulin and amino acids in isolated rat hepatocytes. *European Journal of Biochemistry* 269:3742-3750

Krieg J, Hofsteenge J, Thomas G (1988) Identification of the 40 S ribosomal protein S6 phosphorylation sites induced by cycloheximide. *Journal of Biological Chemistry* 263:11473-11477

Krogdahl A, Hemre GI, Mommsen TP (2005) Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquaculture Nutrition* 11:103-122

Kunz J, Henriquez R, Schneider U, Deuter-Reinhard M, Movva NR, Hall MN (1993) Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell* 73:585-596

Kwiatkowski DJ, Zhang H, Bandura JL, Heiberger KM, Glogauer M, el-Hashemite N, Onda H (2002) A mouse model of TSC1 reveals sex-dependent lethality from liver hemangiomas, and up-regulation of p70S6 kinase activity in Tsc1 null cells. *Human Molecular Genetics* 11:525-534

Lakshmanan MR, Nepokroeff CM, Porter JW (1972) Control of the synthesis of fatty-acid synthetase in rat liver by insulin, glucagon, and adenosine 3':5' cyclic monophosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69:3516-3519

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

Laplante M, Sabatini DM (2009) mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science* 122:3589-3594

Latasa M-J, Griffin MJ, Moon YS, Kang C, Sul HS (2003) Occupancy and function of the -150 sterol regulatory element and -65 E-box in nutritional regulation of the fatty acid synthase gene in living animals. *Molecular and Cellular Biology* 23:5896-5907

Lavan B, Fantin V, Chang E, Lane W, Keller S, Lienhard G (1997a) A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *Journal of Biological Chemistry* 272:21403 - 21407

Lavan BE, Lane WS, Lienhard GE (1997b) The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *Journal of Biological Chemistry* 272:11439-11443

Legate NJ, Bonen A, Moon TW (2001) Glucose tolerance and peripheral glucose utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), American eel (*Anguilla rostrata*), and black bullhead catfish (*Ameiurus melas*). *General and Comparative Endocrinology* 122:48-59

Li L, Guan K-L (2009) Amino Acid Signaling to TOR Activation: Vam6 Functioning as a Gtr1 GEF. *Molecular Cell* 35:543-545

Likimani TA, Wilson RP (1982) Effects of diet on lipogenic enzyme activities in channel catfish hepatic and adipose tissue. *Journal of Nutrition* 112:112-117

Long X, Ortiz-Vega S, Lin Y, Avruch J (2005) Rheb binding to mammalian target of rapamycin (mTOR) is regulated by amino acid sufficiency. *Journal of Biological Chemistry* 280:23433-23436

Lorenz MC, Heitman J (1995) TOR mutations confer rapamycin resistance by preventing interaction with FKBP12-rapamycin. *Journal of Biological Chemistry* 270:27531-27537

Louet JF, Chatelain F, Decaux JF, Park EA, Kohl C, Pineau T, Girard J, Pegorier JP (2001a) Long-chain fatty acids regulate liver carnitine palmitoyltransferase I gene (L-CPT I) expression through a peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)-independent pathway. *Biochemical Journal* 354:189-197

Louet JF, Le May C, Pegorier JP, Decaux JF, Girard J (2001b) Regulation of liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by hormones and fatty acids. *Biochemical Society Transactions* 29:310-316

Lu PD, Harding HP, 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

Maehama T, Dixon JE (1999) PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends in Cell Biology* 9:125-128

Magaña MM, Koo S-H, Towle HC, Osborne TF (2000) Different sterol regulatory element-binding protein-1 isoforms utilize distinct co-regulatory factors to activate the promoter for fatty acid synthase. *Journal of Biological Chemistry* 275:4726-4733

Maheshwar M, Cheadle J, Jones A, Myring J, Fryer A, Harris P, Sampson J (1997) The GAP-related domain of tuberin, the product of the TSC2 gene, is a target for missense mutations in tuberous sclerosis. *Human Molecular Genetics* 6:1991-1996

Matsumoto M, Ogawa W, Teshigawara K, Inoue H, Miyake K, Sakaue H, Kasuga M (2002) Role of the insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol 3-Kinase signaling pathway in insulin-induced expression of sterol regulatory element binding protein 1c and glucokinase genes in rat hepatocytes. *Diabetes* 51:1672-1680

Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Aoyama H, Yoshimochi K, Fukamizu A (2005) Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:11278-11283

Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K, Fukamizu A (2003) Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:11285-11290

Maurin A-C, Jousse C, Averous J, Parry L, Bruhat A, Cherasse Y, Zeng H, Zhang Y, Harding HP, Ron D, Fafournoux P (2005) The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores. *Cell Metabolism* 1:273-277

Mauron J, Mottu F, Spohr G (1973) Reciprocal induction and repression of serine dehydratase and phosphoglycerate dehydrogenase by proteins and dietary-essential amino acids in rat liver. *European Journal of Biochemistry* 32:331-342

McGarry JD, Brown NF (1997) The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *European Journal of Biochemistry* 244:1-14

Menoyo D, Lopez-Bote CJ, Obach A, Bautista JM (2005) Effect of dietary fish oil substitution with linseed oil on the performance, tissue fatty acid profile, metabolism, and oxidative stability of Atlantic salmon. *Journal of Animal Science* 83:2853-2862

Metayer S, Seilliez I, Collin A, Duchene S, Mercier Y, Geraert PA, Tesseraud S (2008) Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status. *Journal of Nutritional Biochemistry* 19:207-215

Misawa H, Ohtsubo M, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Yoshimura A (1998) Cloning and characterization of a novel Class II phosphoinositide 3-kinase containing C2 domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244:531-539

Miserez AR, Cao G, Probst LC, Hobbs HH (1997) Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein 2 (SREBF2). *Genomics* 40:31-40

Mommsen TP, Moon TW, Walsh TJ (1994) Hepatocytes: isolation, maintenance and utilization. In: Biochemistry and molecular biology of fishes (Hochachka, P. W. & Mommsen, T. P., eds.). Elsevier Science B.V., Amsterdam.

Moon TW (2001) Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? Comparative Biochemistry and Physiology. B. Biochemistry and Molecular Biology 129:243-249

Morash AJ, Kajimura M, McClelland GB (2008) Intertissue regulation of carnitine palmitoyltransferase I (CPTI): Mitochondrial membrane properties and gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1778:1382-1389

Morash AJ, Le Moine CMR, McClelland GB (2010) Genome duplication events have lead to a diversification in the CPT I gene family in fish. American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology:in press

Mounier C, Posner BI (2006) Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 84:713-724

Moustaïd N, Beyer RS, Sul HS (1994) Identification of an insulin response element in the fatty acid synthase promoter. Journal of Biological Chemistry 269:5629-5634

Moyad MA (2005) An introduction to dietary/supplemental omega-3 fatty acids for general health and prevention: Part II. Urologic oncology 23:36-48

Murakami S, Sasaoka T, Wada T, Fukui K, Nagira K, Ishihara H, Usui I, Kobayashi M (2004) Impact of src homology 2-containing inositol 5'-phosphatase 2 on the regulation of insulin signaling leading to protein synthesis in 3T3-L1 adipocytes cultured with excess amino acids. Endocrinology 145:3215-3223

Myers M, Mendez R, Shi P, Pierce J, Rhoads R, White M (1998) The COOH-terminal tyrosine phosphorylation sites on IRS-1 bind SHP-2 and negatively regulate insulin signaling. Journal of Biological Chemistry 273:26908 - 26914

Nadeau KJ, Leitner JW, Gurerich I, Draznin B (2004) Insulin regulation of sterol regulatory element-binding protein-1 expression in L-6 muscle cells and 3T3 L1 adipocytes. Journal of Biological Chemistry 279:34380-34387

Nave BT, Ouwers M, Withers DJ, Alessi DR, Shepherd PR (1999) Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochemical Journal* 344 Pt 2:427-431

Naylor RL, Goldberg RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beveridge MC, Clay J, Folke C, Lubchenco J, Mooney H, Troell M (2000) Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405:1017-1024

Naylor RL, Hardy RW, Bureau DP, Chiu A, Elliott M, Farrell AP, Forster I, Gatlin DM, Goldberg RJ, Hua K, Nichols PD (2009) Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:15103-15110

Newsholme P, Bender K, Kiely A, Brennan L (2007) Amino acid metabolism, insulin secretion and diabetes. *Biochemical Society Transactions* 35:1180-1186

Newsholme P, Brennan L, Rubi B, Maechler P (2005) New insights into amino acid metabolism, beta-cell function and diabetes. *Clinical Science* 108:185-194

Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, Yang H, Hild M, Kung C, Wilson C, Myer VE, MacKeigan JP, Porter JA, Wang YK, Cantley LC, Finan PM, Murphy LO (2009) Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* 136:521-534

Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Dann SG, Kim SY, Gulati P, Byfield MP, Backer JM, Natt F, Bos JL, Zwartkruis FJ, Thomas G (2005) Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:14238-14243

Nohturfft A, Brown MS, Goldstein JL (1998) Topology of SREBP Cleavage-activating Protein, a Polytopic Membrane Protein with a Sterol-sensing Domain. *Journal of Biological Chemistry* 273:17243-17250

Nordlie RC, Foster JD, Lange AJ (1999) Regulation of glucose production by the liver. *Annual Review of Nutrition* 19:379-406

NRC (1993) Nutrient requirement of fish, Board of Agriculture & National Research Council ed. National Academic press, Washington, DC.

Obsil T, Ghirlando R, Anderson DE, Hickman AB, Dyda F (2003) Two 14-3-3 binding motifs are required for stable association of forkhead transcription factor FOXO4 with 14-3-3 proteins and inhibition of DNA binding. *Biochemistry* 42:15264-15272

Ogawa H, Fujioka M, Su Y, Kanamoto R, Pitot HC (1991) Nutritional regulation and tissue-specific expression of the serine dehydratase gene in rat. *Journal of Biological Chemistry* 266:20412-20417

Olsvik PA, Lie KK, Jordal AE, Nilsen TO, Hordvik I (2005) Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Molecular Biology* 6:21

Onuma H, Vander Kooi BT, Boustead JN, Oeser JK, O'Brien RM (2006) Correlation between FOXO1a (FKHR) and FOXO3a (FKHRL1) binding and the inhibition of basal glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene transcription by insulin. *Molecular Endocrinology* 20:2831-2847

Osborne TF, Espenshade PJ (2009) Evolutionary conservation and adaptation in the mechanism that regulates SREBP action: what a long, strange tRIP it's been. *Genes and Development* 23:2578-2591

Palacin M, Estevez R, Bertran J, Zorzano A (1998) Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiological Reviews* 78:969-1054

Palmer TN, Ryman BE (1972) Studies on oral glucose intolerance in fish. *Journal of Fish Biology* 4:311-319

Panka DJ, Mano T, Suhara T, Walsh K, Mier JW (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells. *Journal of Biological Chemistry* 276:6893-6896

Panserat S (2009) Molecular regulation of intermediary metabolism focusing on utilization of dietary carbohydrates. In: *Molecular Research in Aquaculture* (Overturf, K., ed.), pp. 261-278. Blackwell Publishing, Ames.

Panserat S, Blin C, Medale F, Plagnes-Juan E, Breque J, Krishnamoorthy J, Kaushik S (2000a) Molecular cloning, tissue distribution and sequence analysis of complete glucokinase cDNAs from gilthead seabream (*Sparus aurata*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Biochimica et Biophysica Acta* 1474:61-69

Panserat S, Capilla E, Gutierrez J, Frappart PO, Vachot C, Plagnes-Juan E, Aguirre P, Breque J, Kaushik S (2001a) Glucokinase is highly induced and glucose-6-phosphatase poorly repressed in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a single meal with glucose. *Comparative Biochemistry and Physiology. B. Biochemistry and Molecular Biology* 128:275-283

Panserat S, Hortopan GA, Plagnes-Juan E, Kolditz C, Lansard M, Skiba-Cassy S, Esquerre D, Geurden I, Medale F, Kaushik S, Corraze G (2009) Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Aquaculture* 294:123-131

Panserat S, Kolditz C, Richard N, Plagnes-Juan E, Piumi F, Esquerre D, Medale F, Corraze G, Kaushik S (2008) Hepatic gene expression profiles in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed fishmeal or fish oil-free diets. *British Journal of Nutrition*. 100:953-967

Panserat S, Medale F, Blin C, Breque J, Vachot C, Plagnes-Juan E, Gomes E, Krishnamoorthy R, Kaushik S (2000b) Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream, and common carp. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 278:R1164-1170

Panserat S, Medale F, Breque J, Plagnes-Juan E, Kaushik S (2000c) Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Nutritional Biochemistry* 11:22-29

Panserat S, Plagnes-Juan E, Breque J, Kaushik S (2001b) Hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression is not repressed by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* 204:359-365

Panserat S, Plagnes-Juan E, Kaushik S (2001c) Nutritional regulation and tissue specificity of gene expression for proteins involved in hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* 204:2351-2360

Park EA, Mynatt RL, Cook GA, Kashfi K (1995) Insulin regulates enzyme activity, malonyl-CoA sensitivity and mRNA abundance of hepatic carnitine palmitoyltransferase-I. *Biochemical Journal* 310:853-858

Park J, Hill MM, Hess D, Brazil DP, Hofsteenge J, Hemmings BA (2001) Identification of tyrosine phosphorylation Sites on 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and their role in regulating kinase activity. *Journal of Biological Chemistry* 276:37459-37471

Parrizas M, Planas J, Plisetskaya EM, Gutierrez J (1994) Insulin binding and receptor tyrosine kinase activity in skeletal muscle of carnivorous and omnivorous fish. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 266:R1944-1950

Patti ME, Brambilla E, Luzi L, Landaker EJ, Kahn CR (1998) Bidirectional modulation of insulin action by amino acids. *Journal of Clinical Investigation* 101:1519-1529

Paulauskis JD, Sul HS (1989) Hormonal regulation of mouse fatty acid synthase gene transcription in liver. *Journal of Biological Chemistry* 264:574-577

Pende M, Um SH, Mieulet V, Sticker M, Goss VL, Mestan J, Mueller M, Fumagalli S, Kozma SC, Thomas G (2004) S6K1(-/-)/S6K2(-/-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Molecular and Cellular Biology* 24:3112-3124

Pereira C, Vijayan MM, Storey KB, Jones RA, Moon TW (1995) Role of glucose and insulin in regulating glycogen-synthase and phosphorylase activities in rainbow-trout hepatocytes. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 165:62-70

Peterson RT, Beal PA, Comb MJ, Schreiber SL (2000) FKBP12-Rapamycin-associated protein (FRAP) autophosphorylates at serine 2481 under translationally repressive conditions. *Journal of Biological Chemistry* 275:7416-7423

Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, Gray NS, Sabatini DM (2009) DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 137:873-886

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29:E45

Phin S, Kupferwasser D, Lam J, Lee-Fruman KK (2003) Mutational analysis of ribosomal S6 kinase 2 shows differential regulation of its kinase activity from that of ribosomal S6 kinase 1. *Biochemical Journal* 373:583-591

Pilkis SJ, Granner DK (1992) Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annual Review of Physiology* 54:885-909

Plagnes-Juan E, Lansard M, Seiliez I, Médale F, Corraze G, Kaushik S, Panserat S, Skiba-Cassy S (2008) Insulin regulates the expression of several metabolism-related genes in the liver and primary hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* 211:2510-2518

Plisetskaya EM (1994) Peptides of insulin and glucagon superfamilies in fish. *Netherlands Journal of Zoology* 45:181-188

Polakof S, Médale F, Skiba-Cassy S, Corraze G, Panserat S (2010) Molecular regulation of lipid metabolism in liver and muscle of rainbow trout subjected to acute and chronic insulin treatments. *Domestic Animal Endocrinology* In Press, Corrected Proof

Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leever S, Griffiths JR, Chung YL, Schulze A (2008) SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metabolism* 8:224-236

Price N, van der Leij F, Jackson V, Corstorphine C, Thomson R, Sorensen A, Zammit V (2002) A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics* 80:433-442

Printz RL, Magnuson MA, Granner DK (1993) Mammalian Glucokinase. *Annual Review of Nutrition* 13:463-496

Proud CG (2007) Amino acids and mTOR signalling in anabolic function. *Biochemical Society Transactions* 35:1187-1190

Proud CG (2004) mTOR-mediated regulation of translation factors by amino acids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313:429-436

Proud CG (2002) Regulation of mammalian translation factors by nutrients. *European Journal of Biochemistry* 269:5338-5349

Psota TL, Gebauer SK, Kris-Etherton P (2006) Dietary Omega-3 Fatty Acid Intake and Cardiovascular Risk. *The American Journal of Cardiology* 98:3-18

Ptushkina M, von der Haar T, Karim MM, Hughes JM, McCarthy JE (1999) Repressor binding to a dorsal regulatory site traps human eIF4E in a high cap-affinity state. *EMBO Journal* 18:4068-4075

Pullen N, Thomas G (1997) The modular phosphorylation and activation of p70s6k. *FEBS Letters* 410:78-82

Qiu H, Dong J, Hu C, Francklyn CS, Hinnebusch AG (2001) The tRNA-binding moiety in GCN2 contains a dimerization domain that interacts with the kinase domain and is required for tRNA binding and kinase activation. *EMBO Journal* 20:1425-1438

Quillet E, Le Guillou S, Aubin J, Fauconneau B (2005) Two-way selection for muscle lipid content in pan-size rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 245:49-61

Regost C, Arzel J, Cardinal M, Rosenlund G, Kaushik SJ (2003) Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in Turbot (*Psetta maxima*). Flesh quality properties. *Aquaculture* 220:737-747

Reinhard C, Fernandez A, Lamb NJ, Thomas G (1994) Nuclear localization of p85s6k: functional requirement for entry into S phase. *EMBO Journal* 13:1557-1565

Ribaux PG, Iynedjian PB (2003) Analysis of the role of protein kinase B (cAKT) in insulin-dependent induction of glucokinase and sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1) mRNAs in hepatocytes. *Biochemical Journal* 376:697-705

Richard N, Kaushik S, Larroquet L, Panserat S, Corraze G (2006) Replacing dietary fish oil by vegetable oils has little effect on lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *British Journal of Nutrition* 96:299-309

Riedijk MA, van Goudoever JB (2007) Splanchnic metabolism of ingested amino acids in neonates. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 10:58-62

Riojas RA, Kikani CK, Wang C, Mao X, Zhou L, Langlais PR, Hu D, Roberts JL, Dong LQ, Liu F (2006) Fine tuning PDK1 activity by phosphorylation at Ser163. *Journal of Biological Chemistry* 281:21588-21593

Rollin X, Médale F, Gutieres S, Blanc D, Kaushik SJ (2003) Short- and long-term nutritional modulation of acetyl-CoA carboxylase activity in selected tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *British Journal of Nutrition* 89:803-810

Romanelli A, Martin KA, Toker A, Blenis J (1999) p70 S6 kinase is regulated by protein kinase ζ and participates in a phosphoinositide 3-kinase-regulated signalling complex. *Molecular and Cellular Biology* 19:2921-2928

Rorsman P, Renström E (2003) Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46:1029-1045

Roth G, Kotzka J, Kremer L, Lehr S, Lohaus C, Meyer HE, Krone W, Müller-Wieland D (2000) MAP kinases Erk1/2 phosphorylate sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a at serine 117 in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 275:33302-33307

Rothenberg PL, Lane WS, Karasik A, Backer J, White M, Kahn CR (1991) Purification and partial sequence analysis of pp185, the major cellular substrate of the insulin receptor tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry* 266:8302-8311

Ruvinsky I, Sharon N, Lerer T, Cohen H, Stolovich-Rain M, Nir T, Dor Y, Zisman P, Meyuhas O (2005) Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes and Development* 19:2199-2211

Saitoh M, Pullen N, Brennan P, Cantrell D, Dennis PB, 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

Sakai J, Rawson RB, Espenshade PJ, Cheng D, Seegmiller AC, Goldstein JL, Brown MS (1998) Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Molecular Cell* 2:505-514

Salgado MC, Meton I, Egea M, Baanante IV (2004) Transcriptional regulation of glucose-6-phosphatase catalytic subunit promoter by insulin and glucose in the carnivorous fish, *Sparus aurata*. *Journal of Molecular Endocrinology* 33:783-795

Saltiel AR, Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806

Samson S, Wong N (2002) Role of Sp1 in insulin regulation of gene expression. *Journal of Molecular Endocrinology* 29:265-279

Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM (2010) Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 141:290-303

Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, Sabatini DM (2008) The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320:1496-1501

Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, Carr SA, Sabatini DM (2007) PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Molecular Cell* 25:903-915

Sano H, Kane S, Sano E, Mîinea CP, Asara JM, Lane WS, Garner CW, Lienhard GE (2003) Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *Journal of Biological Chemistry* 278:14599-14602

Sarbassov DD, Ali SM, Kim D-H, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM (2004) Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current Biology* 14:1296-1302

Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM (2005) Growing roles for the mTOR pathway. *Current Opinion in Cell Biology Cell division, growth and death / Cell differentiation* 17:596-603

Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen J-H, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM (2006) Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular Cell* 22:159-168

Sargent JR, Tacon AG (1999) Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. *Proceedings of the Nutrition Society* 58:377-383

Sawka-Verhelle D, Tartare-Deckert S, White MF, Van Obberghen E (1996) Insulin receptor substrate-2 binds to the insulin receptor through its phosphotyrosine-binding domain and through a newly identified domain comprising amino acids 591-786. *Journal of Biological Chemistry* 271:5980-5983

Schalm SS, Blenis J (2002) Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. *Current Biology* 12:632-639

Schmitz-Peiffer C (2002) Protein kinase C and lipid-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Annals of the New York Academy of Sciences* 967:146-157

Schmoll D (2000) Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase B[alpha] and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. *Journal of Biological Chemistry* 275:36324-36333

Schreyer S, Ledwig D, Rakatzi I, Kloting I, Eckel J (2003) Insulin receptor substrate-4 is expressed in muscle tissue without acting as a substrate for the insulin receptor. *Endocrinology* 144:1211-1218

Schürmann A, Brauers A, Maßmann S, Becker W, Joost H-G (1995) Cloning of a novel family of mammalian GTP-binding proteins (RagA, RagB, RagC) with remote similarity to the Ras-related GTPases. *Journal of Biological Chemistry* 270:28982-28988

Sciacchitano S, Taylor SI (1997) Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of the mouse IRS-3 gene. *Endocrinology* 138:4931-4940

Segner H (1998) Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology. A: Comparative Physiology* 120:71-81

Seilliez I, Gabillard JC, Skiba-Cassy S, Garcia-Serrana D, Gutierrez J, Kaushik S, Panserat S, Tesseraud S, Castillo J, Ammendrup-Johnsen I, Codina M, Navarro I (2008) An in vivo and in vitro assessment of TOR signaling cascade in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology 295:R329-335

Sekiguchi T, Hirose E, Nakashima N, Ii M, Nishimoto T (2001) Novel G proteins, Rag C and Rag D, interact with GTP-binding proteins, Rag A and Rag B. Journal of Biological Chemistry 276:7246-7257

Shah OJ, Hunter T (2006) Turnover of the active fraction of IRS1 involves raptor-mTOR- and S6K1-dependent serine phosphorylation in cell culture models of tuberous sclerosis. Molecular and Cellular Biology 26:6425-6434

Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K (1998) Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. Biochemical Journal 333:471-490

Shima H, Pende M, Chen Y, Fumagalli S, Thomas G, Kozma SC (1998) Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. EMBO Journal 17:6649-6659

Shimomura I, Bashmakov Y, Ikemoto S, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL (1999) Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96:13656-13661

Shimomura I, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS (1997) Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. Journal of Clinical Investigation 99:838-845

Shoba LNN, Newman M, Liu W, Lowe WL, Jr. (2001) LY 294002, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits GH-mediated expression of the IGF-I gene in rat hepatocytes. Endocrinology 142:3980-3986

Simopoulos AP (2002) Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. Journal of the American College of Nutrition 21:495-505

Skiba-Cassy S, Collin A, Chartrin P, Medale F, Simon J, Duclos MJ, Tesseraud S (2007) Chicken liver and muscle carnitine palmitoyltransferase 1: nutritional regulation of messengers. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 147:278-287

Skiba-Cassy S, Lansard M, Panserat S, Medale F (2009) Rainbow trout genetically selected for greater muscle fat content display increased activation of liver TOR signaling and lipogenic gene expression. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 297:R1421-R1429

Smith PA, Sakura H, Coles B, Gummerson N, Proks P, Ashcroft FM (1997) Electrogenic arginine transport mediates stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic beta-cells. *The Journal of Physiology* 499:625-635

Smith S, Witkowski A, Joshi AK (2003) Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Progress in Lipid Research* 42:289-317

Snell K (1984) Enzymes of serine metabolism in normal, developing and neoplastic rat tissues. *Advances in Enzyme Regulation* 22:325-400

Soos MA, Jensen J, Brown RA, O'Rahilly S, Shepherd PR, Whitehead JP (2001) Class II phosphoinositide 3-kinase is activated by insulin but not by contraction in skeletal muscle. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 396:244-248

Standaert ML, Bandyopadhyay G, Kanoh Y, Sajan MP, Farese RV (2000) Insulin and PIP3 activate PKC- ζ by mechanisms that are both dependent and independent of phosphorylation of activation loop (T410) and autophosphorylation (T560) sites. *Biochemistry* 40:249-255

Standaert ML, Bandyopadhyay G, Perez L, Price D, Galloway L, Poklepovic A, Sajan MP, Cenni V, Sirri A, Moscat J, Toker A, Farese RV (1999) Insulin activates protein kinases C- ζ and C- λ by an autophosphorylation-dependent mechanism and stimulates their translocation to GLUT4 vesicles and other membrane fractions in rat adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 274:25308-25316

Stein R (2001) Prospects for phosphoinositide 3-kinase inhibition as a cancer treatment. *Endocrine-Related Cancer* 8:237-248

Stipanuk MH (2007) Leucine and protein synthesis: mTOR and beyond. *Nutrition Reviews* 65:122-129

Stoll B, Henry J, Reeds PJ, Yu H, Jahoor F, Burrin DG (1998) Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. *Journal of Nutrition* 128:606-614

Streeper RS, Eaton EM, Ebert DH, Chapman SC, Svitek CA, O'Brien RM (1998) Hepatocyte nuclear factor-1 acts as an accessory factor to enhance the inhibitory action of insulin on mouse glucose-6-phosphatase gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:9208-9213

Suarez RK, Mommsen TP (1987) Gluconeogenesis in teleost fishes. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 65:1869-1882

Sun X, Crimmins D, Myers M, Miralpeix M, White M (1993) Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Molecular and Cellular Biology* 13:7418 - 7428

Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF (1991) Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352:73-77

Sun XJ, Wang L-M, Zhang Y, Yenush L, Myers Jr MG, Glasheen E, Lane WS, Pierce JH, White MF (1995) Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 377:173-177

Takahashi K, Nakagawa M, Young SG, Yamanaka S (2005) Differential membrane localization of ERas and Rheb, two Ras-related proteins involved in the phosphatidylinositol 3-kinase/mTOR pathway. *Journal of Biological Chemistry* 280:32768-32774

Takahashi T, Hara K, Inoue H, Kawa Y, Tokunaga C, Hidayat S, Yoshino K-i, Kuroda Y, Yonezawa K (2000) Carboxyl-terminal region conserved among phosphoinositide-kinase-related kinases is indispensable for mTOR function *in vivo* and *in vitro*. *Genes to Cells* 5:765-775

Takano A, Usui I, Haruta T, Kawahara J, Uno T, Iwata M, Kobayashi M (2001) Mammalian target of rapamycin pathway regulates insulin signaling via subcellular redistribution of insulin receptor substrate 1 and integrates nutritional signals and metabolic signals of insulin. *Molecular and Cellular Biology* 21:5050-5062

Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y, Satoh S (1994) Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372:182 - 186

Tang X, Powelka AM, Soriano NA, Czech MP, Guilherme A (2005) PTEN, but not SHIP2, suppresses insulin signaling through the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 280:22523-22529

Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR (2006) Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7:85-96

Tarasov A, Dusonchet J, Ashcroft F (2004) Metabolic regulation of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K⁺ channel. *Diabetes* 53:S113-S122

Taylor PM (2009) Amino acid transporters: éminences grises of nutrient signalling mechanisms? *Biochemical Society Transactions* 037:237-241

Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J (2003) Tuberous sclerosis complex gene products, tuberin and hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward rheb. *Current Biology* 13:1259-1268

Tesseraud S, Bigot K, Taouis M (2003) Amino acid availability regulates S6K1 and protein synthesis in avian insulin-insensitive QM7 myoblasts. *FEBS Letters* 540:176-180

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

Thedieck K, Polak P, Kim ML, Molle KD, Cohen A, Jenö P, Arriemerlou C, Hall MN (2007) PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis. *PLoS One* 2:e1217

Thumelin S, Esser V, Charvy D, Kolodziej M, Zammit VA, McGarry D, Girard J, Pegorier JP (1994) Expression of liver carnitine palmitoyltransferase I and II genes during development in the rat. *Biochemical Journal* 300 (Pt 2):583-587

Tidwell JH, Allan GL (2001) Fish as food: aquaculture's contribution. Ecological and economic impacts and contributions of fish farming and capture fisheries. EMBO reports 2:958-963

Toker A, Newton AC (2000) Cellular Signaling: Pivoting around PDK-1. Cell 103:185-188

Towle HC, Kaytor EN, Shih H (1997) Regulation of the expression of lipogenic enzyme genes by carbohydrate. Annual Review of Nutrition 17:405-433

Tranulis MA, Dregni O, Christophersen B, Krogdahl A, Borrebaek B (1996) A glucokinase-like-enzyme in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 114:35-39

Tremblay F, Brule S, Hee Um S, Li Y, Masuda K, Roden M, Sun XJ, Krebs M, Polakiewicz RD, Thomas G, Marette A (2007a) Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance. Proc Natl Acad Sci USA 104:14056-14061

Tremblay F, Gagnon A, Veilleux A, Sorisky A, Marette A (2005a) Activation of the mammalian target of rapamycin pathway acutely inhibits insulin signaling to Akt and glucose transport in 3T3-L1 and human adipocytes. Endocrinology 146:1328-1337

Tremblay F, Krebs M, Dombrowski L, Brehm A, Bernroider E, Roth E, Nowotny P, Waldhausl W, Marette A, Roden M (2005b) Overactivation of S6 kinase 1 as a cause of human insulin resistance during increased amino acid availability. Diabetes 54:2674-2684

Tremblay F, Lavigne C, Jacques H, Marette A (2001a) Defective insulin-induced GLUT4 translocation in skeletal muscle of high fat-fed rats is associated with alterations in both Akt/protein kinase B and atypical protein kinase C (zeta/lambda) activities. Diabetes 50:1901-1910

Tremblay F, Lavigne C, Jacques H, Marette A (2007b) Role of dietary proteins and amino acids in the pathogenesis of insulin resistance. Annual Review of Nutrition 27:293-310

Tremblay F, Marette A (2001b) Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway. A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells. Journal of Biological Chemistry 276:38052-38060

Tschopp O, Yang Z-Z, Brodbeck D, Dummmler BA, Hemmings-Mieszczak M, Watanabe T, Michaelis T, Frahm J, Hemmings BA (2005) Essential role of protein kinase B γ (PKB γ /Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* 132:2943-2954

Um SH, D'Alessio D, Thomas G (2006) Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. *Cell Metabolism* 3:393-402

Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, Fumagalli S, Allegrini PR, Kozma SC, Auwerx J, Thomas G (2004) Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431:200-205

Valovka T, Verdier F, Cramer R, Zhyvoloup A, Fenton T, Rebholz H, Wang M-L, Gzhegotsky M, Lutsyk A, Matsuka G, Filonenko V, Wang L, Proud CG, Parker PJ, Gout IT (2003) Protein kinase C phosphorylates ribosomal protein S6 kinase β II and regulates its subcellular localization. *Molecular and Cellular Biology* 23:852-863

van de Werve G, Lange A, Newgard C, Mechin M-C, Li Y, Berteloot A (2000) New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose 6-phosphatase system. *European Journal of Biochemistry* 267:1533-1549

Vandeputte M, Launey S (2004) The genetic management of fish domestication. *INRA Productions Animales* 17:237-242

Vander Haar E, Lee S-i, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim D-H (2007) Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nature Cell Biology* 9:316-323

Vander Kooi BT, Streeper RS, Svitek CA, Oeser JK, Powell DR, O'Brien RM (2003) The three insulin response sequences in the glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene promoter are functionally distinct. *Journal of Biological Chemistry* 278:11782-11793

Vanhaesebroeck B, Alessi DR (2000) The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochemical Journal* 346 Pt 3:561-576

Vanhaesebroeck B, Waterfield MD (1999) Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Experimental Cell Research* 253:239-254

Verbrugghe A, Hesta M, Van Weyenberg S, Papadopoulos GA, Gommeren K, Daminet S, Bosmans T, Polis I, Buyse J, Janssens GP (2010) The glucose and insulin response to isoenergetic reduction of dietary energy sources in a true carnivore: the domestic cat (*Felis catus*). *British Journal of Nutrition*:1-8

Vilhelmsson OT, Martin SA, Medale F, Kaushik SJ, Houlihan DF (2004) Dietary plant-protein substitution affects hepatic metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *British Journal of Nutrition* 92:71-80

Virkamäki A, Ueki K, Kahn CR (1999) Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation* 103:931-943

Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *Journal of Biological Chemistry* 269:5241-5248

Walton MJ (1986) Metabolic effects of feeding high protein-low carbohydrate-diet as compared to low protein-high carbohydrate-diet to rainbow-trout *salmo-gairdneri*. *Fish Physiology and Biochemistry* 1:7-15

Walton MJ, Cowey CB (1982) Aspects of intermediary metabolism in salmonid fish. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 73:59-79

Walton MJ, Cowey CB (1979) Gluconeogenesis from serine in rainbow-trout *salmo-gairdneri* liver. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 62:497-499

Wang D, Sul HS (1998) Insulin Stimulation of the Fatty Acid Synthase Promoter Is Mediated by the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 273:25420-25426

Wang D, Sul HS (1995) Upstream Stimulatory Factors Bind to Insulin Response Sequence of the Fatty Acid Synthase Promoter. USF1 is regulated. *Journal of Biological Chemistry* 270:28716-28722

Wang L, Harris TE, Roth RA, Lawrence JC (2007) PRAS40 Regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *Journal of Biological Chemistry* 282:20036-20044

Wang LM, Myers MG, Jr., Sun XJ, Aaronson SA, White M, Pierce JH (1993) IRS-1: essential for insulin- and IL-4-stimulated mitogenesis in hematopoietic cells. *Science* 261:1591-1594

Wang X, Sato R, Brown MS, Hua X, Goldstein JL (1994) SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell* 77:53-62

Wang Z, Thurmond DC (2009) Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *Journal of Cell Science* 122:893-903

Watanabe T, Aoki H, Shimamoto K, Hadzuma M, Maita M, Yamagata Y, Kiron V, Satoh S (1998) A trial to culture yellowtail with non-fishmeal diets. *Fisheries Science* 64:505-512

Watanabe T, Verakunpiriya V, Watanabe K, Kiron V, Satoh S (1997) Feeding of rainbow trout with non-fish meal diets. *Fisheries Science* 63:258-266

Webster C, Lim C, Lee S-C (2007) Use of alternative protein sources in aquaculture diets. The Haworth Press, Inc, New York, USA.

White MF (1997) The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40:S2-S17

Whiteman EL, Cho H, Birnbaum MJ (2002) Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 13:444-451

Wick MJ, Wick KR, Chen H, He H, Dong LQ, Quon MJ, Liu F (2002) Substitution of the autophosphorylation site Thr516 with a negatively charged residue confers constitutive activity to mouse 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in cells. *Journal of Biological Chemistry* 277:16632-16638

Wilson JE (2003) Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *Journal of Experimental Biology* 206:2049-2057

Wilson RP (1994) Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture* 124:67-80

Woo S-Y, Kim D-H, Jun C-B, Kim Y-M, Haar EV, Lee S-i, Hegg JW, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim D-H (2007) PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling. *Journal of Biological Chemistry* 282:25604-25612

Wu G (2009) Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 37:1-17

Yabe D, Brown MS, Goldstein JL (2002) Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:12753-12758

Yamada K, Noguchi T (1999) Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *Biochemical Journal* 337 (Pt 1):1-11

Yang Q, Inoki K, Ikenoue T, Guan K-L (2006) Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. *Genes and Development* 20:2820-2832

Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, Goldstein JL, Brown MS (2002) Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 110:489-500

Yellaturu CR, Deng X, Park EA, Raghow R, Elam MB (2009) Insulin enhances the biogenesis of nuclear sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c by posttranscriptional down-regulation of insig-2A and its dissociation from SREBP cleavage-activating protein (SCAP)-SREBP-1c complex. *Journal of Biological Chemistry* 284:31726-31734

Yenush L, Makati KJ, Smith-Hall J, Ishibashi O, Myers MG, White MF (1996) The pleckstrin homology domain is the principle link between the insulin receptor and IRS-1. *Journal of Biological Chemistry* 271:24300-24306

Yoshizawa F (2004) Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313:417-422

Zhang P, McGrath BC, Reinert J, Olsen DS, Lei L, Gill S, Wek SA, Vattam KM, Wek RC, Kimball SR, Jefferson LS, Cavener DR (2002) The GCN2 eIF2 α kinase is required for adaptation to amino acid deprivation in mice. *Molecular and Cellular Biology* 22:6681-6688

Zheng Y, Bagrodia S, Cerione RA (1994) Activation of phosphoinositide 3-kinase activity by Cdc42Hs binding to p85. *Journal of Biological Chemistry* 269:18727-18730

Zhong B, Sakai S, Saeki T, Kanamoto R (2007) Excess leucine intake induces serine dehydratase in rat liver. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71:2614-2617

Zick Y (2001) Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends in Cell Biology* 11:437-441.

Zick Y (2005) Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. *Sci STKE* 2005:pe4

ANNEXES

Insulin regulates the expression of several metabolism-related genes in the liver and primary hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Elisabeth Plagnes-Juan, Marine Lansard, Iban Seilliez, Françoise Médale, Geneviève Corraze, Sadasivam Kaushik, Stéphane Panserat and Sandrine Skiba-Cassy*

INRA, UMR 1067 Nutrition Aquaculture and Génomique, Pôle d'hydrobiologie, CD 918, F-64310 Saint Pée-sur-Nivelle, France

*Author for correspondence (e-mail: skiba@st-pee.inra.fr)

Accepted 14 May 2008

SUMMARY

Rainbow trout have a limited ability to use dietary carbohydrates efficiently and are considered to be glucose intolerant. Administration of carbohydrates results in persistent hyperglycemia and impairs post-prandial down regulation of gluconeogenesis despite normal insulin secretion. Since gluconeogenic genes are mainly under insulin control, we put forward the hypothesis that the transcriptional function of insulin as a whole may be impaired in the trout liver. In order to test this hypothesis, we performed intraperitoneal administration of bovine insulin to fasted rainbow trout and also subjected rainbow trout primary hepatocytes to insulin and/or glucose stimulation. We demonstrate that insulin was able to activate Akt, a key element in the insulin signaling pathway, and to regulate hepatic metabolism-related target genes both *in vivo* and *in vitro*. In the same way as in mammals, insulin decreased mRNA expression of gluconeogenic genes, including glucose 6-phosphatase (G6Pase), fructose 1,6-bisphosphatase (FBPase) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK). Insulin also limited the expression of carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1), a limiting enzyme of fatty acid β -oxidation. *In vitro* studies revealed that, as in mammals, glucose is an important regulator of some insulin target genes such as the glycolytic enzyme pyruvate kinase (PK) and the lipogenic enzyme fatty acid synthase (FAS). Interestingly, glucose also stimulates expression of glucokinase (GK), which has no equivalent in mammals. This study demonstrates that insulin possesses the intrinsic ability to regulate hepatic gene expression in rainbow trout, suggesting that other hormonal or metabolic factors may counteract some of the post-prandial actions of insulin.

Key words: insulin, liver, hepatocytes, gene expression, rainbow trout.

INTRODUCTION

Carnivorous fish such as rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) are characterized by a limited ability to use dietary carbohydrates efficiently (Wilson, 1994) and are thus considered to be 'glucose intolerant' (Hemre et al., 2002; Moon, 2001). Oral or intravenous administration of glucose and a carbohydrate-rich diet result in persistent hyperglycemia in various fish species, including rainbow trout (Bergot, 1979; del sol Novoa et al., 2004; Legate et al., 2001; Palmer and Ryman, 1972; Parrizas et al., 1994b), and are also associated with an increase in insulin levels. The magnitude of the insulin response is very fish-species dependent and less than that in mammals (Furuichi and Yone, 1981). Insulin receptors are also present in major insulin-responsive tissues in fish, i.e. white muscle, liver and adipose tissues (Gutierrez et al., 1991; Navarro et al., 1999). Up-regulation of insulin binding and tyrosine kinase activity have been observed after insulin treatment and a carbohydrate-rich diet, respectively (Banos et al., 1998; Gutierrez et al., 1991; Parrizas et al., 1994a; Parrizas et al., 1994b). The persistent hyperglycemia in rainbow trout fed with carbohydrates despite the existence of insulin secretion and receptors suggests an insulin resistance state comparable to that observed in humans with type II diabetes.

Glucose uptake mediated by the facilitative insulin-regulated glucose transporter GLUT4 homologue in white muscle and fat tissues and by GLUT2 in the liver has been reported in trout (Capilla et al., 2002; Diaz et al., 2007a; Diaz et al., 2007b; Krasnov et al.,

2001). Fish glucose transporters GLUT2 and GLUT4 are characterized by a lower affinity for glucose, which may at least partly explain the persistent post-prandial hyperglycemia observed in trout fed with carbohydrates (Capilla et al., 2004a; Krasnov et al., 2001). At the metabolic level, most of the key enzymes involved in carbohydrate metabolism have been described in fish (Cowey and Walton, 1989). For some of these, including glucokinase (liver), phosphofructokinase (liver and muscle) and pyruvate kinase (liver and muscle), their induction by dietary carbohydrates is similar to that described in mammalian systems (Fideu et al., 1983; Panserat et al., 2001a; Panserat et al., 2000b). However, findings concerning other metabolic mediators of glucose metabolism suggest the existence of atypical regulation after carbohydrate intake by trout, i.e. a lower capacity for glucose phosphorylation by hexokinases in the muscle of fish than in mammalian species, as confirmed by the poor role of exogenous glucose as a glycogenic substrate in trout muscle (Kam and Milligan, 2006; Kirchner et al., 2005; Wilson, 1994). Moreover, in rainbow trout a carbohydrate-rich diet does not affect the activity or gene expression of key enzymes of gluconeogenesis such as glucose 6-phosphatase (G6Pase), fructose 1,6-bisphosphatase (FBPase) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) (Panserat et al., 2001b; Panserat et al., 2000a; Panserat et al., 2001c; Tranulis et al., 1991). Such impaired post-prandial down regulation of gluconeogenesis in rainbow trout fed with carbohydrates is similar to that observed in human patients with type II diabetes. In healthy patients insulin lowers plasma

glucose levels by inducing plasma glucose uptake into skeletal muscle and adipose tissues and by inhibiting endogenous hepatic production of glucose. In mammals, gluconeogenic genes are mainly under insulin control (Barthel and Schmoll, 2003b). Insulin inhibits expression of PEPCK and G6Pase enzymes at the transcriptional level (Barthel and Schmoll, 2003a) through the activation of the protein kinase Akt (also known as protein kinase B) (Liao et al., 1998; Schmoll, 2000), a critical node in the insulin signaling pathway (Taniguchi et al., 2006). Because of insulin resistance, patients with type II diabetes present fasting hyperglycemia that is correlated with an increased glucose production by the liver. This is illustrated by the higher level of expression of two key enzymes of hepatic gluconeogenesis, PEPCK and G6Pase. As observed in these diabetic patients, the absence of post-prandial inhibition of hepatic gluconeogenesis in rainbow trout probably contributes to persistent hyperglycemia. The reason for the persistent post-prandial endogenous production of glucose in rainbow trout therefore remains to be elucidated.

Thus, we put forward the hypothesis that the glucose intolerance observed in rainbow trout may be related to the impaired ability of insulin to regulate mRNA levels of hepatic target genes. In order to test this hypothesis, we performed intraperitoneal administration of bovine insulin ($10 \mu\text{kg}^{-1}$) to 48 h-fasted rainbow trout and analyzed the activation of Akt and the mRNA levels of genes involved in gluconeogenesis (PEPCK, G6Pase and FBPase). Since regulation of target gene expression by insulin may be more widely impaired in rainbow trout, the study was enlarged to include other hepatic genes identified as being under insulin control in mammals. We therefore also analyzed the insulin regulation of the mRNA expression of glucokinase (GK) and pyruvate kinase (PK), which catalyse the phosphorylation of glucose and the conversion of phosphoenolpyruvate to pyruvate, the first and the final steps in glycolysis, respectively (Towle et al., 1997). We also investigated the regulation of mRNAs encoding two proteins involved in fatty acid metabolism, i.e. fatty acid synthase (FAS), which promotes the synthesis of fatty acids, primarily palmitate, through the condensation of malonyl-CoA and acetyl-CoA (Smith et al., 2003), and carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1), which is a limiting enzyme of fatty acid β -oxidation responsible for the entry of long chain fatty acids into the mitochondria (Bartlett and Eaton, 2004).

Despite the well-established and fully described potential and advantages of fish hepatocyte systems (Moon et al., 1985; Scholz et al., 1998; Segner, 1998a), few studies have used cultured trout hepatocytes to analyze the regulation of intermediary metabolism (Alvarez et al., 2000). In order to rule out the possibility of an indirect effect of insulin and of possible interactions with other endocrine mediators on target gene expression *in vivo*, we used a primary cell culture of rainbow trout hepatocytes to analyze the transcriptional effects of insulin in this model.

MATERIALS AND METHODS

Animals

In vivo and *in vitro* experiments were performed using sexually immature rainbow trout (250–300 g) obtained from the INRA experimental fish farm facilities of Donzacq, France. Fish were maintained in tanks kept in open circuits with 18°C well-aerated water. Fish were fed with a commercial diet (T-3P classic, Trouw, France). All experiments were carried out in accordance with legislation governing the ethical treatment of animals, and investigators were certified by the French Government to carry out animal experiments.

Experimental procedure for *in vivo* studies

To study the regulation of hepatic gene expression by insulin *in vivo*, rainbow trout were placed in two separate tanks. Fish were kept unfed for 48 h before the day of the experiment in order to obtain fish with empty digestive tracts but without onset of body protein degradation. Fasting also allowed us to obtain basal plasma glucose levels and to limit individual variability. On the day of the experiment, fish received an intraperitoneal injection of bovine insulin ($10 \mu\text{kg}^{-1}$ body weight; Sigma, St Louis, MO, USA) as previously described (Salgado et al., 2004) or were sham treated with vehicle (saline). Four fish per tank were left untreated and unfed, and served as controls. At 2, 4 and 6 h after treatment, fish ($N=8$) were killed by cervical section. Blood was collected from the dorsal aorta using a syringe pre-treated with a solution containing 4% NaF and 4% $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$, and centrifuged, and plasma was kept frozen at -20°C until analysis. Liver samples were collected, snap frozen in liquid nitrogen then stored at -80°C prior to further mRNA and protein analyses.

Animals and experimental procedure for *in vitro* studies

Hepatocyte isolation and culture

Isolated liver cells were prepared from 4 day-fasted rainbow trout as previously described by Mommsen and colleagues (Mommsen et al., 1994). Fish were anesthetized by placing them in water containing 60 mg l^{-1} aminobenzoic acid. After *in situ* perfusion using liver perfusion medium ($1\times$; 17701-038, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), livers were excised, minced with a razor blade and immediately digested in a liver digest medium (17703-034, Invitrogen) for 20 min at 18°C . After filtration and centrifugation (120 g , 2 min), the resulting cell pellet was resuspended three successive times in modified Hanks' medium ($136.9 \text{ mmol l}^{-1}$ NaCl, 5.4 mmol l^{-1} KCl, 0.81 mmol l^{-1} MgSO_4 , 0.44 mmol l^{-1} KH_2PO_4 , 0.33 mmol l^{-1} Na_2HPO_4 , 5 mmol l^{-1} NaHCO_3 and 10 mmol l^{-1} Hepes) supplemented with 1.5 mmol l^{-1} CaCl_2 and 1.5% defatted bovine serum albumin (BSA; Sigma), and centrifuged (70 g , 2 min). Cells were finally taken up in modified Hanks' medium supplemented with 1.5 mmol l^{-1} CaCl_2 , 1% defatted BSA, 3 mmol l^{-1} glucose, MEM essential amino acids ($1\times$; Invitrogen), MEM non-essential amino acids ($1\times$; Invitrogen) and antibiotic antimycotic solution ($1\times$; Sigma). Cell viability ($>98\%$) was assessed using the Trypan Blue exclusion method (0.04% in 0.15 mol l^{-1} NaCl) and cells were counted using a hemocytometer. The hepatocyte cell suspension (CS) was plated in a six well Primaria culture dish (BD Biosciences, NJ, USA) at a density of 3×10^6 cells per well and incubated at 18°C . The incubation medium was replaced every 24 h over the 72 h of primary cell culture. Microscopic examination ensured that hepatocytes progressively re-associated throughout culture to form two-dimensional aggregates, in agreement with earlier reports (Ferraris et al., 2002; Segner, 1998b). Cell viability and cytotoxicity were monitored throughout culture using CellTiter 96[®] aqueous one solution cell proliferation assay (Promega, Madison, WI, USA) and CytoTox 96[®] non-radioactive cytotoxicity assay (Promega) respectively, according to the manufacturer's recommendations.

Insulin treatment of hepatocyte primary cell culture

For analysis of Akt phosphorylation, 48 h-cultured hepatocytes were stimulated using $4 \times 10^{-9} \text{ mol l}^{-1}$ bovine insulin (Sigma) for 5, 15, 30 and 60 min [$4 \times 10^{-9} \text{ mol l}^{-1}$ insulin corresponds to the post-prandial level of insulin irrespective of dietary carbohydrate level (del sol Novoa et al., 2004)]. At the end of the stimulation period, cells were collected for protein extraction.

Table 1. Primers used to amplify rainbow trout target genes by conventional RT-PCR

Gene	Primer sequences	Hybridization temperature (°C)	Amplicon size (bp)
<i>InsR</i> (c form)	F: 5'-TCATTGGTGTGGTGCTG-3' R: 5'-CCCGCTTCGTCCCTCTCC-3'	56	413
<i>HNF4</i>	F: 5'-TGCAGGTTTAACCGTCAGTG-3' R: 5'-AGAGTTAGTGCTGGGCTGGA-3'	55	192
<i>AP</i>	F: 5'-ACGAGCCAGGCCACTTCATC-3' R: 5'-TCAGGGCCCATGTGGAAGTT-3'	60	220
<i>TAT</i>	F: 5'-GTCTTCTGCCTGCCCGCTAC-3' R: 5'-GGTCTAGCTCGTTGCTGTCTTG-3'	60	157
<i>STP</i>	F: 5'-CAGCAGCACAGATGGCGTTT-3' R: 5'-GGCCTTTGAGGAGAGCCACA-3'	60	186
<i>GLUT2</i>	F: 5'-CCGTCTTTACCATGGTGTGC-3' R: 5'-CCACAATGAACCAGGGGATG-3'	57	222

R, reverse primer; F, forward primer.
GenBank accession no. or sigenae accession no.: *InsR* (c form; insulin receptor), AF062498; *HNF4* (hepatic nuclear factor 4), tcbk0002c.b.02_5.1.s.om.8; *AP* (serum albumin 1 precursor), tcaa0001c.c.01_5.1.s.om.8; *TAT* (tyrosine aminotransferase), tcay0014b.e.19_3.1.s.om.8; *STP* (serotransferin precursor), tcay0003b.j.14_3.1.s.om.8; *GLUT2* (glucose transporter 2), AF246147.

For gene expression analysis, 48h-cultured cells were exposed for an additional 24h to 4×10^{-9} mol l⁻¹ bovine insulin in the presence of 3 or 20 mmol l⁻¹ glucose, the mean glucose concentrations measured in fasted trout and trout fed the carbohydrate-rich diet, respectively (Bergot, 1979; del sol Novoa et al., 2004; Hemre et al., 2002; Panserat et al., 2001c). Osmotic pressures of insulin–glucose-supplemented cell culture media were verified before each treatment and calibrated to 300 mosmol l⁻¹ using a K7400 osmometer (Knauer, Berlin, Germany). At the end of the stimulation period, cells were collected for total RNA extraction and subsequent RT-PCR analysis.

Determination of plasma glucose levels

Plasma glucose levels were measured with the Glucose RTU kit from BioMerieux (Marcy l'Etoile, France) according to the manufacturer's recommendations.

Gene expression analysis

Total RNA samples were extracted from livers and hepatocytes using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations and treated with DNase to avoid any genomic DNA contamination. A 1 µg sample of the resulting total RNA was reverse transcribed into cDNA using the SuperScript III RnaseH⁻ reverse transcriptase kit (Invitrogen) and oligo dT primers (Promega) according to the manufacturer's instructions.

Conventional RT-PCR analysis

In order to confirm that the cultured cells might be considered as hepatocyte-like cells, expression of hepatocyte-specific genes such as albumin precursor (*AP*), tyrosine amino transferase (*TAT*), hepatic nuclear factor 4 (*HNF4*) and serotransferine precursor (*STP*) was examined by conventional RT-PCR. We also checked the mRNA expression of the glucose transporter (*Glut2*) and the insulin receptor (*InsR*) for further stimulation of these cells by glucose and/or insulin. Expression of these genes was studied in cell suspension as well as after 4, 24, 48 and 72h of culture. For this purpose, cDNA samples were amplified by PCR using specific primers chosen from the Sigenae rainbow trout cDNA sequence public database (<http://www.sigenae.org>; Table 1). The PCR reaction was carried out using 2 µl of cDNA as template in a final reaction volume of 25 µl

containing 1.5 mmol l⁻¹ MgCl₂, 0.16 µmol l⁻¹ of each primer, and 1 U of Taq polymerase (Promega). Samples were subjected to 35 amplification cycles of a standard PCR protocol (94°C for 20s, specific primer hybridization temperature for 20s, and 72°C for 20s). The different PCR products were monitored by sequencing (GENOME Express, Meylan, France) to confirm the nature of the amplicon.

Real time RT-PCR analysis

Gene expression analyses were performed on samples from the livers of control and treated fish 6h after intraperitoneal administration as well as from hepatocytes after 24h of stimulation by insulin and glucose. Target gene expression levels were determined by real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) using specific real-time PCR primers (Table 2). To avoid amplification of genomic DNA, when possible primer pairs included one intron-spanning oligonucleotide. Real-time RT-PCR was carried out on an iCycler iQTM real-time PCR detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using iQTM SYBR[®] Green Supermix. mRNA levels of *GK*, *PK*, *G6Pase* isoforms 1 and 2, *PEPCK*, *FBPase*, *CPT1* isoforms A and B, and *FAS* were evaluated. Elongation factor 1α (*EF1α*) was employed as a non-regulated reference gene as previously used in rainbow trout (Gabillard et al., 2003; Kamangar et al., 2006). The absence of a change in *EF1α* gene expression was also observed in our *in vivo* and *in vitro* studies (data not shown). PCR was performed using 10 µl of the diluted cDNA mixed with 5 pmol of each primer in a final volume of 25 µl. The PCR protocol was initiated at 95°C for 3 min for initial denaturation of the cDNA and hot-start iTaqTM DNA polymerase activation, and continued with a two-step amplification program (20 s at 95°C followed by 30 s at specific primer hybridization temperature) repeated 40 times. Melting curves were systematically monitored (temperature gradient at 0.5°C/10s from 55 to 94°C) at the end of the last amplification cycle to confirm the specificity of the amplification reaction. The different PCR products were initially checked by sequencing to confirm the nature of the amplicon. Each PCR run included replicate samples (duplicate of reverse transcription and duplicate of PCR amplification) and negative controls (reverse transcriptase-free samples, RNA-free samples).

Relative quantification of target gene expression was performed using the mathematical model described by Pfaffl (Pfaffl, 2001). The relative expression ratio (*R*) of a target gene was calculated on the basis of real-time PCR efficiency (*E*) and the CT deviation (ΔCT) of the unknown sample *versus* a control sample, and expressed in comparison to the *EF1α* reference gene:

$$R = \frac{(E_{\text{target gene}})^{\Delta CT_{\text{target gene}} (\text{control-sample})}}{(E_{EF1})^{\Delta CT_{EF1} (\text{control-sample})}}.$$

PCR efficiency (*E*) was measured by the slope of a standard curve using serial dilution of cDNA. All PCR efficiency values were between 85 and 100%.

Protein extraction and Western blotting

Frozen liver (300 mg) and hepatocytes were homogenized on ice with an Ultraturrax homogenizer (IMLAB sarl, Lille, France) in a

buffer containing 150 mmol⁻¹ NaCl, 10 mmol⁻¹ Tris, 1 mmol⁻¹ EGTA, 1 mmol⁻¹ EDTA (pH 7.4), 100 mmol⁻¹ sodium fluoride, 4 mmol⁻¹ sodium pyrophosphate, 2 mmol⁻¹ sodium orthovanadate, 1% Triton X-100, 0.50% NP40-IGEPAL and a protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland). Homogenates were centrifuged at 1000 *g* for 30 min at 4°C and supernatants were then centrifuged for 45 min at 150 000 *g*. The resulting supernatants were aliquoted and stored at -80°C. Protein concentrations were determined using the Bio-Rad protein assay kit. Liver and cell lysates (20 µg of protein) were subjected to SDS-PAGE and Western blotting using anti-phospho-Akt Ser473 and anti-Akt antibodies (Cell Signaling Technology, Ozyme, St Quentin-en-Yvelines, France), consecutively. Rabbit phospho-Akt Ser473 and Akt antibodies were directed against synthetic peptides corresponding to residues surrounding phosphorylated Ser473 of mouse Akt and the carboxyterminal sequence of mouse Akt, respectively. These antibodies have been shown to successfully cross-react with rainbow trout Akt protein (Seiliez et al., 2008). After washing, protein detection was performed by chemiluminescence using LumiGLO reagents (Cell Signaling Technology) and horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG as the secondary antibody (Cell Signaling Technology).

Statistical analysis

The results of *in vivo* mRNA expression analyses are expressed as means ± s.e.m. (*N*=8) and were analyzed by one-way ANOVA. Results from plasma glucose levels (*N*=8) and mRNA expression in primary hepatocyte cell culture (*N*=6) are expressed as means ± s.e.m. and were analyzed by two-way ANOVA. Means were compared by Student–Newman–Keuls multiple comparison test. The level of significance was set at *P*<0.05.

RESULTS

Hypoglycemic effect of insulin administration

Data on plasma glucose levels measured 2, 4 and 6 h after intraperitoneal administration of insulin or saline solution are presented in Fig. 1. Administration of insulin gradually and significantly decreased plasma glucose levels to reach 1.78±0.18 mmol⁻¹ 6 h after intraperitoneal injection compared with saline-treated trout (4.49±0.19 mmol⁻¹). A significant increase in plasma glucose levels was recorded 2 h after administration of saline solution but no further difference between control and vehicle-treated fish was observed 4 and 6 h after the intraperitoneal administration.

Akt phosphorylation after *in vivo* insulin administration

Since insulin signaling is mediated through Akt phosphorylation on threonine 308 and serine 473 in mammals, Western blot analysis was performed to study the phosphorylation of Akt on serine 473 compared with endogenous levels of total Akt in rainbow trout.

Table 2. Primers used to amplify rainbow trout target genes by real-time RT-PCR

Gene	Primer sequences	Hybridization temperature (°C)	Amplicon size (bp)
<i>EF1α</i>	F: 5'-TCCTCTTGGTCGTTTCGCTG-3' R: 5'-ACCCGAGGGACATCCTGTG-3'	59	159
<i>GK</i>	F: 5'-TGAAGGATCAGAGGTGGGTGATT-3' R: 5'-GAAGGTGAAACCCAGAGGAAGC-3'	59	253
<i>PK</i>	F: 5'-CCATCGTCGCGGTAACAAGA-3' R: 5'-ACATAGGAAAGGCCAGGGGC-3'	59	158
<i>mPEPCK</i>	F: 5'-GTTGGTGCTAAAGGGCACAC-3' R: 5'-CCCGTCTTCTGATAAGTCCAA-3'	59	149
<i>G6Pase 1</i>	F: 5'-CTCAGTGCGCAGACAGAAAGG-3' R: 5'-TACACAGCAGCATCCAGAGC-3'	55	77
<i>G6Pase 2</i>	F: 5'-TAGCCATCATGCTGACCAAG-3' R: 5'-CAGAAGAACGCCACAGAGT-3'	55	82
<i>FBPase</i>	F: 5'-GCTGGACCCCTTCCATCGG-3' R: 5'-CGACATAACGCCACCATAGG-3'	59	182
<i>FAS</i>	F: 5'-TGATCTGAAGGCCCGTGTCA-3' R: 5'-GGGTGACGTTGCCGTGGTAT-3'	60	161
<i>CPT1A</i>	F: 5'-TCGATTTTCAAGGGTCTTCG-3' R: 5'-CACAACGATCAGCAAACTGG-3'	55	166
<i>CPT1B</i>	F: 5'-CCCTAAGCAAAAAGGGTCTTCA-3' R: 5'-CATGATGTCACTCCGACAG-3'	55	149

R, reverse primer; F, forward primer.

GenBank accession no. or signae accession no.: *EF1α* (elongation factor 1α), AF498320; *GK* (glucokinase), AF135403; *PK* (pyruvate kinase), AF 246146; *mPEPCK* (phosphoenolpyruvate carboxykinase, mitochondrial isoform), AF246149; *G6Pase 1* (glucose 6-phosphatase 1), tcay0019b.d.18_3.1.s.om.8.1-1693; *G6Pase 2* (glucose 6-phosphatase 2), AF120150; *FBPase* (fructose 1,6-bisphosphatase), AF333188; *FAS* (fatty acid synthase), tcab0001c.e.06_5.1.s.om.8; *CPT1A* (carnitine palmitoyltransferase 1 A), AF 327058; *CPT1B* (carnitine palmitoyltransferase 1 B), AF606076.

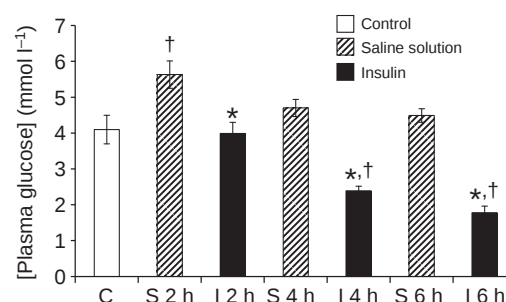


Fig. 1. Plasma glucose levels 2, 4 and 6 h after intraperitoneal administration of insulin (10 µg kg⁻¹; I) or saline solution (S) to 48 h-fasted control rainbow trout (C). Results are expressed as means ± s.e.m. (*N*=8) and were analyzed by two-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls multiple comparison test. *Significant difference between insulin- and saline-treated fish (*P*<0.05). †Significant difference between 48 h-fasted control fish (C) and insulin (I)- or saline (S)-treated fish (*P*<0.05).

As illustrated in Fig. 2A, insulin induced Akt phosphorylation whereas administration of saline solution did not. The phosphorylation of Akt was observed as early as 2 h after intraperitoneal administration of insulin and was maintained until at least 6 h after insulin administration.

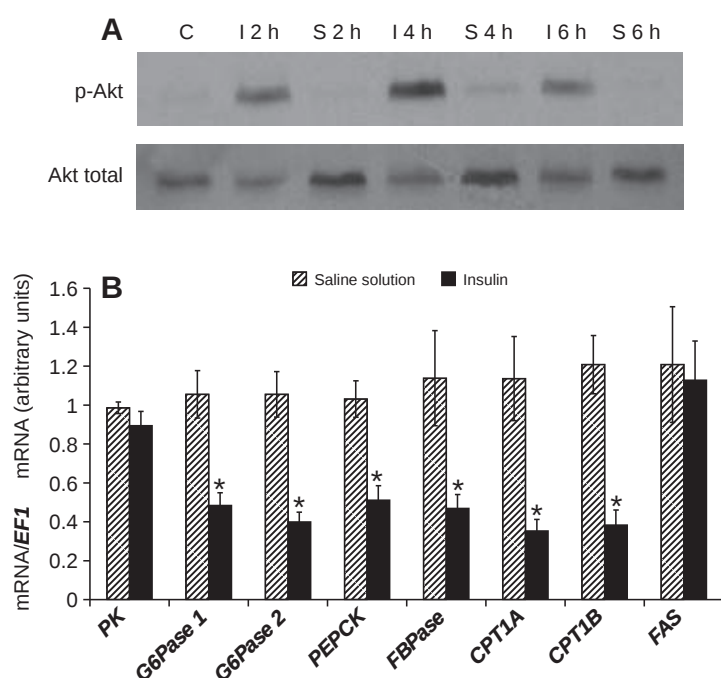


Fig. 2. (A) Western blot analysis of Akt phosphorylation in rainbow trout liver 2, 4 and 6 h after intraperitoneal administration of insulin (I) or saline solution (S) as well as in 48 h-fasted control rainbow trout (C). p-Akt, phosphorylated form of Akt. The gel was loaded with 20 µg of total protein per lane. The figure is a representative blot. Western blots were performed on six individual samples and similar results were obtained. (B) Effects of intraperitoneal administration of insulin (I) or saline solution (S) on the level of expression of mRNA encoding hepatic genes. Pyruvate kinase (PK), glucose 6-phosphatase isoforms 1 and 2 (*G6Pase 1* and *2*), phosphoenolpyruvate carboxykinase (*PEPCK*), fructose 1,6-bisphosphatase (*FBPase*), carnitine palmitoyltransferase 1 isoform A and B (*CPT1 A* and *B*) and fatty acid synthase (*FAS*) mRNA levels were estimated using real-time RT-PCR. Expression values were normalized with elongation factor 1α (*EF1α*)-expressed transcripts and are indicated as fold variation of the saline solution-treated group. Results are expressed as means ± s.e.m. (*N*=6) and were analyzed by one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls comparison test. *Significant difference (*P*<0.05).

Insulin regulation of hepatic gene expression *in vivo*

As illustrated in Fig. 2B, insulin administration significantly decreased the expression of gluconeogenic genes, including both isoforms of *G6Pase* (2.1- and 2.6-fold decrease for *G6Pase 1* and *2*, respectively), *PEPCK* (2.0-fold) and *FBPase* (2.4-fold). Expression of both isoforms of *CPT1* also decreased about 3-fold under insulin treatment. Expression of *FAS* and *PK* mRNA was not affected by administration of insulin or saline solution. *GK* mRNA levels were also measured but were mostly undetectable in either saline or insulin-treated fish (data not shown).

Molecular characterization of hepatocyte primary cell culture

Using end-point RT-PCR we monitored the expression of hepatocyte-specific markers (such as albumin precursor, serotransferin precursor and tyrosine aminotransferase), the hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4) required for hepatocyte differentiation, the hepatocyte-specific glucose transporter GLUT2, and the c form insulin receptor (Fig. 3). Fragments of the expected length were amplified for the albumin precursor, serotransferin precursor, tyrosine aminotransferase, *HNF4* and *GLUT2* genes in cell suspension and in cultured cells over 4 to 72 h. For the c form insulin receptor, the expected 413 bp amplification fragment was detected in cell suspension as well as during the full time course of incubation. However, we also detected the amplification of a larger fragment in cell cultures during the first 24 h. Sequencing of this larger fragment revealed that it corresponded to an alternatively spliced form (data not shown).

Akt phosphorylation after insulin treatment of hepatocyte primary cell culture

To analyze the effects of insulin on the phosphorylation of Akt *in vitro*, 48 h-incubated cells were treated with 4×10^{-9} mol l⁻¹ insulin for 5, 15, 30 and 60 min. After Western blot analysis of phospho-Akt (serine 473), we observed that phosphorylation of Akt occurred as early as 5 min after insulin exposure, while the phosphorylated form of Akt was undetectable in untreated control cells (Fig. 4). Akt

phosphorylation was detected until 60 min of incubation with insulin but the signal declined progressively.

Insulin and glucose regulation of gene expression in cultured hepatocytes

As shown in Fig. 5, we observed that the mRNA level of *GK* was significantly enhanced by both insulin and glucose (average of 1.7- and 1.4-fold, respectively). *PK* and *FAS* gene expression were found

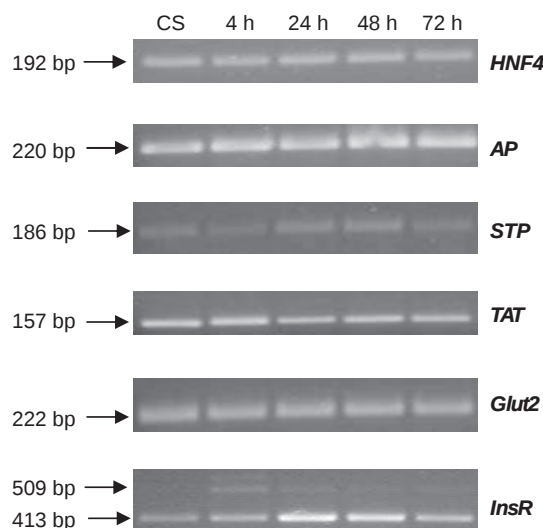


Fig. 3. Expression of hepatic nuclear factor 4 (*HNF4*), albumin precursor (*AP*), serotransferin precursor (*STP*), tyrosine aminotransferase (*TAT*), glucose transporter 2 (*GLUT2*) and insulin receptor (*InsR*) assessed by conventional RT-PCR in cell suspension (CS) and hepatocytes after 4, 24, 48 and 72 h of culture. Expected lengths of the fragments are indicated in the left margin. For *InsR*, a larger fragment (509 bp) was also detected.

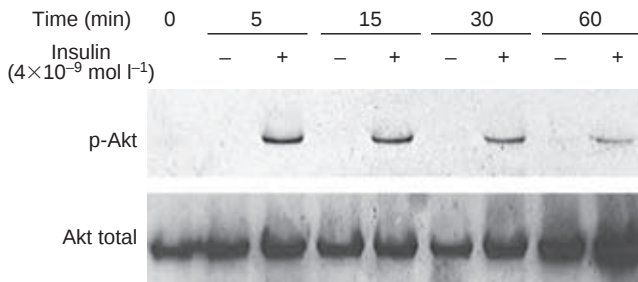


Fig. 4. Induction of Akt phosphorylation in rainbow trout hepatocyte cell culture 5, 15, 30 and 60 min after insulin stimulation. The gel was loaded with 20 µg of total protein per lane. The figure is a representative blot. Western blots were performed on six individual samples and similar results were obtained. p-Akt, phosphorylated form of Akt.

to be regulated in the same way: insulin increased the expression of **PK** and **FAS** genes but the insulin stimulatory effect was enhanced in the presence of 20 mmol l⁻¹ glucose, as indicated by the significant statistical interaction between insulin and glucose. We found that insulin and glucose have opposite effects on the regulation of expression of both isoforms of **G6Pase**. While glucose significantly increased the expression of **G6Pase**, **G6Pase** mRNA levels declined in the presence of insulin. In the absence of insulin, the effect of glucose on **G6Pase** mRNA levels was more pronounced on the first isoform of this gene (3.7-fold increase) than on the second isoform (1.1-fold increase). The level of expression of the **FBPase** gene was not affected by the glucose concentrations tested in this experiment. We recorded a significant increase (1.6-fold) in **FBPase** mRNA level only when cells were incubated with insulin in the presence of 20 mmol l⁻¹ glucose. On investigating the regulation of expression of **PEPCK** (mitochondrial isoform), we found that the **PEPCK** mRNA level was slightly suppressed by glucose in the absence of insulin but strongly reduced by insulin (5.5- and 2-fold, respectively) when cells were incubated with 3 and 20 mmol l⁻¹ glucose. Expression of **CPT1** (isoforms A and B) was almost undetectable in hepatocyte cultures.

DISCUSSION

Unlike in mammals, expression of the gluconeogenic genes is poorly regulated by carbohydrate intake in rainbow trout (Panserat et al., 2001b; Panserat et al., 2000b), suggesting a potentially impaired ability of insulin to regulate the expression of gluconeogenic genes and, more widely, hepatic target genes in teleost carnivorous fish. However, combining both *in vivo* and *in vitro* experiments, we have clearly demonstrated here that insulin is able to regulate the expression of hepatic target genes in rainbow trout.

The *in vivo* study based on intraperitoneal administration of insulin confirmed the ability of exogenous and heterologous insulin to induce hypoglycemia in rainbow trout, as already shown (Albalat et al., 2006; Salgado et al., 2004). *In vivo* insulin administration led not only to the reduction of plasma glucose levels but also to changes in other metabolic and hormonal signals (fatty acids, glucagons, etc.) potentially involved in the regulation of hepatic gene expression. In mammals, glycolytic and lipogenic genes are reciprocally regulated by glucose and fatty acids in liver through molecular mechanisms involving the recently discovered glucose signaling transcription factor carbohydrate-responsive element binding protein (ChREBP) (for a review, see Dentin, 2006). Glucagon increases glucose output by dephosphorylating the CREB (cAMP-responsive element binding protein) coactivator TORC2

(transducer of regulated CREB activity), which is transported to the nucleus where it enhances CREB-dependent transcription of gluconeogenic genes such as **PEPCK** and **G6Pase** (Alan Cheng, 2006). We therefore used primary cell culture of rainbow trout hepatocytes to eliminate the relative contributions of other confounding factors. The study with primary cultured hepatocytes was focused on the contribution of glucose and insulin in the regulation of expression of insulin target genes. Displaying both the expression of genes representative of liver gene expression and the expression of the first mediators of glucose and insulin signaling, this primary hepatocyte culture thus provides a good model for this purpose.

Insulin regulates the transcription of target genes by controlling Akt activation of transcription factors such as Forkhead transcription factors of the FoxO subfamily and transcription factors belonging to the family of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) (Foufelle and Ferre, 2002). Our findings clearly show that insulin was also able to induce Akt phosphorylation in the liver and primary hepatocyte cell culture from rainbow trout, confirming activation of the insulin signaling pathway after insulin treatment both *in vivo* and *in vitro*. These results are in agreement with the recent demonstration that insulin and insulin-like growth factors (IGFs) are able to activate the phosphorylation of Akt in zebra fish embryonic cells (Pozios et al., 2001) as well as in primary cell culture of muscle cells from two different fish species, i.e. rainbow trout and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) (Castillo et al., 2006; Montserrat et al., 2007).

We also demonstrated that activation of the insulin signaling pathway was associated with the regulation of hepatic gene expression both *in vivo* and *in vitro*. For instance, **G6Pase**, **PEPCK** and **FBPase**, three key enzymes of endogenous glucose production (Granner and Pilkis, 1990), presented a significantly lowered gene expression level after insulin treatment. This inhibition was observed not only *in vivo* following intraperitoneal administration of insulin but also *in vitro*, at least for **G6Pase** and **PEPCK**. This suggests a direct effect of insulin on the transcription of these genes that probably involves the activation of FoxO1 and PGC1α transcription factors, as has been described in mammals (Puigserver et al., 2003). However, the effects of insulin on the regulation of gluconeogenic gene expression were studied in animals that presented plasma glucose levels (1.78 ± 0.18 mmol l⁻¹) far below those normally measured in fasted animals (4.10 ± 0.40 mmol l⁻¹) or even in rainbow trout fed with 28% carbohydrates (12.2 mmol l⁻¹) (del sol Novoa et al., 2004). In this context, we also analyzed the effects of insulin on target gene expression in primary hepatocytes in relation to glucose concentrations corresponding to plasma glucose levels of fasted and carbohydrate-fed trout, respectively. Our findings demonstrate that **G6Pase** and **PEPCK** gene expression are subject to regulation by glucose but in opposite ways. Glucose stimulated **G6Pase** gene expression in rainbow trout hepatocytes independently of insulin, as in diabetic rats *in vivo* (Massillon et al., 1996) and *in vitro* (Argaud et al., 1997). Although paradoxical, this may contribute to the maintenance of an appropriate level of G6P, a key regulator of glycogen synthesis and glycolysis, in the face of increased GK activity (Aiston et al., 1999). Glucose also inhibited **PEPCK** gene expression in rainbow trout hepatocytes independently of insulin, but the down-regulating effect of insulin was above that of glucose. The significant inhibition of **PEPCK** gene expression by glucose may be related to the stimulatory effect of glucose on **GK** gene expression. The inhibition of **PEPCK** gene expression by glucose in mammals is mediated through the activation of GK (Scott et al., 1998). However, instead of confirming the inhibition of

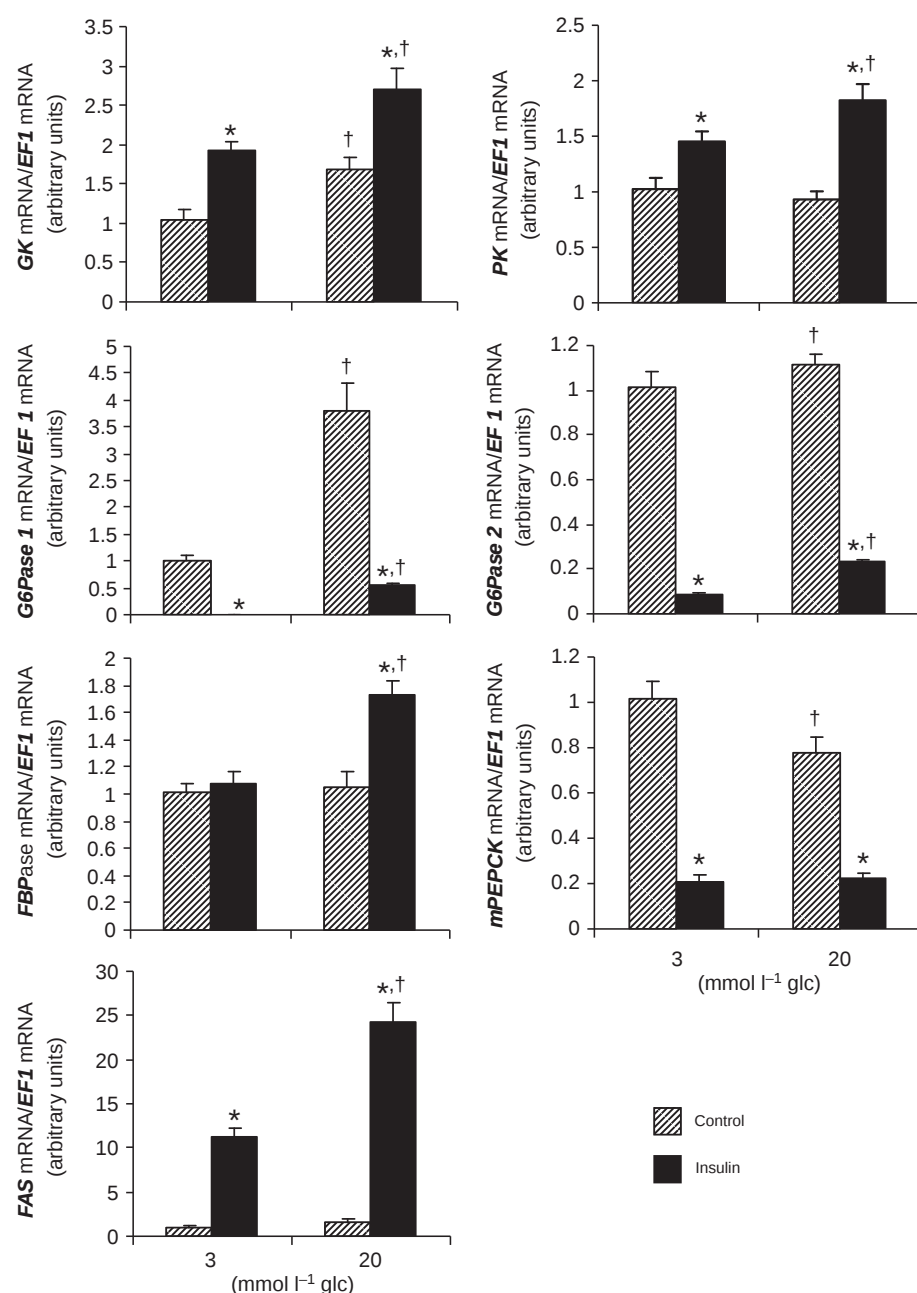


Fig. 5. Effects of insulin and glucose on the expression level of mRNA encoding hepatic genes. Glucokinase (GK), PK, G6Pase 1 and 2, PEPCK, FBPase and FAS mRNA levels were estimated using real-time RT-PCR. The experiment was conducted in 48 h-cultured hepatocytes of rainbow trout incubated for an additional 24 h with (Insulin, filled bars) or without (Control, hatched bars) insulin (4×10^{-9} mol l⁻¹) and in the presence of 3 or 20 mmol l⁻¹ glucose (glc). Expression values are normalized with elongation factor 1 α (EF1 α)-expressed transcripts and are indicated as fold variation of 3 mmol l⁻¹ glucose control condition. Results are expressed as means $\pm$ s.e.m. ($N=6$) and were analyzed by one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls multiple comparison test ($P<0.05$). *Significant effect of insulin. †Significant effect of glucose.

phosphorylated to G6P by glucokinase (Granner and Pilkis, 1990) before being stored as glycogen, transformed into fatty acids or catabolized. Insulin is a major regulator of GK gene expression in the mammalian liver (Iynedjian et al., 1989). In our study GK mRNA was undetectable in fasted rainbow trout, in accordance with previous findings in the same species (Panerat et al., 2001c) and in gilthead sea bream (Caseras et al., 2000). However, intraperitoneal administration of insulin failed to induce GK mRNA expression. In contrast, both glucose and insulin were able to increase GK gene expression in hepatocytes *in vitro* and their effects were additive. This represents the first demonstration that in rainbow trout GK gene expression may be directly regulated by glucose, as to our knowledge this does not occur in mammals. The potential control of GK gene expression by glucose in rainbow trout may provide an explanation for the absence of GK regulation *in vivo* following insulin administration to fasted rainbow trout. Indeed, plasma

glucose levels were so drastically reduced 6 h after intraperitoneal administration of insulin (1.78 ± 0.18 mmol l⁻¹) that the expected effect of insulin was counteracted by the inhibitory effect of the very low glucose level. These results are in agreement with the previous demonstration that GK gene expression was only enhanced when rainbow trout were fed with a single meal of glucose or a carbohydrate-rich diet (Panerat et al., 2000b; Panerat et al., 2001c) whereas insulin secretion was similar in trout fed with high or low carbohydrate diets (Capilla et al., 2004b; del sol Novoa et al., 2004). The regulation of the second glycolytic enzyme that we studied – PK, the last enzyme of glycolysis (Towle et al., 1997) – exhibited a different response under insulin stimulation in *in vivo* and *in vitro* studies. While insulin had no effect on PK gene expression *in vivo*, it enhanced PK mRNA accumulation in the primary hepatocytes. *In vitro*, it was noted that glucose was essential

for the phosphorylation of glucose to G6P by glucokinase (Granner and Pilkis, 1990) before being stored as glycogen, transformed into fatty acids or catabolized. Insulin is a major regulator of GK gene expression in the mammalian liver (Iynedjian et al., 1989). In our study GK mRNA was undetectable in fasted rainbow trout, in accordance with previous findings in the same species (Panerat et al., 2001c) and in gilthead sea bream (Caseras et al., 2000). However, intraperitoneal administration of insulin failed to induce GK mRNA expression. In contrast, both glucose and insulin were able to increase GK gene expression in hepatocytes *in vitro* and their effects were additive. This represents the first demonstration that in rainbow trout GK gene expression may be directly regulated by glucose, as to our knowledge this does not occur in mammals. The potential control of GK gene expression by glucose in rainbow trout may provide an explanation for the absence of GK regulation *in vivo* following insulin administration to fasted rainbow trout. Indeed, plasma

Control of blood glucose levels is closely related to the efficiency of the glycolytic pathway and this, like gluconeogenesis, is under insulin control. Upon entering the hepatocyte, glucose is

to stimulate the positive effect of insulin on **PK** gene expression. Since fish were hypoglycemic 6 h after insulin administration, insulin was not able to stimulate PK gene expression. In fact, in mammals **PK** gene transcription is induced by insulin-stimulated glucose metabolism (Alam and Saggerson, 1998; Towle, 2005). For example, **PK** gene expression is stimulated by glucose in cultured hepatocytes expressing **GK**, independently of insulin (Alam and Saggerson, 1998; Doiron et al., 1994). Finally, we demonstrated that insulin is involved in the control of gene expression of at least the first and last enzymes of glycolysis. However, in contrast to the gluconeogenic genes, it seems that glucose represents an important co-factor in the regulation of expression of **GK** and **PK** genes by insulin in the rainbow trout.

The liver also plays a central role in fatty acid metabolism, and interactions between glucose and lipid metabolism are well characterized (Weickert and Pfeiffer, 2006). Lipogenesis in fish mainly occurs in the liver, which is also a site of lipid catabolism – fatty-acid β -oxidation (Gutierrez et al., 2003). Both mechanisms are known to be under insulin control in mammals. We focused this study on **FAS** and **CPT1**, which are involved in lipid synthesis and degradation, respectively, and have been identified as insulin targets in mammals. Insulin regulation of **FAS** transcription in mammals is mediated by the PI3-kinase/Akt signaling pathway (Sul et al., 2000). In the present study, insulin regulation of rainbow trout **FAS** gene expression was in every way similar to that observed for the **PK** gene. As reported in mammals (Doiron et al., 1994; Sul and Wang, 1998), our results showed that glucose was essential for insulin stimulation of **FAS** gene expression. On the other hand, we demonstrated that **CPT1** gene expression was down regulated in the rainbow trout liver. This down regulation was only shown *in vivo* following administration of insulin since expression of the two isoforms of **CPT1** was undetectable in rainbow trout hepatocytes. Chatelain and colleagues demonstrated that long chain fatty acids markedly increased **CPT1** mRNA level in primary culture of fetal rat hepatocytes (Chatelain et al., 1996). This accumulation resulted from two mechanisms: stimulation of gene transcription and stabilization of the mRNA. Thus the undetectable expression of **CPT1** might be related to the total absence of fatty acids in our culture medium. However, our *in vivo* results were consistent with a previous study showing that insulin decreased the **CPT1** mRNA level in rat H4IIE hepatoma cells (Park et al., 1995). Finally, the regulation of **FAS** and **CPT1** gene expression by insulin and glucose in fish was on the whole consistent with what happens in mammals.

Perspective and significance

Based on earlier findings showing the absence of post-prandial inhibition of gluconeogenic gene expression (Panserat et al., 2001b; Panserat et al., 2000b), and since insulin represents the main regulator of the expression of these genes, we investigated whether the ability of insulin to control gluconeogenic gene expression was impaired in fish. As we thought that the transcriptional effect of insulin may be affected in its entirety, we enlarged the study to other hepatic insulin target genes. By combining *in vivo* and *in vitro* approaches, we clearly demonstrated that in the rainbow trout insulin possesses the intrinsic ability to activate its signaling pathway and regulate expression of hepatic target genes, including gluconeogenic genes. The absence of post-prandial regulation of hepatic gluconeogenic gene expression cannot therefore be directly attributed to a fault in insulin signaling *per se*. However, the mechanisms involved in the regulation of metabolism often depend on the cross-talk between nutritional and hormonal signals. This study revealed the importance that other factors, including nutrients

such as glucose, may have in the insulin regulation of target gene expression. In mammals, excessive dietary proteins and amino acids have detrimental effects on glucose homeostasis by promoting insulin resistance and increasing gluconeogenesis (Tremblay et al., 2005). One particular feature of the rainbow trout diet is that total protein content may exceed 45% of the dry matter. This consistently high dietary amino acid intake can thus have undesirable effects on insulin sensitivity, particularly on insulin-regulated gene expression. This could explain the absence of post-prandial down regulation of the expression of insulin target genes such as **G6Pase** and **PEPCK** and the restoration of their inhibition by reducing dietary protein levels (Kirchner et al., 2003). Further experiments are needed to examine this hypothesis and to analyze the effects of excessive amino acids on the regulation of the hepatic target gene by insulin.

We thank F. Terrier, F. Sandres and Y. Hontang for their assistance at the experimental fish farm, and V. Gentil, M. Saint Laurent and C. Delcambre for technical assistance. This study was supported by the European Commission 'Perspectives of Plant Protein use in Aquaculture' (PEPPA) FAIR-no. QLK5-2000-30068, 'Sustainable Aquafeeds to Maximise the Health Benefits of Farmed Fish for Consumers' (AQUAMAX no. 016249-2) and the Aquitaine region (no. 20061203001 and CCRRDT-2002-0308002C). The European Commission provided a fellowship to M.L. (AQUAMAX no. 016249-2).

REFERENCES

- Aiston, S., Trinh, K. Y., Lange, A. J., Newgard, C. B. and Agius, L. (1999). Glucose-6-phosphatase overexpression lowers glucose 6-phosphate and inhibits glycogen synthesis and glycolysis in hepatocytes without affecting glucokinase translocation. Evidence against feedback inhibition of glucokinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 24559-24566.
- Alam, N. and Saggerson, E. D. (1998). Malonyl-CoA and the regulation of fatty acid oxidation in soleus muscle. *Biochem. J.* **334**, 233-241.
- Alan Cheng, A. R. S. (2006). More TORC for the gluconeogenic engine. *BioEssays* **28**, 231-234.
- Albalat, A., Sanchez-Gurmaches, J., Gutierrez, J. and Navarro, I. (2006). Regulation of lipoprotein lipase activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues. *Gen. Comp. Endocrinol.* **146**, 226-235.
- Alvarez, M. J., Diez, A., Lopez-Bote, C., Gallego, M. and Bautista, J. M. (2000). Short-term modulation of lipogenesis by macronutrients in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Br. J. Nutr.* **84**, 619-628.
- Argaud, D., Kirby, T. L., Newgard, C. B. and Lange, A. J. (1997). Stimulation of glucose-6-phosphatase gene expression by glucose and fructose-2,6-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **272**, 12854-12861.
- Banos, N., Baro, J., Castejon, C., Navarro, I. and Gutierrez, J. (1998). Influence of high-carbohydrate enriched diets on plasma insulin levels and insulin and IGF-I receptors in trout. *Regul. Pept.* **77**, 55-62.
- Barthel, A. and Schmoll, D. (2003a). Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am. J. Physiol.* **285**, E685-E692.
- Barthel, A. and Schmoll, D. (2003b). Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *AACN Clin. Issues* **285**, E685-E692.
- Bartlett, K. and Eaton, S. (2004). Mitochondrial beta-oxidation. *Eur. J. Biochem.* **271**, 462-469.
- Bergot, F. (1979). Effects of dietary carbohydrates and of their mode of distribution on glycaemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri richardson*). *Comp. Biochem. Physiol. A* **64**, 543-547.
- Capilla, E., Diaz, M., Gutierrez, J. and Planas, J. V. (2002). Physiological regulation of the expression of a GLUT4 homolog in fish skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* **283**, E44-E49.
- Capilla, E., Diaz, M., Albalat, A., Navarro, I., Pessin, J. E., Keller, K. and Planas, J. V. (2004a). Functional characterization of an insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) from fish adipose tissue. *Am. J. Physiol.* **287**, E348-E357.
- Capilla, E., Medale, F., Panserat, S., Vachot, C., Rema, P., Gomes, E., Kaushik, S., Navarro, I. and Gutierrez, J. (2004b). Response of hexokinase enzymes and the insulin system to dietary carbohydrates in the common carp, *Cyprinus carpio*. *Reprod. Nutr. Dev.* **44**, 233-242.
- Caseras, A., Meton, I., Fernandez, F. and Baanante, I. V. (2000). Glucokinase gene expression is nutritionally regulated in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Biochim. Biophys. Acta* **1493**, 135-141.
- Castillo, J., Ammendrup-Johnsen, I., Codina, M., Navarro, I. and Gutierrez, J. (2006). IGF-I and insulin receptor signal transduction in trout muscle cells. *Am. J. Physiol.* **290**, R1683-R1690.
- Chatelain, F., Kohl, C., Esser, V., McGarry, J. D., Girard, J. and Pegorier, J.-P. (1996). Cyclic AMP and fatty acids increase carnitine palmitoyltransferase I gene transcription in cultured fetal rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **235**, 789-798.
- Cowey, C. and Walton, M. (1989). Intermediary metabolism. In *Intermediary Metabolism* (ed. Cowey, C. and Walton, M.), pp. 259-329. New York: Academic Press.
- del sol Novoa, M., Capilla, E., Rojas, P., Baro, J., Gutierrez, J. and Navarro, I. (2004). Glucagon and insulin response to dietary carbohydrate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **139**, 48-54.
- Dentin, R., Denechaud, P.-D., Benhamed, F., Girard, J. and Postic, C. (2006). Hepatic gene regulation by glucose and polyunsaturated fatty acids: A role for ChREBP. *J. Nutr.* **136**, 1145-1149.

- Diaz, M., Capilla, E. and Planas, J. V. (2007a). Physiological regulation of glucose transporter (GLUT4) protein content in brown trout (*Salmo trutta*) skeletal muscle. *J. Exp. Biol.* **210**, 2346-2351.
- Diaz, M., Antonescu, C. N., Capilla, E., Klip, A. and Planas, J. V. (2007b). Fish glucose transporter (GLUT)-4 differs from rat GLUT4 in its traffic characteristics but can translocate to the cell surface in response to insulin in skeletal muscle cells. *Endocrinology* **148**, 5248-5257.
- Doiron, B., Cuif, M., Kahn, A. and Diaz-Guerra, M. (1994). Respective roles of glucose, fructose, and insulin in the regulation of the liver-specific pyruvate kinase gene promoter. *J. Biol. Chem.* **269**, 10213-10216.
- El-Maghrabi, M. R., Pilkis, J., Marker, A. J., Colosia, A. D., D'Angelo, G., Fraser, B. A. and Pilkis, S. J. (1988). cDNA sequence of rat liver fructose-1,6-bisphosphatase and evidence for down-regulation of its mRNA by insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8430-8434.
- El-Maghrabi, M., Lange, A., Kummel, L. and Pilkis, S. (1991). The rat fructose-1,6-bisphosphatase gene. Structure and regulation of expression. *J. Biol. Chem.* **266**, 2115-2120.
- Ferraris, M., Radice, S., Catalani, P., Francolini, M., Marabini, L. and Chiesara, E. (2002). Early oxidative damage in primary cultured trout hepatocytes: a time course study. *Aquat. Toxicol.* **59**, 283-296.
- Fideu, M. D., Soler, G. and Ruiz-Amil, M. (1983). Nutritional regulation of glycolysis in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Comp. Biochem. Physiol.* **B 74**, 795-799.
- Foufelle, F. and Ferre, P. (2002). New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem. J.* **366**, 377-391.
- Furuichi, M. and Yone, Y. (1981). Change of blood sugar and plasma insulin levels of fishes in glucose tolerance test. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **47**, 761-764.
- Gabillard, J. C., Weil, C., Rescan, P. Y., Navarro, I., Gutierrez, J. and Le Bail, P. Y. (2003). Environmental temperature increases plasma GH levels independently of nutritional status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **133**, 17-26.
- Granner, D. and Pilkis, S. (1990). The genes of hepatic glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* **265**, 10173-10176.
- Gutierrez, S., Damon, M., Panserat, S., Kaushik, S. and Medale, F. (2003). Cloning and tissue distribution of a carnitine palmitoyltransferase I gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.* **B 135**, 139-151.
- Gutierrez, J., Asgard, T., Fabbri, E. and Plisetskaya, E. M. (1991). Insulin-receptor binding in skeletal-muscle of trout. *Fish Physiol. Biochem.* **9**, 351-360.
- Hemre, G.-I., Mommsen, T. P. and Kroghdahl, A. (2002). Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquac. Nutr.* **8**, 175-194.
- Iynedjian, P. B., Jotterand, D., Nouspikel, T., Asfari, M. and Pilot, P. R. (1989). Transcriptional induction of glucokinase gene by insulin in cultured liver cells and its repression by the glucagon-cAMP system. *J. Biol. Chem.* **264**, 21824-21829.
- Kam, J. C. and Milligan, C. L. (2006). Fuel use during glycogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) white muscle studied *in vitro*. *J. Exp. Biol.* **209**, 871-880.
- Kamangar, B. B., Gabillard, J. C. and Bobe, J. (2006). Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-1, -2, -3, -4, -5, and -6 and IGFBP-related protein 1 during rainbow trout postvitellogenesis and oocyte maturation: molecular characterization, expression profiles, and hormonal regulation. *Endocrinology* **147**, 2399-2410.
- Kirchner, S., Kaushik, S. and Panserat, S. (2003). Low protein intake is associated with reduced hepatic gluconeogenic enzyme expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Nutr.* **133**, 2561-2564.
- Kirchner, S., Seixas, P., Kaushik, S. and Panserat, S. (2005). Effects of low protein intake on extra-hepatic gluconeogenic enzyme expression and peripheral glucose phosphorylation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.* **B 140**, 333-340.
- Krasnov, A., Teerijoki, H. and Molsa, H. (2001). Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatic glucose transporter. *Biochim. Biophys. Acta* **1520**, 174-178.
- Legate, N.J., Bonen, A. and Moon, T. W. (2001). Glucose tolerance and peripheral glucose utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), American eel (*Anguilla rostrata*), and black bullhead catfish (*Ameiurus melas*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **122**, 48-59.
- Liao, J., Barthel, A., Nakatani, K. and Roth, R. A. (1998). Activation of protein kinase B/Akt is sufficient to repress the glucocorticoid and cAMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *J. Biol. Chem.* **273**, 27320-27324.
- Massillon, D., Barzilai, N., Chen, W., Hu, M. and Rossetti, L. (1996). Glucose regulates *in vivo* glucose-6-phosphatase gene expression in the liver of diabetic rats. *J. Biol. Chem.* **271**, 9871-9874.
- Mommsen, T. P., Moon, T. W. and Walsh, T. J. (1994). Hepatocytes: isolation, maintenance and utilization. In *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* (ed. Hochachka, P. W. and Mommsen, T. P.). Amsterdam: Elsevier Science B.V.
- Montserrat, N., Gabillard, J. C., Capilla, E., Navarro, M. I., Gutierrez, J. and Kamangar, B. B. (2007). Role of insulin, insulin-like growth factors, and muscle regulatory factors in the compensatory growth of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). Coordinated regulation of the GH/IGF system genes during refeeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **150**, 462-472.
- Moon, T. W. (2001). Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comp. Biochem. Physiol.* **B 129**, 243-249.
- Moon, T. W., Walsh, T. J. and Mommsen, T. P. (1985). Fish hepatocytes: a model metabolic system. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **42**, 1772-1782.
- Navarro, I., Leibush, B., Moon, T. W., Plisetskaya, E. M., Banos, N., Mendez, E., Planas, J. V. and Gutierrez, J. (1999). Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and glucagon: the evolution of their receptors. *Comp. Biochem. Physiol.* **B 122**, 137-153.
- Palmer, T. N. and Ryman, B. E. (1972). Studies on oral glucose intolerance in fish. *J. Fish Biol.* **4**, 311-319.
- Panaserat, S., Medale, F., Breque, J., Plagnes-Juan, E. and Kaushik, S. (2000a). Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Nutr. Biochem.* **11**, 22-29.
- Panaserat, S., Medale, F., Blin, C., Breque, J., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., Gomes, E., Krishnamoorthy, R. and Kaushik, S. (2000b). Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream, and common carp. *Am. J. Physiol.* **278**, R1164-R1170.
- Panaserat, S., Plagnes-Juan, E. and Kaushik, S. (2001a). Nutritional regulation and tissue specificity of gene expression for proteins involved in hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* **204**, 2351-2360.
- Panaserat, S., Plagnes-Juan, E., Breque, J. and Kaushik, S. (2001b). Hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression is not repressed by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* **204**, 359-365.
- Panaserat, S., Capilla, E., Gutierrez, J., Frappart, P. O., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., Aguirre, P., Breque, J. and Kaushik, S. (2001c). Glucokinase is highly induced and glucose-6-phosphatase poorly repressed in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a single meal with glucose. *Comp. Biochem. Physiol.* **B 128**, 275-283.
- Park, E. A., Mynatt, R. L., Cook, G. A. and Kashfi, K. (1995). Insulin regulates enzyme activity, malonyl-CoA sensitivity and mRNA abundance of hepatic carnitine palmitoyltransferase-I. *Biochem. J.* **310**, 853-858.
- Parizas, M., Planas, J., Plisetskaya, E. M. and Gutierrez, J. (1994a). Insulin binding and receptor tyrosine kinase activity in skeletal muscle of carnivorous and omnivorous fish. *Am. J. Physiol.* **266**, R1944-R1950.
- Parizas, M., Banos, N., Baro, J., Planas, J. and Gutierrez, J. (1994b). Up-regulation of insulin binding in fish skeletal muscle by high insulin levels. *Regul. Pept.* **53**, 211-222.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, E45-E45.
- Pozios, K. C., Ding, J., Degger, B., Upton, Z. and Duan, C. (2001). IGFs stimulate zebrafish cell proliferation by activating MAP kinase and PI3-kinase-signaling pathways. *Am. J. Physiol.* **280**, R1230-R1239.
- Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C. J., Yoon, J. C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D. and Spiegelman, B. M. (2003). Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1[alpha] interaction. *Nature* **423**, 550-555.
- Salgado, M. C., Meton, I., Egea, M. and Baanante, I. V. (2004). Transcriptional regulation of glucose-6-phosphatase catalytic subunit promoter by insulin and glucose in the carnivorous fish, *Sparus aurata*. *J. Mol. Endocrinol.* **33**, 783-795.
- Schmoll, D. (2000). Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase B[alpha] and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. *J. Biol. Chem.* **275**, 36324-36333.
- Scholz, S., Braunbeck, T. and Segner, H. (1998). Viability and differential function of rainbow trout liver cells in primary culture: coculture with two permanent fish cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **34**, 762-771.
- Scott, D. K., O'Doherty, R. M., Stafford, J. M., Newgard, C. B. and Granner, D. K. (1998). The repression of hormone-activated PECK gene expression by glucose is insulin-independent but requires glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* **273**, 24145-24151.
- Segner, H. (1998a). Fish cell lines as a tool in aquatic toxicology. In *Fish Ecotoxicology* (ed. Braunbeck, T., Hinton, D. E. and Streit, D. E.), pp. 1-38. Basel: Birkhäuser Verlag.
- Segner, H. (1998b). Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* **A 120**, 71-81.
- Seiliez, I., Panaserat, S., Skiba-Cassy, S., Fricot, A., Vachot, C., Kaushik, S. and Tesseraud, S. (2008). Feeding status regulates the polyubiquitination step of the ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle. *J. Nutr.* **138**, 487-491.
- Smith, S., Witkowski, A. and Joshi, A. K. (2003). Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Prog. Lipid Res.* **42**, 289-317.
- Sul, H. S. and Wang, D. (1998). Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: studies of fatty acid synthase and mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase gene transcription. *Annu. Rev. Nutr.* **18**, 331-351.
- Sul, H. S., Latasa, M.-J., Moon, Y. and Kim, K.-H. (2000). Regulation of the fatty acid synthase promoter by insulin. *J. Nutr.* **130**, 315-320.
- Taniguchi, C. M., Emanuelli, B. and Kahn, C. R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 85-96.
- Towle, H. C. (2005). Glucose as a regulator of eukaryotic gene transcription. *Trends Endocrinol. Metab.* **16**, 489-494.
- Towle, H. C., Kaytor, E. N. and Shih, H. (1997). Regulation of the expression of lipogenic enzyme genes by carbohydrate. *Annu. Rev. Nutr.* **17**, 405-433.
- Tranulis, M. A., Christophersen, B., Blom, A. K. and Borrebaek, B. (1991). Glucose dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase in liver of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Effects of starvation and temperature variations. *Comp. Biochem. Physiol.* **B 99**, 687-691.
- Tremblay, F., Jacques, H. and Marette, A. (2005). Modulation of insulin action by dietary proteins and amino acids: role of the mammalian target of rapamycin nutrient sensing pathway. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **8**, 457-462.
- Weickert, M. and Pfeiffer, A. (2006). Signalling mechanisms linking hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetologia* **49**, 1732-1741.
- Wilson, R. P. (1994). Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture* **124**, 67-80.

Rainbow trout genetically selected for greater muscle fat content display increased activation of liver TOR signaling and lipogenic gene expression

Sandrine Skiba-Cassy, Marine Lansard, Stéphane Panserat, and Françoise Médale

Unité Mixte de Recherches 1067 Nutrition Aquaculture and Génomique, Institut National de la Recherche Agronomique, Pôle d'hydrobiologie, 64310 Saint Pée-sur-Nivelle, France

Submitted 8 June 2009; accepted in final form 19 August 2009

Skiba-Cassy S, Lansard M, Panserat S, Médale F. Rainbow trout genetically selected for greater muscle fat content display increased activation of liver TOR signaling and lipogenic gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297: R1421–R1429, 2009. First published August 26, 2009; doi:10.1152/ajpregu.00312.2009.—Genetic selection is commonly used in farm animals to manage body fat content. In rainbow trout, divergent selection for low or high muscle fat content leads to differences in utilization of dietary energy sources between the fat muscle line (FL) and the lean muscle line (LL). To establish whether genetic selection on muscle fat content affects the hepatic insulin/nutrient signaling pathway, we analyzed this pathway and the expression of several metabolism-related target genes in the livers of the two divergent lines under fasting and then refeeding conditions. Whereas glycemia returned to basal level 24 h after refeeding in FL trout, it remained elevated in the LL trout. Target of rapamycin (TOR) protein was more abundant in the livers of FL trout than in LL trout, and refeeding activation of the hepatic TOR signaling pathway (TOR, S6K1, and S6) was therefore enhanced. Genes related to glycolysis (glucokinase and pyruvate kinase) and gluconeogenesis (glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase) were only slightly affected by refeeding and genetic selection. Refeeding stimulated expression of lipogenic genes and the sterol-responsive element binding protein (SREBP1), and expression of fatty acid synthase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and serine dehydratase was predominant in the livers of FL fish compared with LL fish. In agreement with recent findings linking TOR to lipogenesis control, we concluded that genetic selection for muscle fat content resulted in overactivation of the TOR signaling pathway-associated lipogenesis and probably also improved utilization of glucose.

metabolism; fattening; insulin-target of rapamycin signaling; messenger RNA levels

THE MANAGEMENT OF FAT DEPOSITION is a significant challenge for both human health and farm animal breeding. In humans, obesity expressed as overexpansion of the adipose tissue is often associated with the development of metabolic disorders, which is becoming increasingly prevalent worldwide and is projected to increase significantly over the next 10 years (50). The management of fat deposition in farm animals, including fish, also has become highly significant, especially in terms of meat quality, since lipid storage in skeletal muscle affects the nutritional value and sensory properties of meat (49).

Genetic selection frequently has been used in farm animals to manage body fat content (7a, 24) but rarely has been used in aquaculture. Two experimental lines of rainbow trout recently have been developed through divergent selection for low or high muscle fat content with the use of a nondestructive

measurement method on live fish (36). Genetic selection for high muscle fat content does not affect feed intake, and similar whole body fat contents were recorded in two lines of 80-g fish fed the same diet (20). Metabolic characterization of the lines led the authors to suggest that the lines presented differences in utilization of energy sources, with reduced hepatic fatty acid oxidation and enhanced glucose utilization in both the liver and the muscle of fish in the fat muscle line (FL) compared with the lean muscle line (LL) (20, 21). Since insulin controls glucose and lipid metabolism, we hypothesized that insulin pathways could have been affected by genetic selection for muscle fat content.

In addition to several other effects, insulin stimulates glucose and lipid storage as glycogen and triglycerides, respectively (17, 42), and also inhibits gluconeogenesis and fatty acid oxidation (9, 30). Insulin acts through a tyrosine kinase membrane receptor. When activated by insulin binding, tyrosine kinase recruits and phosphorylates intracellular substrates, known as insulin receptor substrates (IRS). Phosphorylated IRS are used as docking sites for proteins, which then transmit the insulin signal through several molecules (44). Thus, by successively activating the IRS-1, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), and Akt (also known as protein kinase B), insulin was long thought to be the major regulator of hepatic gene expression, especially those genes related to intermediary metabolism. However, increasing evidence has emerged in the last few years that nutrients also are able to regulate hepatic gene expression in a transcriptional manner. Indeed, genes involved in glycolysis and lipogenesis are reciprocally regulated by glucose and fatty acids in the liver (7). Nutrients also may interact with insulin function. For example, excessive amino acid supply has detrimental effects on glucose homeostasis by promoting insulin resistance and increasing gluconeogenesis. This probably takes place through the activation of complex 1 of the mammalian target of rapamycin (mTORC1) (47). This complex is composed of mTOR, a member of the phosphoinositide 3-kinase-related kinase (PIKK) family (15), the regulatory associated protein of mTOR (Raptor) (18), and the G protein β -subunit-like protein (G β L), which plays a role in stabilizing mTOR-Raptor interactions (19). mTORC1 is regulated by both nutrients (i.e., amino acids) and growth factors (i.e., insulin) and controls cell growth and protein translation through the subsequent activation of p70 ribosomal S6 protein kinase 1 (S6K1) and ribosomal protein S6 (51). Recent findings also have indicated that activation of mTORC1 contributes to the regulation of fatty acid biosynthesis by favoring nuclear accumulation of the mature form of the sterol responsive element binding protein (SREBP1) and expression of SREBP target genes such as fatty acid synthase and ATP citrate lyase (35).

Address for reprint requests and other correspondence: S. Skiba-Cassy, UMR 1067 Nutrition, Aquaculture & Génomique, Institut National de la Recherche Agronomique, Pôle d'hydrobiologie, 64310 Saint-Pée-sur-Nivelle, France (e-mail: skiba@st-pee.inra.fr).

In fish, insulin receptors are present in major insulin target tissues, including white muscle, liver, and adipose tissues (10, 25, 31, 32, 34), and insulin is able to activate its signaling pathway in both rainbow trout muscle cells and hepatocytes (34, 37). To understand the differences that could explain the phenotypes of FL and LL fish, we investigated whether genetic selection of muscle fat content affected nutrient and insulin signaling pathways and metabolism-related gene expression by using rainbow trout from the above two lines resulting from the fourth generation of divergent selection. We examined plasma metabolite levels (glucose, triacylglycerol, and free fatty acids), insulin signaling, and mRNA expression of insulin target genes in both lines under short fasting (basal levels) and refeeding conditions. Attention was focused on genes related to glycolysis [glucokinase (GK) and pyruvate kinase (PK)], gluconeogenesis [glucose-6-phosphatase (G6Pase1 and G6Pase2) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)], lipogenesis [fatty acid synthase (FAS), ATP-citrate lyase (ACLY), and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)], fatty acid oxidation [carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT1a and CPT1b)], and amino acid degradation [serine dehydratase (SD)]. Transcript accumulation of the transcription factor SREBP1 also was evaluated. Analyses were conducted in the liver, which is considered the center of intermediary metabolism and the main site of lipogenesis in fish.

MATERIALS AND METHODS

Experimental and sampling procedure. The experiment was performed with two lines of rainbow trout, a lean muscle line (LL) and a fat muscle line (FL), obtained after four generations of divergent selection for high or low muscle fat content, evaluated using a nondestructive method (Distell Fish Fatmeter) as detailed by Quillet et al. (36). Triplicate groups of fish of both lines were reared in the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) experimental facilities (PEIMA, Sizun, Finistère, France) at a constant water temperature of $11.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Fish of each line were fed with an extruded diet manufactured in our own facilities (INRA, Donzac, Landes, France). Ingredients and composition (Table 1) were similar to those of commercial diets currently used for rainbow trout farming. Feed

intake and weight gain were recorded during the 5 mo before the study, which was performed once fish reached the commercial size (~ 250 g). Fish were left unfed for 48 h to obtain basal levels of plasma metabolites that are reached later in fish than in mammals due to slower intestinal transit and longer gastric emptying time at low temperatures compared with endothermic animals. Six fish were sampled from each tank. They were anesthetized with 2-phenoxyethanol at the recommended dose for surgical procedures (0.2 ml/l), individually weighed, and then killed by a sharp blow on the head. Livers and viscera were weighed to calculate the hepatosomatic index [HSI (%) = $100 \times (\text{liver weight/body weight})$] and the viscerosomatic index [VSI (%) = $100 \times (\text{total viscera weight/body weight})$]. Three fish were frozen at -20°C until analysis of whole body composition; the other three were sampled for blood and liver. The remaining fish were then hand fed a ration corresponding to 2% of the biomass. Three fish were sampled from each tank at 3 and 8 h after the meal. They were weighed, and their digestive tracts were observed to ensure that fish were in a postabsorptive state; the livers were excised, cut into two pieces, frozen in liquid nitrogen, and then stored at -80°C until analysis. Further sampling was performed 24 h after the meal. After weighing, blood and livers were sampled as well as fillets from the left side of the fish, which were kept after trimming and skin removal as samples for analysis of lipid content. All experiments were carried out in accordance with legislation governing the ethical treatment of animals. Investigators were certified by the French Government to carry out animal experiments.

Plasma metabolite levels. Plasma glucose, triacylglycerol (TG), and free fatty acid (FFA) levels were measured with Glucose RTU (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France), PAP 150 (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France), and NEFA C kits (Wako Chemicals, Neuss, Germany), respectively, according to the recommendations of each manufacturer.

Protein extraction and Western blotting. Frozen livers (300 mg) from fasted and 3-h-refed trout were homogenized on ice with an Ultraturax homogenizer in a buffer containing 150 mM sodium chloride, 10 mM Tris, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA (pH 7.4), 100 mM sodium fluoride, 4 mM sodium pyrophosphate, 2 mM sodium orthovanadate, 1% Triton X-100, 0.5% Nonidet P-40-IGEPAL, and a protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland). Homogenates were centrifuged for 15 min at 12,000 *g* consecutively. The resulting supernatants were aliquoted and stored at -80°C . Protein concentrations were determined using the Bio-Rad protein assay kit (Hercules, CA). Liver and cell lysates (20 μg of protein) were subjected to SDS-PAGE and Western blotting using the appropriate antibody. Anti-phospho Akt (Ser⁴⁷³), anti-carboxyl terminal Akt, anti-phospho-mTOR (Ser²⁴⁴⁸), anti-mTOR, anti-phospho-S6K1 (Thr³⁸⁹), anti-S6K1, anti-phospho-S6 (Ser^{235/236}), and anti-S6 were purchased from Cell Signaling Technologies (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France). Specificity of the mammalian antibodies used was previously checked by alignment of amino acid sequences of peptides used to produce polyclonal antibodies with the corresponding trout sequences and comparative Western blots of trout and murine samples (37). After being washed, membranes were incubated with an IRDye infrared secondary antibody (LI-COR Biotechnology, Lincoln, NE). Bands were visualized by infrared fluorescence using the Odyssey imaging system (LI-COR Biotechnology) and quantified by Odyssey infrared imaging system software (version 1.2).

Gene expression analysis: real-time RT-PCR. Total RNA samples were extracted from -80°C frozen livers of fasted fish and 8- and 24-h-refed fish by using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's recommendations. One microgram of the resulting total RNA was reverse transcribed into cDNA using the SuperScript III RNaseH⁻ reverse transcriptase kit (Invitrogen) and random primers (Promega, Charbonnières, France) according to the instructions of each manufacturer. Target gene expression levels were determined by quantitative real-time RT-PCR using specific real-time PCR primers (Table 2). To avoid amplification of genomic DNA,

Table 1. *Formula and analytical composition of diet*

Ingredients	Content, g/kg
Fish meal	200.0
Soybean meal	200.0
Corn gluten	150.0
Wheat gluten	114.0
Extruded whole wheat	93.0
Fish oil	135.0
Rapeseed oil	29.0
Linseed oil	17.4
Palm oil	11.6
Soya lecithin	10.0
CaHPO ₄ ·2H ₂ O (18% P)	10.0
Vitamin mix	10.0
Mineral mix	10.0
Binder	10.0
Analytical composition	Content
Dry matter, %	94.7
Crude protein, %DM	46.3
Crude fat, %DM	23.6
Crude starch, %DM	9.7
Gross energy, kJ/g DM	24.9

DM, dry matter.

Table 2. *Primer sequences*

Gene	Primer Sequence	Amplicon Size, nt
EF1a	F: 5'-TCTCTTGGTCTGTTTCGCTG-3' R: 5'-ACCCGAGGGACATCTGTG-3'	159
GK	F: 5'-TGAAGGATCAGAGGTGGTGATT-3' R: 5'-GAAGGTGAAACCCAGAGGAAGC-3'	253
PK	F: 5'-CCATCGTCCGGTAACAAGA-3' R: 5'-ACATAGGAAAGGCCAGGGGC-3'	158
PEPCK	F: 5'-GTTGGTGCTAAAGGGCACAC-3' R: 5'-CCCGTCTTCTGATAAGTCCAA-3'	149
G6Pase1	F: 5'-CTCAGTGGCGACAGAAAG-3' R: 5'-TACACAGCAGCATCCAGAGC-3'	77
G6Pase2	F: 5'-TAGCCATCATGCTGACCAAG-3' R: 5'-CAGAAGAAGCCGACAGAGT-3'	82
SD	F: 5'-CCCGTTTTTGGAGAGCATAG-3' R: 5'-TTTTGAATGAACCGGATGGT-3'	92
FAS	F: 5'-TGATCTGAAGGCCCGTGTCA-3' R: 5'-GGGTGACGTTGCGGTGGTAT-3'	161
ACLY	F: 5'-CTGAAGCCCAGACAAGGAAG-3' R: 5'-CAGATTGGAGGCCAAGATGT-3'	149
G6PDH	F: 5'-CTCATGGTCTCTCAGTTTG-3' R: 5'-AGAGAGCATCTGGAGCAAGT-3'	176
CPT1a	F: 5'-TCGATTTTCAAGGGTCTTCG-3' R: 5'-CACAACGATCAGCAAACTGG-3'	166
CPT1b	F: 5'-CCCTAAGCAAAAAGGGTCTTCA-3' R: 5'-CATGATGTCACCTCCGACAG-3'	149
SREBP1	F: 5'-GACAAGGTGGTCCAGTTGCT-3' R: 5'-CACACGTTAGTCCGCATCAC-3'	59

F, forward primer; R, reverse primer; nt, nucleotides. GenBank accession no. or Sigenae accession no. is as follows: elongation factor-1 α (EF1 α), AF498320; glucokinase (GK), AF135403; pyruvate kinase (PK), AF246146; phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), AF246149; glucose 6-phosphatase 1 (G6Pase1), tcay0019b.d.18_3.1.s.om.8.1-1693; G6Pase2, AF120150; serine dehydratase (SD), tcay0007b.b.13_3.1.s.om.8; fatty acid synthase (FAS), tcab0001c.e.06_5.1.s.om.8; ATP-citrate lyase (ACLY), CA349411.1; glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), CA351434; carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT1a), AF 327058; CPT1b, AF606076.

primer pairs included one intron-spanning oligonucleotide when possible. The different PCR products were initially checked by sequencing to confirm the nature of the amplicon.

Quantitative RT-PCR was carried out on an iCycler iQ real-time PCR detection system (Bio-Rad) using iQ SYBR green supermix. Quantitative RT-PCR analyses were focused on several key enzymes of hepatic metabolism (34): 1) G6Pase and the mitochondrial isoform of phosphoenolpyruvate carboxykinase (mPEPCK), involved in gluconeogenesis; 2) GK and PK, which catalyze the phosphorylation of glucose and the conversion of phosphoenolpyruvate to pyruvate, the first and final steps in glycolysis, respectively (45); 3) four enzymes involved in fatty acid metabolism, ACLY, FAS, G6PDH, and CPT1. ACLY and FAS successively allow the synthesis of fatty acids, primarily palmitate, by catalyzing the production of cytosolic acetyl-CoA and oxaloacetate from citrate and then promoting the condensation of malonyl-CoA and acetyl-CoA (40). G6PDH, the committed step of the pentose phosphate shunt, catalyzes oxidation of the glucose coupled to the production of NADPH. The pentose phosphate pathway is a major source of reducing equivalents for biosynthesis reactions including fatty acid synthesis. CPT1 is responsible for the entry of fatty acids into mitochondria and is considered a rate-limiting enzyme of fatty acid β -oxidation (4). 4) We also examined mRNA expression of SD, which catalyzes the pyridoxal 50-phosphate-dependent deamination of serine and threonine in the liver to produce pyruvate and 2-oxobutyrate, respectively (13). According to the ancestral whole genome duplication that has occurred in the teleost lineage subsequent to its divergence from mammals, genes may be found in fish in multiple copies (14, 23). When different copies of a gene were known in rainbow trout (as for G6Pase and CPT1), gene

expression analysis was performed on both copies. For the study of SREBP1 mRNA expression, we first characterized a partial cDNA encoding rainbow trout SREBP1 by using PCR primers (forward 5'-GCTGAGAGACAGCCTCAACC-3' and reverse 5'-AGGACGCATCTCACACTCTCT-3' primers) designed from a *Salmo salar* expressed sequence tag (GenBank accession no. CA048941.1) presenting high homology with mammalian SREBP1 sequences. The resulting translated amplified rainbow trout sequence was compared with protein sequences present in the GenBank database using the BLAST network service at the National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (1) and exhibited high sequence homology with mammalian SREBP1 ($P = 3.10^{-23}$ with human sequence). It was therefore considered to represent a partial rainbow trout SREBP1 cDNA sequence and was used to design PCR primers for quantitative RT-PCR (Table 2).

Elongation factor-1 α (EF1 α) was employed as a nonregulated reference gene, as previously used in rainbow trout (26, 34). No significant changes in EF1 α gene expression were observed in our investigations (data not shown). PCR was performed using 10 μ l of the diluted cDNA mixed with 5 pmol of each primer in a final volume of 25 μ l. The PCR protocol was initiated at 95°C for 3 min for initial denaturation of the cDNA and hot-start iTaq TM DNA polymerase activation and continued with a two-step amplification program (20 s at 95°C followed by 30 s at specific primer hybridization temperature) repeated 40 times. Melting curves were systematically monitored (temperature gradient at 0.5°C/10 s from 55 to 94°C) at the end of the last amplification cycle to confirm the specificity of the amplification reaction. Each PCR run included replicate samples (duplicate of reverse transcription and PCR amplification, respectively) and negative controls (reverse transcriptase and RNA-free samples, respectively). Relative quantification of target gene expression was performed using the mathematical model described by Pfaffl (33). The relative expression ratio (R) of the target gene was calculated based on the real-time PCR efficiency (E) and the threshold cycle (CT) deviation (Δ CT) of the unknown sample vs. that of a control sample made of a mix of all samples and is expressed compared with the EF1 α reference gene:

$$R = \frac{[(E_{\text{target gene}})^{\Delta\text{CT}_{\text{target gene (control - sample)}}]}{[(E_{\text{EF1}\alpha})^{\Delta\text{CT}_{\text{EF1}\alpha (\text{control - sample})}}]}$$

PCR efficiency (E) was measured as the slope of a standard curve using serial dilution of cDNA, and all values were above 1.9.

Statistical analysis. Results of growth, nutrient utilization, and body composition are means $\pm$ SE ($n = 3$ tanks) and were analyzed using one-way ANOVA to assess the differences between lines. Results from plasma metabolite levels ($n = 9$) and gene expression ($n = 6$) are means $\pm$ SE and were analyzed using two-way ANOVA to assess differences between lines, sampling time, and interactions. When an interaction was significant, means were compared using the Newman-Keuls multiple comparison test. Protein phosphorylation levels are means $\pm$ SE ($n = 6$) and were analyzed using Mann-Whitney nonparametric tests. For all statistical analyses, the level of significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Weight gain, whole body fat content, and tissue composition. Trout from the lean muscle line (LL) had higher body weights ($P < 10^{-4}$) than fish from the FL at the time of the study, despite having a slightly lower feed intake (6.4 g dry matter $\cdot$ kg body $\text{wt}^{-1} \cdot \text{day}$ for LL and 6.85 g dry matter $\cdot$ kg body $\text{wt}^{-1} \cdot \text{day}$ for FL) during the 5 mo before the study (Table 3). Feed efficiency was thus better in LL than in FL fish. Although daily fat gain was increased in FL compared with LL fish ($P = 0.017$), the nitrogen gain was similar in the two lines ($P = 0.57$). As expected, as the target of the genetic selection,

Table 3. Main features of rainbow trout from FL and LL

	FL	LL	P Value
Individual mean body weight, g)	236.7±6.5†	277.7±1.2*	<10 ⁻⁴
Daily growth coefficient, %	1.45±0.01†	1.64±0.01*	0.0003
Feed efficiency	1.15±0.01†	1.28±0.01*	0.002
Nitrogen gain, mg·kg BW ⁻¹ ·day	186.8±7.1	192.6±6.2	0.57
Fat gain, g·kg BW ⁻¹ ·day	1.27±0.04*	1.03±0.04†	0.017
Digestive tract/whole body, %	10.0±0.2	10.7±0.2	0.48
Muscle fat content, %WW	10.0±0.4*	5.0±0.3†	<10 ⁻⁴
Whole body fat content, %WW	15.1±0.3*	12.5±0.4†	0.005
Whole body protein content, %WW	15.0±0.3	15.4±0.4	0.47

Values are means ± SE (n = 3). FL and LL, fat and lean muscle lines of fish; WW, wet weight. *†P < 0.05, means with different symbols are significantly different from each other.

muscle fat content was twice as high in the FL than in the LL fish, whereas whole body fat content was higher in FL fish (+20.8%). Muscle fat stores represented 33.2 and 19.8% of whole body fat stores in FL and LL fish, respectively. The percentage of digestive tract including abdominal adipose tissue was not significantly different between lines (P = 0.48).

Plasma metabolite levels. The results for plasma metabolites measured on fasted fish and 3, 8, and 24 h after refeeding are presented in Fig. 1. Refeeding induced a weak but significant increase in plasma glucose levels in both fish lines, reaching 6.19 ± 0.37 and 6.37 ± 0.41 mM for FL and LL fish, respectively, 8 h after refeeding. As indicated by the significant interaction between sampling time and line, plasma glucose levels remained elevated in the LL fish 24 h after refeeding, whereas it decreased significantly between 8 and 24 h in the FL fish. Plasma FFA levels were not significantly different between lines over the refeeding period. Plasma FFA levels decreased significantly 3 and 8 h after refeeding and then returned to fasting values 24 h after refeeding. Compared with the LL fish, FL fish presented significantly higher TG plasma levels. On the other hand, the evolution of TG plasma levels was similar after refeeding for both fish lines, increasing gradually between fasted and 24-h-refed fish from 2.14 ± 0.10 and 1.93 ± 0.13 mM to 4.31 ± 0.38 and 3.48 ± 0.41 mM for FL and LL fish, respectively.

Akt/TOR signaling pathway. Using Western blot analyses, we investigated the effects of refeeding on Akt/TOR signaling pathways in FL and LL fish by comparing fasted and 3-h-refed fish. As shown in Fig. 2, refeeding resulted in enhanced phosphorylation of Akt, TOR, S6K1, and S6 proteins. To compare the levels of activation of the different signaling molecules following refeeding, we loaded liver protein samples from 3-h-refed fish from both lines on the same gel and subjected them to Western blot analyses. Figure 3 represents Western blot images of phosphorylated (P-) and total forms of Akt, TOR, S6K1, and S6. A ratio between the phosphorylated and total forms of the protein was calculated for each protein. Analysis of Akt data indicated that levels of P-Akt and Akt were not significantly different between FL and LL fish. Although similar quantities of proteins (20 µg) were loaded on the gels, TOR and P-TOR protein levels were both significantly more highly increased in the FL compared with the LL fish. Consequently, there was no difference between lines when the ratio between P-mTOR and total mTOR was considered. S6K1 and S6 protein presented similar patterns. Levels of phosphorylated forms of S6K1 and S6 were enhanced in the FL

fish. Since both lines presented equal abundance of total S6K1 and S6, the phosphorylated-to-total protein ratio was increased in the FL fish.

Messenger RNA levels of target genes. To compare the effects of refeeding on the hepatic intermediary metabolism-related gene expression in both lines, we performed quantitative RT-PCR on several genes belonging to glucose, lipid, and energy metabolism. Messenger RNA levels of GK, PK, G6Pase1 and G6Pase2, PEPCK, SD, ACLY, FAS, G6PDH, CPT1a and CPT1b, and SREBP1 were measured as indexes of gene expression in fasted fish as well as 8 and 24 h after refeeding. Since samples collected 8 h after refeeding exhibited mRNA levels of the different genes that were not significantly different from those measured in fasting fish (data not shown), the results summarized in Fig. 4 correspond to fasted and 24-h-refed nutritional status. GK mRNA levels increased significantly between fasted and 24-h-refed fish in both lines. Expression of PK mRNA was similar between lines and remained unchanged between fasted and refed fish. Over the three gluconeogenic genes explored (G6Pase1, G6Pase2, and

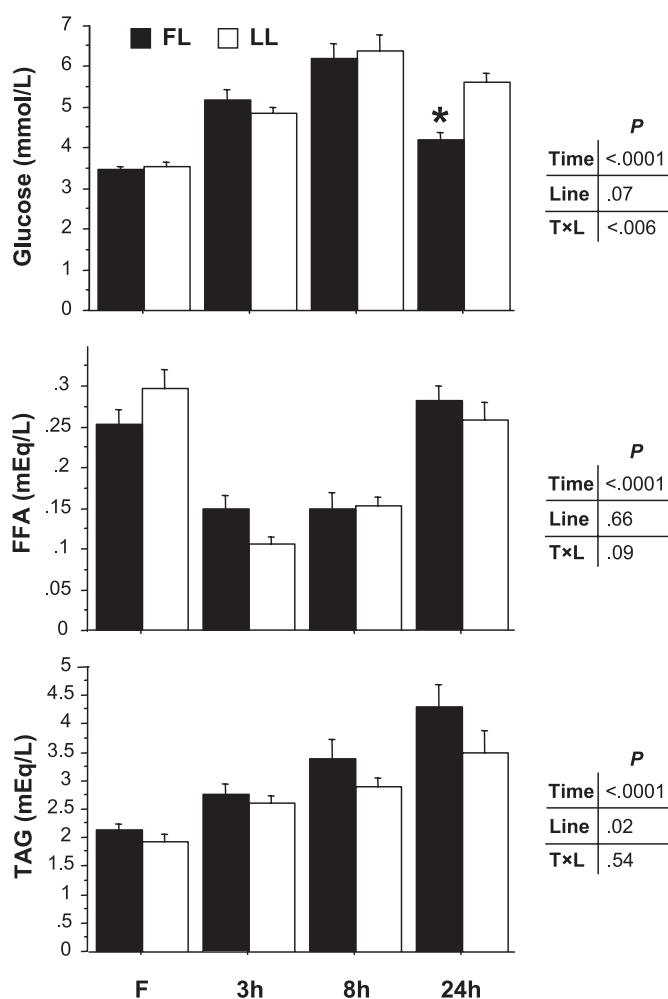


Fig. 1. Plasma levels of glucose, free fatty acids (FFA), and triacylglycerol (TAG) in fish from the fat (FL) and the lean lines (LL) 3, 8, and 24 h after refeeding (0 corresponds to fasted fish). Data are means ± SE of 9 samples. P values for the time, line, and interaction effects are indicated at right. *P < 0.05, significant difference in plasma glucose levels between FL and LL 24 h after refeeding.

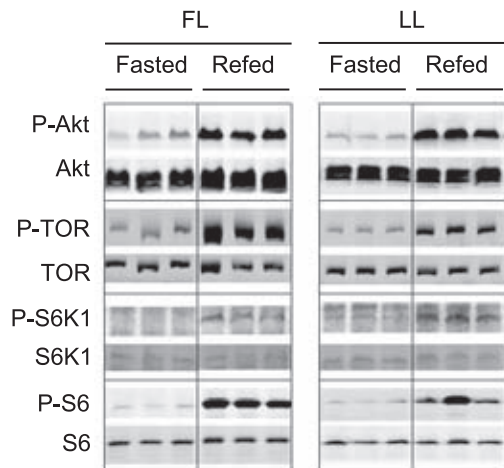


Fig. 2. Western blot analysis of Akt, target of rapamycin (TOR), p70 ribosomal S6 protein kinase 1 (S6K1), and S6 protein phosphorylation in fasted and 3-h-refed rainbow trout livers from FL and LL. P-Akt, P-TOR, P-S6K1, and P-S6, phosphorylated forms of Akt, TOR, S6K1, and S6, respectively. Twenty micrograms of total protein per lane were loaded on the gel. A representative blot is shown. Western blots were performed on 6 individual samples that provided similar results.

PEPCK), the first isoform of G6Pase was the only gene subjected to regulation of refeeding, since it decreased 24 h after refeeding. On investigating the regulation of expression of lipid metabolism-related genes, we found that mRNA expression of genes encoding FAS and G6PDH was upregulated 24 h after refeeding in both lines. Messenger RNA expression of the ACLY gene tended to increase in 24-h-refed fish, but the increase did not reach statistical significance ($P = 0.07$). On the other hand, we observed that expression of ACLY, FAS, and G6PDH mRNA was on the whole significantly higher in FL fish compared with LL fish, with 1.6-fold higher levels of ACLY mRNA in fasted and 24-h-refed FL fish, 7.3- and 3.7-fold higher levels of FAS mRNA in fasted and 24-h-refed FL fish, respectively, and 2.6- and 2.5-fold higher levels of G6PDH mRNA in fasted and 24-h-refed FL fish, respectively. Messenger RNA levels of SREBP1 were subjected to considerable differences between fasted and 24-h-refed fish, with a 5.7- and 2.7-fold increase in FL and LL fish, respectively. However, no significant difference was noted between lines. As regards the mRNA expression of CPT1, we found that both isoforms were unaffected by refeeding. On the other hand, the LL fish presented higher expression of the b isoform of CPT1, whereas the a isoform was equally expressed in both lines. Finally, we investigated mRNA expression of SD as a potential source of pyruvate for further gluconeogenesis or lipogenesis and recorded lower levels of expression in LL fish. Expression of SD mRNA was not affected by nutritional status.

DISCUSSION

The aim of the present study to achieve greater understanding of the molecular mechanisms leading to muscle fat accumulation by comparing fish lines selected for low and high muscle fat content. Our study focused on the insulin/nutrient signaling pathways as a major regulator of metabolism and examined the expression of several metabolism-related target genes.

Lines issued from the third generation of selection presented similar whole body fat contents but different muscle fat contents (20). The continuation of the selection procedure (fourth generation of selection) has increased the divergence in muscle fat levels that led to enhanced whole body fat content. The absence of difference in abdominal adipose tissue, which is the predominant site of fat storage in salmonids, distinguishes this model from other farm animal models obtained through genetic selection, which generally resulted in overall increase in body fat over the different body compartments (3, 38). In the present study, increased muscle adiposity in FF fish was not due to higher growth rate or better feed efficiency. In addition, the genetic selection has increased fat gain without a concomitant decrease in nitrogen gain.

Carnivorous fish such as rainbow trout are characterized by a limited ability to use dietary carbohydrates efficiently (48) and are thus considered to be "glucose intolerant" (10a, 24a). Oral or intravenous administration of glucose and a carbohydrate-rich diet result in persistent hyperglycemia in various fish species, including the rainbow trout (5, 7, 22a, 26a, 31). Comparison of plasma glucose levels of the two lines revealed that fish from the FL seemed to have a better ability to manage postprandial plasma glucose levels than LL fish. Glycemia remained significantly elevated in LL fish 24 h after refeeding, whereas it decreased in FL fish to reach levels similar to those measured in 48-h-fasted fish. This result reinforces the hypothesis that divergent selection for muscle fat content in trout has modified the mechanisms of fuel utilization, especially the ability of the fish to use glucose.

Glucose homeostasis results from a balance between glucose utilization through glycolysis and glucose production through gluconeogenesis and glycogenolysis. Investigation of GK and PK gene expression suggested that the glycolytic pathway was not differentially regulated between lines. This should be confirmed by analyzing the whole glycolytic flux at both molecular and cellular levels. Impaired postprandial inhibition of hepatic endogenous production of glucose is a metabolic feature of rainbow trout (27–29, 46). This study again confirmed that gluconeogenesis is only slightly affected by refeeding in rainbow trout, since of the three gluconeogenic genes examined (the 2 isoforms of G6Pase and PEPCK), only the first isoform of G6Pase was downregulated 24 h after refeeding. Analysis of the two isoforms of G6Pase confirmed that, in fish, different copies of a gene resulting from the genome duplication event may have evolved separately and acquired different patterns of expression, as previously reported for pro-opiomelanocortin (22). Regarding these enzymes, FL and LL fish responded similarly to refeeding, suggesting that endogenous production of glucose was not responsible for the persistence of increased plasma glucose over 24 h after refeeding in the LL fish.

The purpose of plasma glucose is mainly as fuel through the glycolytic pathway or transformation (among others) into lipids and then storage in adipose tissues and, to a lesser extent, skeletal muscle. Analysis of ACLY, FAS, and G6PDH gene expression confirmed that, as expected, refeeding stimulated lipogenic gene expression. In mammals, FAS expression is regulated by insulin, and this action is mediated by the PI3K/Akt signaling pathway (43). The concomitant regulation of FAS and hepatic activation of Akt under refeeding conditions in both lines suggests insulin regulation similar to that de-

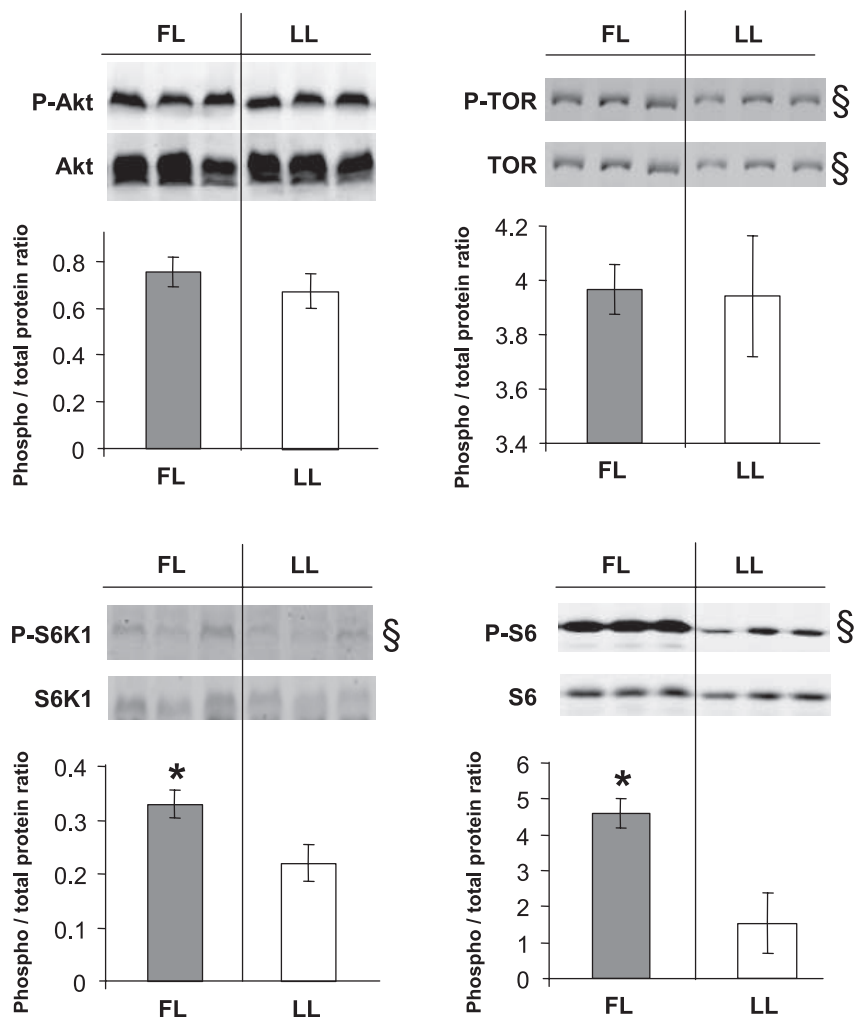


Fig. 3. Western blot analysis of Akt, TOR, S6K1, and S6 protein phosphorylation in 3-h-refed rainbow trout livers from FL and LL. Twenty micrograms of total protein per lane were loaded on the gel. A representative blot is shown. Western blots were performed on 6 individual samples that provided similar results. Graphs represent the ratio between the phosphorylated protein and the total amount of the targeted protein. Protein phosphorylation data are means $\pm$ SE ($n = 6$) and were analyzed using Mann-Whitney nonparametric tests. * $P < 0.05$, significant difference in the phosphorylated (phospho)/total protein ratio between LL and FL fish. § $P < 0.05$, significant difference in the phosphorylated protein level or the total protein level between LL and FL fish.

scribed in mammals. Interestingly, whereas both FL and LL fish responded to refeeding, expression of ACLY, FAS, and G6PDH was significantly higher in the FL than in the LL fish, indicating that lipogenesis was enhanced in the FL fish. This was also corroborated by the plasma TG levels that were always higher in the FL than in the LL fish under both fasting and refeeding conditions. The greater hepatic expression of SD in the FL fish also supported the hypothesis of enhanced lipogenesis in fish selected for high muscle fat content. Indeed, SD catalyzes the pyridoxal phosphate (PLP)-dependent deamination of serine to produce pyruvate. In mammals, SD is involved in the regulation of liver gluconeogenesis from serine in different dietary, hormonal, and developmental states by providing pyruvate (41). In the case of rainbow trout, pyruvate originating from SD activity might be directed through lipid synthesis and thus contribute to the enhanced lipogenesis of FL fish. Enhanced lipogenesis might therefore explain the better utilization of plasma glucose levels in FL fish and their increased adiposity compared with LL fish. Since a study by Corraze et al. (6) demonstrated that neosynthesized lipids in rainbow trout were preferentially incorporated in the muscle rather than in visceral adipose tissue, this suggests that enhanced lipogenesis has a key role in the phenotype of the FL fish.

Control of lipogenesis is mainly mediated by insulin and nutrients. Porstmann et al. (35) recently demonstrated that fatty acid biosynthesis was regulated by mTORC1 under the transcriptional control of SREBP1, a mediator of the expression of lipogenic enzymes. We therefore hypothesized that activation of the insulin/TOR signaling pathway might be different between the two fish lines. Using Western blot analysis of TOR phosphorylation as well as S6K1 and S6 phosphorylation (2 successive targets of TOR) as indicators for TOR activity, we demonstrated that TOR activity is enhanced in the livers of refed FL fish compared with LL refed fish. The increased TOR activity seemed to result rather from increased abundance of TOR protein, since the ability of insulin to phosphorylate TOR was similar in the two lines. These results thus led us to hypothesize that genetic selection of rainbow trout on muscle fat content had favored the mTOR pathway and, consequently, lipogenesis by enhancing the abundance of TOR protein. This study therefore confirms previous findings linking mTOR pathway to lipogenesis in the liver of obese rats (16), and the findings are in agreement with the recent publication by Porstmann et al. (35). In mammals, SREBP1 is essential for the transcriptional control of genes encoding enzymes of lipid biosynthesis such as FAS and ACLY and is considered to be the link between TOR and lipogenic gene expression control.

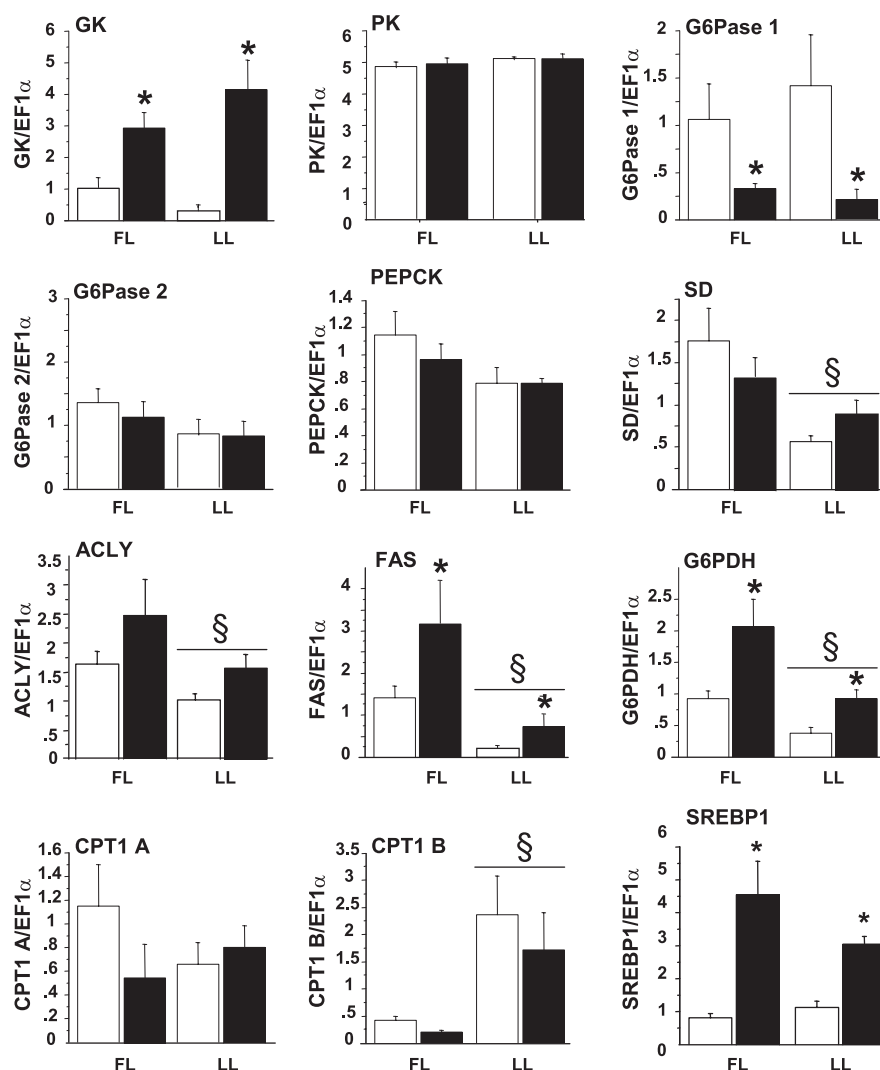


Fig. 4. Gene expression of selected enzymes in the livers of fasted (open bars) and 24-h-refed (filled bars) rainbow trout from FL and LL. Glucokinase (GK), pyruvate kinase (PK), glucose-6-phosphatase isoforms 1 and 2 (G6Pase1 and G6Pase2), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), serine dehydratase (SD), ATP-citrate lyase (ACLY), fatty acid synthase (FAS), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1a and CPT1b), and sterol responsive element binding protein (SREBP1) mRNA levels were evaluated using real-time RT-PCR. Expression values are normalized with elongation factor-1 α (EF1 α)-expressed transcripts. Results are means $\pm$ SE ($n = 6$) and were analyzed using 2-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test for multiple comparison. * $P < 0.05$, significant effect of refeeding. § $P < 0.05$, significant effect of line.

Three members of the SREBP family have been described in mammals, i.e., SREBP1a, SREBP1c, and SREBP2. SREBP1a and SREBP1c are encoded by a single gene through the use of alternative transcription start sites and differ by their first exon (12). In mammals, SREBP1c is mainly expressed in the liver, white adipose tissue, adrenal glands, and brain, whereas SREBP1a is mainly expressed in tissues with a high capacity for cell proliferation such as the spleen and intestines (39). Since SREBP1 primers were designed from a newly partial rainbow trout SREBP1 cDNA sequence located in the 3' end of the gene, primers consequently targeted shared regions of SREBP1a and SREBP1c. The upregulation of SREBP gene expression in rainbow trout caused by refeeding is therefore totally consistent with the mammalian regulation of SREBP1c, because SREBP1c is the only SREBP isoform whose expression is depressed during fasting and markedly increased after refeeding (11). The higher levels of expression of lipogenic genes observed in FL compared with LL fish were not accompanied by enhanced expression of SREBP1, as previously demonstrated for two divergent fat and lean chicken lines (2). Nevertheless, the increase in SREBP1 transcript levels between fasted and 24-h-refed fish was clearly greater in FL than

in LL fish, which may signify stronger postprandial stimulation of lipogenesis in FL than in LL fish. This hypothesis needs to be confirmed by *in vivo* measurement of lipogenesis from labeled substrates. However, the regulation of SREBP1 also may occur at posttranslational level via proteolytic cleavage. Actually, the SREBP1c precursor interacts with the SREBP cleavage-activating protein (SCAP) to form a complex retained in the endoplasmic reticulum (ER) by its interaction with the integral membrane protein termed insulin-induced gene-1 (Insig). Under appropriate signals (insulin, ER stress), the SREBP1c-SCAP complex migrates to the Golgi apparatus, where SREBP1c undergoes two sequential proteolytic cleavages by site 1 protease (S1P) and site 2 protease (S2P), yielding the mature active form of SREBP1c, which is translocated into the nucleus and binds to specific response elements on the promoter of its targets genes (for review, see Ref. 8).

Finally, we also demonstrated that CPT1b mRNA was less represented in the livers of FL than LL fish. However, since the a isoform was similarly expressed in both lines and CPT1 activity was not measured in the present study, we cannot clearly conclude that LL fish have an enhanced ability to use fatty acids as an energy source, although our findings partly

confirm those obtained from fish originating from the previous generation of selection (20).

Perspective and Significance

The present study indicates that genetic selection of rainbow trout for muscle fat content resulted in fish with improved ability to use plasma glucose, potentially due to enhanced lipogenesis driven by an augmented TOR signaling pathway. Since neosynthesized lipids are targeted in preference to the skeletal muscle in rainbow trout, our combined findings provide a potential explanation of the mechanisms that lead to enhancement of fat accumulation in the muscle of the fat line. Our results confirm the hypothesis linking TOR to control of fat metabolism and expand it to a nonmammalian species. However, it remains to be determined how enhanced TOR activity leads to increased lipogenic gene expression and what the role of SREBP1c may be in the underlying molecular mechanisms. The differential activation of the TOR signaling pathway and the divergent fat accumulation the two divergent lines of rainbow trout selected for muscle fat content show this to be a relevant model to investigate the mechanisms linking the TOR pathway to lipogenesis. Since the TOR signaling pathway is regulated by cellular energy status, through negative regulation by AMP-activated protein kinase as well as by availability of amino acids, fat and lean muscle rainbow trout lines also will be valuable to investigate how to control fat synthesis through nutritional control of the TOR pathway.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. J. Borthaire, E. Plagnes-Juan, C. Vachot, and F. A. Poujade for technical assistance, as well as the technical staff at the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) experimental facilities of Pisciculture Expérimentale INRA des Monts d'Arrée (Drennec, Sizun, France).

REFERENCES

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403–410, 1990.
- Assaf S, Lagarrigue S, Daval S, Sansom M, Leclercq B, Michel J, Pitel F, Alizadeh M, Vignal A, Douaire M. Genetic linkage and expression analysis of SREBP and lipogenic genes in fat and lean chicken. *Comp Biochem Physiol B* 137: 433–441, 2004.
- Baeza E, de Carville H, Salichon MR, Marche G, Leclercq B. Effects of selection, over three and four generations, on meat yield and fatness in Muscovy ducks. *Br Poult Sci* 38: 359–365, 1997.
- Bartlett K, Eaton S. Intermediates of mitochondrial beta-oxidation. *Biochem Soc Trans* 22: 432–436, 1994.
- Bergot F. Effects of dietary carbohydrates and of their mode of distribution on glycaemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri richardson*). *Comp Biochem Physiol A* 64: 543–547, 1979.
- Corraze G, Kaushik S. Les lipides des poissons marins et d'eau douce. *Oléagineux Corps Gras Lipides* 6: 111–115, 1999.
- del sol Nova M, Capilla E, Rojas P, Baro J, Gutierrez J, Navarro I. Glucagon and insulin response to dietary carbohydrate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol* 139: 48–54, 2004.
- Dentin R, Denechaud PD, Benhamed F, Girard J, Postic C. Hepatic gene regulation by glucose and polyunsaturated fatty acids: a role for ChREBP. *J Nutr* 136: 1145–1149, 2006.
- Eisen EJ. Selection experiments for body composition in mice and rats: a review. *Livest Prod Sci* 23: 17–32, 1989.
- Ferre P, Foufelle F. SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. *Horm Res* 68: 72–82, 2007.
- Granner D, Pilkis S. The genes of hepatic glucose metabolism. *J Biol Chem* 265: 10173–10176, 1990.
- Gutierrez J, Asgard T, Fabbri E, Plisetskaya EM. Insulin-receptor binding in skeletal-muscle of trout. *Fish Physiol Biochem* 9: 351–360, 1991.
- Hemre GI, Mommsen TP, Kroghdahl A. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquac Nutr* 8: 175–194, 2002.
- Horton JD, Bashmakov Y, Shimomura I, Shimano H. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5987–5992, 1998.
- Hua X, Wu J, Goldstein JL, Brown MS, Hobbs HH. Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13. *Genomics* 25: 667–673, 1995.
- Ishikawa E, Ninagawa T, Suda M. Hormonal and dietary control of serine dehydratase in rat liver. *J Biochem* 57: 506–513, 1965.
- Jaillon O, Aury JM, Brunet F, Petit JL, Stange-Thomann N, Mauceli E, Bouneau L, Fischer C, Ozouf-Costaz C, Bernot A, Nicaud S, Jaffe D, Fisher S, Lutfalla G, Dossat C, Segurens B, Dasilva C, Salanoubat M, Levy M, Boudet N, Castellano S, Anthouard V, Jubin C, Castelli V, Katinka M, Vacherie B, Biemont C, Skalli Z, Cattolico L, Poulain J, De Berardinis V, Cruaud C, Duprat S, Brottier P, Coutanceau JP, Gouzy J, Parra G, Lardier G, Chapple C, McKernan KJ, McEwan P, Bosak S, Kellis M, Volff JN, Guigo R, Zody MC, Mesirov J, Lindblad-Toh K, Birren B, Nusbaum C, Kahn D, Robinson-Rechavi M, Laudet V, Schachter V, Quetier F, Saurin W, Scarpelli C, Wincker P, Lander ES, Weissenbach J, Roest Crollius H. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* 431: 946–957, 2004.
- Keith CT, Schreiber SL. PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. *Science* 270: 50–51, 1995.
- Khamzina L, Veilleux A, Bergeron S, Marette A. Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology* 146: 1473–1481, 2005.
- Khan AH, Pessin JE. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia* 45: 1475–1483, 2002.
- Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110: 163–175, 2002.
- Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KVP, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. G beta L, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell* 11: 895–904, 2003.
- Kolditz C, Borthaire M, Richard N, Corraze G, Panserat S, Vachot C, Lefevre F, Médale F. Liver and muscle metabolic changes induced by dietary energy content and genetic selection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R1154–R1164, 2008.
- Kolditz CI, Paboeuf G, Borthaire M, Esquerre D, SanCristobal M, Lefevre F, Médale F. Changes induced by dietary energy intake and divergent selection for muscle fat content in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), assessed by transcriptome and proteome analysis of the liver. *BMC Genomics* 9: 506, 2008.
- Leder EH, Silverstein JT. The pro-opiomelanocortin genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): duplications, splice variants, and differential expression. *J Endocrinol* 188: 355–363, 2006.
- Legate NJ, Bonen A, Moon TW. Glucose tolerance and peripheral glucose utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), American eel (*Anguilla rostrata*), and black bullhead catfish (*Ameiurus melas*). *Gen Comp Endocrinol* 122: 48–59, 2001.
- Macqueen DJ, Johnston IA. An update on MyoD evolution in teleosts and a proposed consensus nomenclature to accommodate the tetraploidization of different vertebrate genomes. *PLoS One* 3: e1567, 2008.
- Marshall DM. Breed differences and genetic parameters for body composition traits in beef cattle. *J Anim Sci* 72: 2745–2755, 1994.
- Moon TW. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comp Biochem Physiol B* 129: 243–249, 2001.
- Navarro I, Leibush B, Moon TW, Plisetskaya EM, Banos N, Mendez E, Planas JV, Gutierrez J. Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and glucagon: the evolution of their receptors. *Comp Biochem Physiol B* 122: 137–153, 1999.
- Olsvik PA, Lie KK, Jordal AE, Nilsen TO, Hordvik I. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Mol Biol* 6: 21, 2005.

- 26a. **Palmer TN, Ryman BE.** Studies on oral glucose intolerance in fish. *J Fish Biol* 4: 311–319, 1972.
27. **Panserat S, Capilla E, Gutierrez J, Frappart PO, Vachot C, Plagnes-Juan E, Aguirre P, Breque J, Kaushik S.** Glucokinase is highly induced and glucose-6-phosphatase poorly repressed in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a single meal with glucose. *Comp Biochem Physiol B* 128: 275–283, 2001.
28. **Panserat S, Médale F, Breque J, Plagnes-Juan E, Kaushik S.** Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Nutr Biochem* 11: 22–29, 2000.
29. **Panserat S, Plagnes-Juan E, Breque J, Kaushik S.** Hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression is not repressed by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 204: 359–365, 2001.
30. **Park EA, Mynatt RL, Cook GA, Kashfi K.** Insulin regulates enzyme activity, malonyl-CoA sensitivity and mRNA abundance of hepatic carnitine palmitoyltransferase-I. *Biochem J* 310: 853–858, 1995.
31. **Parrizas M, Banos N, Baro J, Planas J, Gutierrez J.** Up-regulation of insulin binding in fish skeletal muscle by high insulin levels. *Regul Pept* 53: 211–222, 1994.
32. **Parrizas M, Planas J, Plisetskaya EM, Gutierrez J.** Insulin binding and receptor tyrosine kinase activity in skeletal muscle of carnivorous and omnivorous fish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 266: R1944–R1950, 1994.
33. **Pfaffl MW.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45, 2001.
34. **Plagnes-Juan E, Lansard M, Seiliez I, Médale F, Corraze G, Kaushik S, Panserat S, Skiba-Cassy S.** 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, 2008.
35. **Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leever S, Griffiths JR, Chung YL, Schulze A.** SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab* 8: 224–236, 2008.
36. **Quillet E, Le Guillou S, Aubin J, Fauconneau B.** Two-way selection for muscle lipid content in pan-size rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 245: 49–61, 2005.
37. **Seiliez I, Gabillard JC, Skiba-Cassy S, Garcia-Serrana D, Gutierrez J, Kaushik S, Panserat S, Tesseraud S, Castillo J, Ammendrup-Johnsen I, Codina M, Navarro I.** An in vivo and in vitro assessment of TOR signaling cascade in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R329–R335, 2008.
38. **Sellier P.** Genetics of meat and carcass traits. In: *The Genetics of the Pig*. Wallingford, UK: CAB International, 1998.
39. **Shimomura I, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS.** Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest* 99: 838–845, 1997.
40. **Smith S, Witkowski A, Joshi AK.** Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Prog Lipid Res* 42: 289–317, 2003.
41. **Snell K.** Enzymes of serine metabolism in normal, developing and neoplastic rat tissues. *Adv Enzyme Regul* 22: 325–400, 1984.
42. **Shrivastava AK, Pandey SK.** Potential mechanism(s) involved in the regulation of glycogen synthesis by insulin. *Mol Cell Biochem* 182: 135–141, 1998.
43. **Sul HS, Latasa MJ, Moon Y, Kim KH.** Regulation of the fatty acid synthase promoter by insulin. *J Nutr* 130: 315S–320S, 2000.
44. **Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR.** Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 85–96, 2006.
45. **Towle HC, Kaytor EN, Shih H.** Regulation of the expression of lipogenic enzyme genes by carbohydrate. *Annu Rev Nutr* 17: 405–433, 1997.
46. **Tranulis MA, Christophersen B, Blom AK, Borrebaek B.** Glucose dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase in liver of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Effects of starvation and temperature variations. *Comp Biochem Physiol B* 99: 687–691, 1991.
47. **Tremblay F, Lavigne C, Jacques H, Marette A.** Role of dietary proteins and amino acids in the pathogenesis of insulin resistance. *Annu Rev Nutr* 27: 293–310, 2007.
48. **Wilson RP.** Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture* 124: 67–80, 1994.
49. **Wood JD, Enser M, Fisher AV, Nute GR, Sheard PR, Richardson RI, Hughes SI, Whittington FM.** Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: a review. *Meat Sci* 78: 343–358, 2008.
50. **World Health Organization.** *Obesity and Overweight* (WHO Fact Sheet No. 311). Geneva: WHO, 2006.
51. **Wullschleger S, Loewith R, Hall MN.** TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124: 471–484, 2006.



Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver

S. Panserat^{a,b,c,*}, G.A. Hortopan^d, E. Plagnes-Juan^{a,b,c}, C. Kolditz^{a,b,c}, M. Lansard^{a,b,c}, S. Skiba-Cassy^{a,b,c}, D. Esquerré^e, I. Geurden^{a,b,c}, F. Médale^{a,b,c}, S. Kaushik^{a,b,c}, G. Corraze^{a,b,c}

^a INRA, UMR1067 Nutrition Aquaculture et Génomique, F-64310 Saint-Pée-sur-Nivelle, France

^b IFREMER, UMR1067 Nutrition Aquaculture et Génomique, F-29280 Plouzané, France

^c Université Bordeaux 1, UMR 1067 Nutrition Aquaculture et Génomique, F-33405 Talence, France

^d Veterinary Medicine Faculty, Turin University, 10095 Grugliasco, Via L. da Vinci, 44, Turin, Italy

^e INRA, DGA, UMR 1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, CRB GADIE, Jouy-en-Josas, F-78350 France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 February 2009

Received in revised form 20 May 2009

Accepted 20 May 2009

Keywords:

Marine ingredients

Vegetable products

Liver

Metabolism

Transcriptome

Rainbow trout

ABSTRACT

Our objective was to analyse the hepatic transcriptomes of juvenile rainbow trout fed with a plant-based diet. We focused our analysis on the total replacement of fish meal (FM) and fish oil (FO) by a 100% plant-based diet (0% FM, 0% FO). We analysed the postprandial hepatic transcriptomes of rainbow trout fed the two diets 8 h after feeding. Six total hepatic RNAs from each dietary group were hybridised against a trout cDNA microarray (9K). After treatment of the data respecting the standard MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment) protocol, we found that 176 hepatic genes were differentially expressed between fish fed the two diets: 96 and 80 were over-expressed and under-expressed, respectively, in trout fed the plant-based diet. A large majority of differentially expressed genes were involved in metabolism (57%) and the others in cellular processes (21%) and transport (10%). Among the genes involved in metabolism ($n=86$), 37% were associated with protein metabolism (proteolysis, amino acid catabolism), 21% with lipid metabolism (fatty acid biosynthesis, cholesterol biosynthesis), 30% with nucleic acid metabolism and 8% with glucose metabolism. Specifically, we found in rainbow trout fed the 100% plant diet an over-expression of genes involved in lipid biosynthesis (cholesterol metabolism and desaturation of polyunsaturated fatty acids) and an over-expression of a new metabolic actor, i.e., glycerol kinase which plays a key role at the interface of glucose-lipid metabolism. Overall, these data demonstrate that a number of intermediary metabolic effects occur in trout fed a totally plant-based diet.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Feed for intensively farmed fish, still rely heavily on feedstuffs of marine origin, fish meal and fish oil (Tacon and Metian, 2008). Over the past 20 years, salmonid feeds have included large amounts of fish oil, given the beneficial effects on nitrogen utilisation and environmental loads (Cho and Kaushik, 1990; Sargent and Tacon, 1999). Such a high reliance on fish oil impairs the sustainability of fish farming (Naylor et al., 2000), while aquaculture is considered as a solution to the generally observed decline in fishery resources (FAO, 2006). Research is intense for finding ways to replace marine feedstuffs (fish meal and fish oil) by plant feedstuffs (Gatlin et al., 2007; Webster et al., 2007; Bell and Waagbø, 2008).

Efforts towards replacement of fish meal by other alternative protein sources have been undertaken since more than two decades and there is a vast amount of literature on partial replacement of fish meal by plant feedstuffs (Kaushik, 1990; Webster and Lim, 2002; Gatlin et al., 2007; Webster et al., 2007). It is clear that a substantial reduction in the dietary levels of fish meal can be achieved although total replacement of fish meal by plant ingredients is still not common in salmonids (Watanabe et al., 1998, 1999). Some earlier studies have shown that total replacement of fish meal by plant proteins leads to decreased growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) possibly linked to a modification of a number of hepatic metabolic pathways (Vilhelmsson et al., 2004).

With regard to fish oil, several studies with salmonids (rainbow trout, brown trout – *Salmo trutta*, Atlantic salmon – *Salmo salar*) have shown that it is possible to replace fish oil by single or a mixture of vegetable oils without affecting growth or feed efficiencies (Sargent and Tacon, 1999; Bell et al., 2003; Richard et al., 2006). Since the flesh fatty acid composition is known to be affected by the dietary fatty acid

* Corresponding author. INRA, UMR1067 Nutrition Aquaculture & Génomique, Pôle d'hydrobiologie, CD918; F-64310 St-Pée-sur-Nivelle, France. Tel.: +33 5 59 51 59 60; fax: +33 5 59 54 51 52.

E-mail address: panserat@st-pee.inra.fr (S. Panserat).

profiles, it is also known that once the fish are grown with vegetable oils over the major part of the life cycle, a finishing diet based on fish oil as the major lipid source must be used to tailor the final flesh fatty acid composition with the levels of $n-3$ polyunsaturated fatty acids (eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) ideally suited for human nutrition and health (Bell et al., 2003; Glencross et al., 2003; Regost et al., 2003).

We and others have recently analysed hepatic gene expression variation linked to either fish oil or fish meal replacement in salmonids (Jordal et al., 2005; Panserat et al., 2008; Leaver et al., 2008). This approach suggested the existence of some hepatic genes being new molecular markers linked with the intake of the plant-based feeds. For example, the replacement of fish oil by vegetable oils was associated with modification of genes involved in cholesterol biosynthesis (Leaver et al., 2008) and fatty acid biosynthesis (Jordal et al., 2005); whereas, the substitution of fish meal by plant proteins was linked with decreased capacity of protein biosynthesis and variation in nitrogen metabolism (Panserat et al., 2008). However, the concomitant and complete replacement of fish oil and fish meal by plant products has never been undertaken up to now. The objective of the present study was thus to analyse the hepatic gene expression profile in rainbow trout (*O. mykiss*) fed with or without either fish oil or fish meal, replaced respectively by a mixture of oils or proteins of vegetable origin. Using a transcriptomic approach can be useful to find new molecular markers which could explain the lower growth in fish fed 100% plant products. We analysed specifically the liver since this is the main organ involved in nutrient utilisation as the centre of intermediary metabolism in animals.

2. Experimental procedures

2.1. Feeds, fish rearing and samplings

Studies with animals were carried out in accordance with legislation governing the ethical treatment of animals, and investigators were certified by the French Government to carry out animal experiments (Authority: Prefecture of Pyrénées Atlantiques, 64000 Pau, for INRA St-Pée-sur-Nivelle). Animal experiments were in accordance with national law Decret no. 2001-464 of May 29, 2001, as applicable in INRA according to note de service INRA no. 2002-36, of April 4, 2002.

Juvenile rainbow trout (average weight 121 ± 2 g) were reared in the INRA experimental fish farm at constant water temperature (17 ± 1 °C) and under natural photoperiod conditions (Donzacq, Landes, France). Fish were fed during 9.5 weeks with two isoproteic (around 45% crude protein), isolipidic (around 27% crude fat) and isoenergetic (around 25 kJ/g) diets, differing by the lipid source; i.e., either fish oil or a mixture of vegetable oils (palm oil, linseed oil, rapeseed oil) and by the protein source; i.e., fish meal or a mixture of plant proteins (maize gluten, soybean seed and wheat gluten) (Table 1). The extruded feeds (Clextral B45, twin screw extruder) were produced in our feed unit (Donzacq, France).

Fish were randomly distributed into triplicate tanks per dietary treatment. Each diet was distributed by hand to visual satiation 6 days per week and feed consumption was recorded. After the 9.5-week trial, 25 representative fish of each dietary group linked to their mean size were selected to be unfed for 5 days and then fed once with their allocated diet, before being sacrificed 8 h after the meal. This fasting period contributed to homogenize the feed intake and the metabolic response of the fish within the same group and thus to obtain specifically a comparison between the effects of the two diets on the postprandial liver transcriptomes. The sampling at 8 h after feeding was chosen because we have previously shown that it corresponds to the postprandial peak of nutrient absorption for fish of this size at this water temperature (Panserat et al., 2002). Fish were sacrificed by a sharp blow on the head; we carefully checked that fish ate well by

Table 1

Composition of the two experimental diets.

	Marine diet	Plant diet
<i>Ingredients (%)</i>		
Fish meal LT (CP 70%) ^a	59	–
Corn gluten meal (CP 57%) ^b	–	20
Soybean meal (CP 46%) ^b	–	15.4
Wheat gluten (CP 78%) ^c	–	26
Corn ^d	7	7
Extruded whole wheat ^b	12	0.1
Fish oil ^a	19	–
Rapeseed oil ^e	–	11.6
Linseed oil ^e	–	4.6
Palm oil ^e	–	7
Soybean lecithin ^f	–	1
L-lysine ^g	–	1.2
L-arginine ^g	–	0.1
CaHPO ₄ ·2H ₂ O (18%P)	–	3
Astaxanthine ^h	0.03	0.03
Mineral premix ⁱ	1	1
Vitamin premix ^j	1	1
<i>Analytical composition</i>		
Dry matter (%DM)	94.1	90.9
Crude protein (CP, % DM)	45.9	44.4
Crude fat (% DM)	26.6	27.8
Crude starch (% DM)	12.1	11.3
Gross energy (kJ/g DM)	24.1	25.7

^a Sopropêche, Lorient, France.

^b Inzo, Argentan, France.

^c Roquette, Lestrem, France.

^d Lacadee Agro Industrie, Mont, France.

^e Daudruy, Dunkerque, France.

^f Louis François, Saint Maur, France.

^g Eurolysine, Paris, France.

^h Carophyll pink, DSM, Courbevoie, France.

ⁱ Supplied the following (mg/kg diet, except as noted): calcium carbonate (40% Ca) 2.15 g, magnesium hydroxide (60% Mg) 1.24 g, potassium chloride 0.9 g, ferric citrate 0.2 g, potassium iodine 4 mg, sodium chloride 0.4 g, calcium hydrogen phosphate 50 g, copper sulphate 0.3, zinc sulphate 40, cobalt sulphate 2, manganese sulphate 30, sodium selenite 0.3.

^j Supplied the following (mg/kg diet): retinyl acetate 2.58, DL-cholecalciferol 0.037, DL- α -tocopheryl acetate 30, menadione sodium bisulphite 2.5, thiamin 7.5, riboflavin 15, pyridoxine 7.5, nicotinic acid 87.5, folic acid 2.5, calcium pantothenate 2.5, vitamin B₁₂ 0.025, ascorbic acid 250, inositol 500, biotin 1.25 and choline chloride 500.

visualizing stomach and intestinal contents. Livers were removed, weighed and immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C pending analyses. Blood was removed from the caudal vein and centrifuged (3000 g, 5 min), and the recovered plasma was immediately frozen and kept at -20 °C pending the analysis of plasma metabolites.

2.2. Chemical composition of the diets

The experimental diets were analysed using the following procedures: dry matter after drying at 105 °C for 24 h, starch by the glucoamylase glucose oxidase method (Thivend et al., 1972), and gross energy in an adiabatic bomb calorimeter (IKA, Heitersheim Griebheimer, Germany). Protein content ($N \times 6.25$) was determined by the Kjeldahl method after acid digestion. Total lipid was determined by the method of Folch et al. (1957), after extraction by dichloromethane.

2.3. Plasma metabolites

Plasma glucose concentration was determined using the glucose oxidase method in a Beckman glucose analyser (Beckman II, USA). Plasma triacylglycerol levels were measured by colorimetric enzymatic assay using hepatic lipase (EC 3.1.1.3), glycerokinase (EC 2.7.1.30), glycerol-3-phosphate oxidase (EC 1.1.3.21) and peroxidase (EC 1.1.1.1) as

enzymes (PAP 150 kit, Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France). Plasma free fatty acid levels were measured by colorimetric enzymatic assay using acyl-CoA synthetase, acyl-CoA oxydase and peroxydase as enzymes (Wako Nefa C kit, Wako chemicals GmbH, Neuss, Germany).

2.4. cDNA microarrays

Nylon microarrays were obtained from INRA-GADIE biological resources centre (<http://www-crb.jouy.inra.fr/>) (Jouy-en-Josas, France). A total of 9023 rainbow trout cDNAs originating from a pooled-tissue library (Govoroun et al., 2006) plus 193 controls were spotted after PCR amplification. PCR products were spotted onto Hybond N+ membranes as described by Nguyen et al. (1995). Positive (plant luciferase cDNAs depot) and negative (water depot) controls were also spotted on each microarray.

2.5. Hybridisation: scanning and quantifications of microarrays

Total RNAs were extracted from rainbow trout liver using TRIzol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Six hepatic RNA samples corresponding to six individuals per dietary group were used for microarray hybridisation at INRA UMR1067 transcriptomic facility (St-Pée-sur-Nivelle, France) according to the following procedure. RNA quality was determined using Agilent bioanalyser. A first hybridisation was performed at 42 °C for 48 h using $\gamma^{32}\text{P}$ -labelled T7 promoter oligonucleotide (5'-CACTATAGGGAATTTGGCC-3') to estimate the amount of cDNA in each spot. After stripping (3 h 68 °C, 0.1× SSC, 0.2% SDS), hybridisations with hepatic cDNAs were performed. Microarrays were prehybridised for 1 h at 65 °C in hybridisation buffer (5× Denhardt, 5× SSC, 0.5% SDS). Labelled cDNAs were prepared from 5 µg of RNA by simultaneous reverse transcription and labelling for 1 h at 42 °C in the presence of 50 µCi [alpha-32P] dCTP, 5 µM cold dCTP and 800 µM of each dATP, dGTP and dTTP and 200 U of SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in a final volume of 30 µL. A positive control corresponding to the luciferase mRNA (20 ng) (Promega, Madison, Wisconsin, USA) was simultaneously prepared. RNA was degraded by treatment at 68 °C for 30 min with 1 µl 10% SDS, 1 µl 0.5 M EDTA and 3 µl 3 M NaOH and then equilibrated at room temperature for 15 min. Neutralisation was done by adding 10 µl 1 M Tris-HCl and 3 µl 2 N HCl. Microarrays were then incubated with the corresponding denatured labelled cDNA for 48 h at 65 °C in hybridisation solution. After 3 washes (1 h 68 °C with 0.1× SSC 0.2% SDS), microarrays were exposed for 65 h to phosphor-imaging plates that were scanned using a FUJI BASS 5000 (Ray-test France SARL). Signal intensities were quantified using AGScan software (bioinformatic platform Sigene: <http://www.sigene.org/>) (Lopez et al., 2004; Cathelin et al., 2007).

2.6. Microarray data analysis

Microarray data were deposited in BASE (BioArray Software Environment) database (Saal et al., 2002), a MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment)-supportive customisable database available at the bioinformatic platform Sigene (<http://www.sigene.org/>). Signal processing was performed using vector oligonucleotide data to correct the relative amount of DNA present in each spot. At this step, low nucleotide signals (less than 3 times the background level) were excluded from the analysis. After correction, signal was normalised by dividing each gene expression by the median value of the array before log transformation. Data were subsequently analysed using statistical TMEV (Tigr Multiple Experiment Viewer) software which is a suite of microarray data analysis applications (Saeed et al., 2003): variation of gene expressions between two dietary treatments was termed significant when the False Discovery Rate (FDR) value was <10% using the SAM (statistical analysis of microarrays) procedure (Tusher et al., 2001; Pan, 2002) and followed by supervised hierarchical clustering for significant genes only. Organization of genes for biological

interpretation in the context of Gene Ontology was performed using GoMiner software (<http://discover.nci.nih.gov/gominer/>) (Zeeberg et al., 2003).

2.7. Data mining

Rainbow trout sequences originating from INRA Agenae (Govoroun et al., 2006) and USDA (Rexroad et al., 2003) and EST sequencing programs were used to generate publicly available contigs (<http://public-contigbrowser.sigene.org:9090/index.html>). The 4th version (om.4) was used for BlastX (Basic Local Alignment Search Tool) comparison (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) with a cut-off value of 1e−05. The score of each alignment was retrieved after performing a Blast X comparison.

2.8. Real-time RT-PCR

Gene expression levels were determined by real-time RT-PCR using the six RNA samples per dietary treatment included in the microarray analysis. One µg of total RNA was reverse transcribed to cDNA with the Superscript™ III RNase H Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) using oligo dT primers. Real-time PCR was performed in the iCycler iQ™ (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). Quantitative PCR (Q-PCR) analyses for gene expressions were performed on 10 µl of the RT reaction mixture using the iQ™ SYBR® Green Supermix (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). The total volume of the PCR reaction was 25 µl containing 200 nM of each primer. Primers were designed so that they were overlapping an intron when it was possible (Primer3 software; http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) using known sequences in nucleotide databases: β -actin gene was amplified with the primer pair (5'-GATGGCCAGAAAGACACAGCTA-3') and (5'-TCGTCCCAGTTGGTGACGAT-3'), glycerol kinase gene using the primers (5'-GTTTGGCAGGAAGGTCGCTC-3') and (5'-CAGCGCCTGTCCCATCTCT-3') and $\Delta 6$ -desaturase with the primer pair (5'-AGGGTGCTCTGCTAACTGG-3') and (5'-TGGTGTTGGTGATGGTAGGG-3').

Thermal cycling was initiated with the incubation at 95 °C for 90 s for hot-start iTaq™ DNA polymerase activation. Thirty five steps of PCR were performed, each one consisting of heating at 95 °C for 20 s for denaturing, and at 59 °C for 30 s for annealing and extension. Following the final cycle of the PCR, melting curves were systematically monitored (with a gradient of 0.5 °C/10 s from 55 °C to 94 °C) to ensure that only one fragment was amplified. Samples without reverse transcriptase and samples without RNAs were run for each reaction as negative controls.

For the qRT-PCR data, significant differences were considered at $p < 0.05$. Relative quantification of the target gene transcript with β actin reference gene transcript was made following the Pfaffl method with the Relative Expression Software tool (REST©) (Pfaffl, 2001; Pfaffl et al., 2002). This mathematical algorithm computes an expression ratio, based on real-time PCR efficiency and the crossing point deviation of the unknown sample versus a control group: $R = \frac{(E_{\text{target gene}})^{\Delta \text{CT}_{\text{target gene}} (\text{mean control} - \text{mean unknown sample})}}{[(E_{\beta \text{Actin}})^{\Delta \text{CT}_{\beta \text{Actin}} (\text{mean control} - \text{mean unknown sample})}]}$ where E is PCR efficiency determined by standard curve using serial dilution of cDNA (cDNA dilutions from 1/16 up to 1/512); ΔCT being the crossing point deviation of an unknown sample versus a control. Statistical differences in gene expression between control and sample were evaluated in group means by randomisation tests (Pfaffl, 2001; Pfaffl et al., 2002) using REST© software. Two thousand random allocations were performed and significant differences were considered at $p < 0.05$.

2.9. Statistical analysis

Growth, efficiencies, feed intake and plasma metabolite parameters are presented as means $\pm$ standard deviation. We analysed

the effects of the different diets with an unpaired two-tailed Student's *t*-test (Systat 9 software products, SPSS Inc).

3. Results

After 9.5 weeks of the feeding trial, rainbow trout fed with plant proteins and vegetable oils (plant diet) exhibited significantly lower growth rates, feed efficiency, protein efficiency and decreased feed intake than those fed with fish meal and fish oil (marine diet) ($p < 0.05$, Student *t*-test) (Table 2). After a fasting period of 5 days followed by a successful refeeding, 8 h after this last meal, no significant differences were observed between dietary treatments ($p > 0.05$, Student *t*-test) for plasma metabolites (glucose, free fatty acids and triglycerides) (Table 2). Whereas the viscero-somatic index was significantly modified (with a higher level of perivisceral tissue in fish fed the plant diet (Table 2)), hepato-somatic index was unchanged between the dietary treatments (Table 2) allowing us to analyse the hepatic gene expression profiles. The analysis of the hepatic transcriptome showed that almost 2% of the genes were differentially expressed between fish fed the marine diet and those fed the plant diet (FDR = 5.45%, SAM test; TMEV) with relatively low fold changes (between 1.2 and 1.5). Among the 176 genes differentially expressed between these two groups, a similar amount of genes exhibited higher ($n = 96$) and lower ($n = 80$) expression in fish fed plant diet.

Significance of the 176 differentially expressed gene expression profiling was evaluated using Gene Ontology analysis. Even though 28 genes had unknown identification (17%), the other 148 genes were associated with biological annotation and were then clustered in functional groups as shown in Table 3 (GoMiner analysis). A large majority of the differentially expressed genes were involved in metabolism (57%) and some in a lower proportion in cellular process (21%) and in transport (10%) (Tables 3, 4 and 5).

Table 2

Effects of fish oil and fish meal replacement on growth performance, feed efficiency, feed intake and plasma parameters in juvenile rainbow trout (initial body weight (IBW) = 121 g).

	Fish fed marine diet		Fish fed plant diet		P-values
	Mean	SD	Mean	SD	
<i>Zootechnical parameters</i>					
Final body weight (FBW) (g)	509.1	7.1	427.2	2.8	0.00005
Daily growth index ^a	4.52	0.08	3.84	0.05	0.0002
Feed efficiency ^b	1.08	0.02	0.94	0.01	0.0005
Protein efficiency ratio ^c	2.49	0.04	2.33	0.03	0.007
Feed intake ^d	5.45	0.13	4.94	0.04	0.003
<i>Index</i>					
HSI ^e	1.1	0.1	1.0	0.1	NS
VSI ^f	9.2	1.7	10.9	1.9	<i>p</i> < 0.05
<i>Plasmatic parameters (8 h after feeding)</i>					
Glycemia (g/l)	1.09	0.27	1.39	0.4	N.S
Free fatty acids (mEq/l)	0.27	0.07	0.24	0.02	N.S
Triglycerides (g/l)	2.27	1.34	2.03	0.87	N.S

P-values are shown when the differences are significant ($p < 0.05$, Student's *t*-test). Data are expressed as means $\pm$ standard deviation (SD) ($n = 3$ tanks). The plasma parameters were measured after the long-term feeding trial (9.5 weeks) followed by a fasting-refeeding sequence ($n = 8$ fish per diet). N.S: no significant differences between groups ($p > 0.05$, *t*-test Student).

^a Daily growth index: $100 \times (\text{FBW}^{1/3} - \text{IBW}^{1/3}) / \text{duration}$ (67 days).

^b Feed efficiency: Wet Weight gain (g)/dry feed intake (g).

^c Protein efficiency ratio: Wet weight gain (g)/crude protein intake (g).

^d Feed intake: feed intake (g)/ind/day.

^e Hepatosomatic index = liver weight $\times$ 100/body weight.

^f Viscerosomatic index = viscera weight $\times$ 100/body weight.

Table 3

Global repartition of the $n = 148$ (annotated) differentially expressed hepatic genes between fish fed the two experimental marine and plant diets 8 h after the last meal ($n = 6$ individuals per group).

Pathways and biological function	Differentially expressed genes (%)	Up-regulated genes in fish fed plant diet	Down-regulated genes in fish fed plant diet
Metabolism	86 (57.5%)	48	36
Protein	33	19	14
Lipid	17	11	6
Glucose	7	2	5
Nucleic acid	25	14	11
Others	4	2	2
Cellular process	30 (20.5%)	14	16
Cell cycle	11		
Apoptosis	6		
Biogenesis	2		
Cell communication	6		
Cell adhesion	3		
Others	2		
Transport	14 (9.6%)	10	4
Others	18 (12.4%)	8	10

These data were extracted after statistical analysis of microarrays (FDR = 5.45%) for detection of differentially expressed genes and then from gene ontology analysis (GoMiner) for clustering differentially expressed genes by function.

Concerning the cellular process, a major proportion of the genes was found to be involved in cell cycle regulation (such as those involved in apoptosis or cell movement); whereas, some nutrient (fatty acid, retinoid acid) transporters were expressed higher in fish fed the plant diet (Table 4).

Among the 86 genes linked with metabolism (Table 5), 57 genes (69%) were associated with intermediary metabolism; 33 genes related to protein metabolism (37%), 17 genes to lipid metabolism (21%), and 7 genes to glucose metabolism (8%) (Table 5). More precisely, in the group of genes coding for protein playing a role in protein metabolism, we observed some involved in proteolysis (calpain, carboxypeptidases A1) and protein synthesis (ribosomal proteins, initiation factors) but none involved in amino acid catabolism or anabolism. However, no major groups of genes involved in nitrogen metabolism emerged clearly from the analysis. In the group of genes linked with lipid metabolism, we observed in fish fed the plant diet, an over-expression of genes involved in cholesterol metabolism (24-dehydrocholesterol reductase precursor, C-4 methyl-steroid oxidase, 3-beta-hydroxysteroid-delta(8),delta(7)-isomerase), two genes involved in fatty acid beta-oxidation (3,2-transenoyl-CoA isomerase, trifunctional enzyme subunit), one key gene linked to desaturation of polyunsaturated fatty acid (Delta6/Delta5-desaturase) and one gene involved in glycerol metabolism (glycerol kinase; EC 2.7.1.30). Genes involved in lipid (sterol, phospholipid, glycerolipid) biosynthesis (dehydrogenase/reductase SDR family member; diacylglycerol kinase, acyl-coA:lysophosphatidylglycerol acyltransferase) were largely represented in the under-expressed gene group of plant-fed fish. In the small group of glucose metabolism genes, some genes involved in glycolysis–gluconeogenesis (catalysing the first step of each of these metabolic pathways, i.e. glucose phosphorylation by hexokinase (EC 2.7.1.1) and phosphoenolpyruvate transformation to pyruvate by mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (EC 4.1.1.32)) were expressed at a lower level in the plant-fed fish. Finally, 30% of the genes ($n = 25$) in the group of metabolism were found to be linked to nucleic acid metabolism; they coded mainly for transcriptional–nuclear-factors (playing a key role in transcription regulation not known to be related to nutritional regulation) and, as expected, some of them were either lower and higher expressed in fish fed the plant diet. Of these, only the peroxysome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1-beta (PGC1 β) could play a role in the regulation of the intermediary

Table 4

Functional groups (except the metabolic group detailed in Table 5) of hepatic transcripts exhibiting lower (*italic letters*) or higher (normal letters) abundance in fish fed the 100% plant diet 8 h after the last meal ($n = 6$ individuals per group).

Biological process	Swissprot-hit-description	best_swissprot_hit_accession number	Fold changes
Cellular process	Nuclear-associated protein) (NAP)	CTBL1_HUMAN	+1.4
	Programmed cell death protein 6	PDCD6_MOUSE	+1.2
	Pleckstrin homology-like domain family A member 2 (tumor-suppressing STF cDNA 3 protein)	PHLA2_HUMAN	+1.2
	Apoptosis response zinc finger protein	REQU_MOUSE	+1.4
	RING finger protein 122	RN122_MOUSE	+1.2
	Protocadherin alpha 7 precursor (PCDH-alpha7)	PCDA7_HUMAN	+1.2
	GEM-interacting protein (GMIP)	GMIP_HUMAN	+1.3
	Tensin	TENS_CHICK	+1.4
	WD repeat protein 12 (YTM1 homolog)	WDR12_HUMAN	+1.2
	Condensin complex subunit 3	CND3_XENLA	+1.2
	Histone H5A	H5A_XENLA	+1.4
	Kinesin-like protein KIF3B	KIF3B_MOUSE	+1.3
	Kinetochore protein Hec1 homolog	KNTC2_BRARE	+1.3
	Thioredoxin-like protein 4A	TXN4A_MOUSE	+1.4
	<i>Poly [ADP-ribose] polymerase 4 (EC 2.4.2.30) (PARP-4)</i>	<i>PARP4_HUMAN</i>	−1.2
	<i>Dynein intermediate chain 2, axonemal</i>	<i>DNAI2_HUMAN</i>	−1.2
	<i>Four and a half LIM domains protein 3</i>	<i>FHL3_MOUSE</i>	−1.3
	<i>Cadherin-11 precursor (osteoblast-cadherin)</i>	<i>CAD11_HUMAN</i>	−1.4
	<i>Zonadhesin (fragment)</i>	<i>ZAN_RABIT</i>	−1.2
	<i>Neogenin (fragment)</i>	<i>NEO1_CHICK</i>	−1.2
	<i>Calcium-binding protein 1 (CaBP1) (caldendrin)</i>	<i>CABP1_RAT</i>	−1.3
	<i>Insulin receptor substrate 1 (IRS-1) (pp185)</i>	<i>IRS1_RAT</i>	−1.3
	<i>Lysophosphatidic acid receptor LPA1 homolog 2 (xLPA1-2)</i>	<i>LPA12_XENLA</i>	−1.3
	<i>Kinesin-like protein KIF22</i>	<i>KIF22_HUMAN</i>	−1.3
	<i>Kinesin-like protein KIF2C</i>	<i>KIF2C_CRIGR</i>	−1.2
	<i>Microtubule-associated protein RP/EB family member 1</i>	<i>MARE1_XENTR</i>	−1.3
	<i>Transforming growth factor beta-2 precursor (TGF-beta-2)</i>	<i>TGFB2_XENLA</i>	−1.3
	<i>Cytospin-A</i>	<i>CYTA_BARE</i>	−1.2
	<i>Annexin A13</i>	<i>ANX13_HUMAN</i>	−1.2
Transport	<i>Retinoblastoma-binding protein 9 (RBBP-9)</i>	<i>RBBP9_RAT</i>	−1.2
	<i>Fatty acid-binding protein, heart (H-FABP)</i>	<i>FABPH_ONCMY</i>	+1.2
	<i>Hemopexin precursor (Beta-1B-glycoprotein)</i>	<i>HEMO_HUMAN</i>	+1.3
	<i>Nucleoporin NUP53</i>	<i>NUP53_BRARE</i>	+1.2
	<i>Retinoid-binding protein 7 (CRBP4)</i>	<i>RET7_MOUSE</i>	+1.3
	<i>Selenium-binding protein 1</i>	<i>SBP1_HUMAN</i>	+1.3
	<i>Vesicle-trafficking protein SEC22a</i>	<i>SC22A_HUMAN</i>	+1.3
	<i>Sorting nexin-11</i>	<i>SNX11_HUMAN</i>	+1.2
	<i>Sorting nexin-24</i>	<i>SNX24_HUMAN</i>	+1.4
	<i>Syntaxin-2 (Epimorphin)</i>	<i>STX2_HUMAN</i>	+1.3
	<i>Voltage-dependent anion-selective channel protein 3 (VDAC-3)</i>	<i>VDAC3_RABIT</i>	+1.3
	<i>Metaxin-1</i>	<i>MTX1_MOUSE</i>	−1.2
	<i>P3 protein (solute carrier family 10 member 3)</i>	<i>P3_HUMAN</i>	−1.2
	<i>Ras-related protein Rab-24</i>	<i>RAB24_HUMAN</i>	−1.2
	<i>Protein TMED8</i>	<i>TMED8_HUMAN</i>	−1.3
Other functions	<i>Doublecortin domain-containing protein 2</i>	<i>DCDC2_HUMAN</i>	+1.4
	<i>Probable ATP-dependent RNA helicase DDX49 (EC 3.6.1.-)</i>	<i>DDX49_HUMAN</i>	+1.2
	<i>Hemagglutinin/amebocyte aggregation factor precursor (18K-LAF)</i>	<i>HAAF_LIMPO</i>	+1.2
	<i>Ig kappa chain V region K29-213</i>	<i>KV15_RABIT</i>	+1.2
	<i>Ig lambda-1 chain C region</i>	<i>LAC1_MOUSE</i>	+1.2
	<i>Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A</i>	<i>MYPT1_HUMAN</i>	+1.3
	<i>Serum amyloid P-component precursor (SAP)</i>	<i>SAMP_CAVPO</i>	+1.2
	<i>Protein yippee-like 5</i>	<i>YPEL5_PONPY</i>	+1.3
	<i>Dystrophin</i>	<i>DMD_CHICK</i>	−1.3
	<i>Late embryogenesis abundant protein 1 (Aavlea1)</i>	<i>LEA1_APHAV</i>	−1.3
	<i>LIM domain-containing protein 2</i>	<i>LIMD2_BOVIN</i>	−1.2
	<i>Leucine-rich repeat-containing protein 1 (LAP and no PDZ protein)</i>	<i>LRRC1_HUMAN</i>	−1.2
	<i>RNA-binding protein 12 (RNA-binding motif protein 12)</i>	<i>RBM12_MACMU</i>	−1.3
	<i>Receptor expression-enhancing protein 3</i>	<i>REEP3_BRARE</i>	−1.3
	<i>RuvB-like 2 (EC 3.6.1.-) (Reptin) (zReptin)</i>	<i>RUVB2_BRARE</i>	−1.3
	<i>Surfeit locus protein 2 (Surf-2)</i>	<i>SURF2_FUGRU</i>	−1.4
	<i>CSL-type zinc finger-containing protein 3</i>	<i>ZCSL3_HUMAN</i>	−1.3
	<i>HEAT repeat-containing protein 2</i>	<i>HEAT2_HUMAN</i>	−1.3

These data were extracted after statistical analysis of microarrays (FDR = 5.45%) for detection of differentially expressed genes and then from gene ontology analysis (GoMiner) for clustering genes by function. + and − regulation means that the target gene is expressed at a lower or higher level, respectively.

metabolic pathway regulating potentially fatty acid beta-oxidation, gluconeogenesis and ketogenesis.

We focused the present study on two genes which can illustrate the intermediary metabolic pathway modified in rainbow trout liver by

the diet variation. In this context, two genes involved in lipid metabolism ($\Delta 6$ -desaturase gene) and at the interface between lipid and glucose metabolism (glycerol kinase) have been selected. Using the same six individuals per dietary group and the quantitative RT-PCR,

Table 5
Detailed group of hepatic transcripts involved in metabolism exhibiting lower (*italic letters*) or higher (normal letters) abundance in fish fed the 100% plant diet compared to fish fed fish oil and meal, 8 h after the last meal ($n = 6$ individuals per group).

Biological process	Swissprot-hit-description	best_swissprot_hit_accession number	Fold changes
Protein metabolism	Acetylcholinesterase precursor (EC 3.1.1.7)	ACES_BUNFA	+1.3
	Calpain-5 (EC 3.4.22.-)	CAN5_MOUSE	+1.3
	Carboxypeptidase A1 precursor (EC 3.4.17.1)	CBPA1_HUMAN	+1.2
	Complement C3-1	CO3_ONCMY	+1.3
	Carboxy-terminal domain RNA polymerase II polypeptide A small phosphatase 1 (EC 3.1.3.16)	CTDS1_MOUSE	+1.4
	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase A chain	F13A_MOUSE	+1.3
	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	PSMD2_HUMAN	+1.2
	Tubulin polyglutamylase complex subunit 4	LRC49_MOUSE	+1.2
	Glutathione S-transferase zeta 1 (EC 2.5.1.18)	MAAI_MOUSE	+1.2
	Nucleolar complex protein 2 homolog	NOC2L_MOUSE	+1.3
	Alpha-aspartyl dipeptidase (EC 3.4.13.21)	PEPE_XENLA	+1.2
	Polysialoglycoprotein precursor (PSGP)	PSGP_ONCMY	+1.3
	60S ribosomal protein L36a (60S ribosomal protein L44)	RL36A_RAT	+1.2
	28S ribosomal protein S26, mitochondrial precursor (MRP-S26)	RT26_RAT	+1.3
	SPRY domain-containing SOCS box protein 1 (SSB-1)	SSB1_HUMAN	+1.3
	Threonyl-tRNA synthetase, cytoplasmic (EC 6.1.1.3)	SYTC_MOUSE	+1.3
	Tubulin-specific chaperone cofactor E-like protein	TBCEL_MOUSE	+1.2
	Transmembrane BAX inhibitor motif-containing protein 4	TMBI4_MOUSE	+1.2
	Amyloid protein-binding protein 1 (APP-BP1)	ULA1_BRARE	+1.2
	<i>Acrosin precursor (EC 3.4.21.10)</i>	ACRO_HUMAN	−1.4
	<i>Anaphase-promoting complex subunit 2 (APC2)</i>	ANC2_HUMAN	−1.3
	<i>Actin-related protein 6 (hArp6)</i>	ARP6_HUMAN	−1.3
	<i>Ankyrin repeat and SOCS box protein 13 (ASB-13)</i>	ASB13_HUMAN	−1.4
	<i>Cell division cycle protein 23 homolog</i>	CDC23_HUMAN	−1.2
	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 4 (EC 2.7.11.1)</i>	E2AK4_MOUSE	−1.2
	<i>Translation initiation factor eIF-2B subunit delta</i>	EI2BD_RAT	−1.2
	<i>HECT domain and RCC1-like domain-containing protein 2</i>	HERC2_MOUSE	−1.3
	<i>Hepatocyte growth factor-like protein [Precursor]</i>	HGFL_HUMAN	−1.3
	<i>MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3 (EC 2.7.11.1)</i>	MARK3_HUMAN	−1.2
	<i>Transmembrane protease, serine 6 (EC 3.4.21.-)</i>	TMPS6_MOUSE	−1.2
	<i>Ubiquitin fusion degradation protein 2</i>	UBE4B_HUMAN	−1.2
	<i>Acrosin precursor (EC 3.4.21.10)</i>	ACRO_HUMAN	−1.3
	<i>Anaphase-promoting complex subunit 2 (APC2)</i>	ANC2_HUMAN	−1.3
Lipid metabolism	Acyl-coenzyme A thioesterase 1 (EC 3.1.2.2)	ACOT1_RAT	+1.3
	3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor (EC 5.3.3.8)	D3D2_MOUSE	+1.3
	24-dehydrocholesterol reductase precursor (EC 1.3.1.-)	DHC24_HUMAN	+1.4
	3-beta-hydroxysteroid-delta(8),delta(7)-isomerase (EC 5.3.3.5)	EBP_HUMAN	+1.3
	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial precursor (TP-alpha)	ECHA_HUMAN	+1.2
	C-4 methylsterol oxidase (EC 1.14.13.72)	ERG25_BRARE	+1.4
	Delta-5/delta-6 fatty acid desaturase (EC 1.14.19.-)	FADS_BRARE	+1.5
	Glycerol kinase (EC 2.7.1.30)	GLPK_PYRAB	+1.3
	Cytosolic phospholipase A2 (cPLA2)	PA24A_HUMAN	+1.2
	Putative phosphoethanolamine N-methyltransferase 3 (EC 2.1.1.103)	PEAM3_ARATH	+1.2
	PCTP-like protein (PCTP-L) (StAr-related lipid transfer protein 10)	PCTL_MOUSE	+1.2
	<i>Arylacetamide deacetylase (EC 3.1.1.-) (AADAC)</i>	AAAD_HUMAN	−1.2
	<i>ATP-citrate synthase (EC 2.3.3.8)</i>	ACLX_MOUSE	−1.2
	<i>Diacylglycerol kinase beta (EC 2.7.1.107)</i>	DGKB_RAT	−1.2
	<i>Dehydrogenase/reductase SDR family member 8 precursor (EC 1.1.1.-)</i>	DHRS8_HUMAN	−1.3
	<i>Acyl-CoA:lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1 (EC 2.3.1.-)</i>	LGAT1_HUMAN	−1.2
	<i>85 kDa calcium-independent phospholipase A2 (EC 3.1.1.4)</i>	PA2G6_MOUSE	−1.2
	Glucose-1-phosphate cytidylyltransferase (EC 2.7.7.33)	RFBF_SALTY	+1.2
	Rhamnose-binding lectin precursor (SAL) (RBL)	SAL_SILAS	+1.3
Glucose metabolism	<i>Carbohydrate sulfotransferase 1 (EC 2.8.2.21)</i>	CHST1_BRARE	−1.3
	<i>Glycoprotein 6-alpha-L-fucosyltransferase</i>	FUT8_PANTR	−1.3
	<i>Hexokinase-2 (EC 2.7.1.1)</i>	HXK2_HUMAN	−1.2
	<i>Phosphoglucomutase-2 (EC 5.4.2.2)</i>	PGM2_HUMAN	−1.2
	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial precursor (EC 4.1.1.32)</i>	PPCKM_MOUSE	−1.3
	Activity-dependent neuroprotector	ADNP_RAT	+1.3
	Lymphoid nuclear protein related to AF4	AFF3_HUMAN	+1.3
	Transcriptional regulator ATRX (EC 3.6.1.-) X-linked nuclear protein	ATRX_PONPY	+1.2
	Histone H2A	H2A_ONCMY	+1.3
	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia protein 2	MLL2_HUMAN	+1.2
Nucleic acid metabolism	Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit	NFKB1_CHICK	+1.3
	Transcriptional repressor NF-X1 (EC 6.3.2.-)	NFX1_HUMAN	+1.4
	Superkiller viralicidic activity 2-like 2 (EC 3.6.1.-)	SK2L2_HUMAN	+1.3
	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	SMD2_MOUSE	+1.2
	Transcription factor Sox-19b	SX19B_BRARE	+1.3
	Oxidoreductase HTATIP2 (EC 1.1.1.-)	TIP30_HUMAN	+1.2
	Transducin-like enhancer protein 1 (Groucho-related protein 1)	TLE1_MOUSE	+1.3
	Homeobox protein unc-4	UNC4_DROME	+1.2
	Zinc finger protein 184	ZN184_HUMAN	+1.2
	<i>Forkhead box protein C1 (Forkhead-related protein FKHL7)</i>	FOXC1_HUMAN	−1.3
	<i>Erythroid transcription factor (GATA-binding factor 1)</i>	GATA1_HUMAN	−1.4

Table 5 (continued)

Biological process	Swissprot-hit-description	best_swissprot_hit_accession number	Fold changes
Nucleic acid metabolism	Transcription cofactor HES-6	HES6_MOUSE	−1.2
	Homeobox protein Hox-B13a	HXBDA_BRARE	−1.2
	Protein KIAA1915-actin filament-associated protein 1-like 2	K1914_HUMAN	−1.2
	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1-beta	PRGC2_RAT	−1.4
	DNA replication complex GINS protein PSF2	PSF2_HUMAN	−1.3
	Retinoblastoma-associated protein	RB_HUMAN	−1.2
	RING finger protein 4 (SNURF)	RNF4_RAT	−1.2
	Small nuclear RNA-activating complex polypeptide 1	SNPC1_HUMAN	−1.3
	tRNA (5-methylaminomethyl-2-thiouridylate)-methyltransferase (EC 2.1.1.61)	TRMU_MOUSE	−1.3
	Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 2 (EC 1.1.1.-)	DH12_RAT	+1.2
Other metabolisms	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic (EC 1.1.1.42)	IDHC_RAT	+1.3
	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 5-phosphatase A (EC 3.1.3.56)	PI5PA_MOUSE	−1.3
	Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase 1	NUDT3_MOUSE	−1.3

These data were extracted from statistical analysis of microarrays (FDR = 5.45%) for detection of differentially expressed genes and then from gene ontology analysis (GoMiner) for clustering genes by function. + and − regulation means that the target gene is expressed at a lower or higher level, respectively.

we confirmed that glycerol kinase and $\Delta 6$ -desaturase were expressed higher by 2.6 and 4.1-fold, respectively, in fish fed the plant diet ($p < 0.05$; REST test).

4. Discussion

4.1. Rainbow trout fed with 100% plant diet: diet and growth performance

This study explored for the first time the effects of a concomitant replacement of dietary fish meal and fish oil by plant-based products in farmed salmonid. Even though intake of the 100% based-plant diet by juvenile rainbow trout was not associated with major problems involving fish health, fish mortality or fish deformities (our own observations), we observed lower growth performance of these fish which seems to be due to a combination of a lower feed intake and a lower feed (protein) efficiency. We can hypothesize that the lower growth performance in fish fed plant products was mainly linked to the fish meal replacement and not to the fish oil substitution, as has been previously observed in this species (Kaushik et al., 1995; Watanabe et al., 1998; Richard et al., 2006; Panserat et al., 2008) and others (Watanabe et al., 1999; Kaushik et al., 2004; Gomez-Requeni et al., 2004). Recently, Torstensen (2008) showed also decreased feed intake and growth depression in Atlantic salmon (*S. salar*) fed on combined replacement of fish meal and fish oil with plant meal and vegetable oil blends at 80% and 70% levels, respectively. Finally, the lower feed efficiency found in fish fed plant feedstuffs could be due to a poor metabolic adaptation of fish, especially in the liver which is the centre of intermediary metabolism and nutrient partitioning. Analysis of the hepatic transcriptome could detect either expected or unexpected molecular actors linked to the drastic modification of diet, as previously described in salmonids after diet modification (Jordal et al., 2005; Panserat et al., 2008; Kolditz et al., 2008; Leaver et al., 2008) but also in other physiological situations such as after the fasted-fed status (Salem et al., 2007) and after hormonal (cortisol, growth hormone) treatment (Aluru and Vijayan, 2007; Gahr et al., 2008). We chose to establish a standard fasting–refeeding protocol. Even though this protocol could not allow us to strictly analyse the long-term effects of the two diets on the hepatic transcriptomes because these effects may be masked by the fasting stage (but not totally as reflected by the drastic variation of the $\Delta 6$ -desaturase gene expression – linked to the nature of introduced oils – found in the present study), it had the advantages to homogenize the metabolic parameters before feeding and to obtain a constant feed intake regardless of the diet. This experimental design allowed us to analyse specifically the effect of the two diets on the postprandial hepatic transcriptomes.

4.2. Hepatic gene expression profiles linked to the total replacement of dietary marine resources in rainbow trout: general considerations

This is the first ever analysis of the fish hepatic transcriptome after total replacement of marine ingredients (fish oil and fish meal) by

100% plant products. Our analysis of the hepatic transcriptomes revealed that less than 200 genes (of the 9000 genes of the multi-tissue library) were differentially expressed between the two groups (<2%), which is a relatively low number of differentially expressed genes. However, the low number of differentially hepatic expressed genes linked to dietary composition confirmed what we had observed earlier in trout fed feeds with fish oil or fish meal substituted by plant oils or proteins using the same 9K trout microarray (Panserat et al., 2008). These results could be explained by the fact that, although the two diets differed in terms of ingredient origin (marine resources versus plant), they were isoproteic, isolipidic and isoenergetic. Interestingly, as generally observed in hepatic nutrigenomic studies (Swanson, 2008), the majority of the differentially expressed genes could be included into the functional group of (intermediary) metabolism (Table 5). Genes classified in the functional groups other than intermediary metabolism could be also interesting from a physiological point of view (such as the over-expression of some genes linked to the acquired immunity (immunoglobulin – Ig-genes) (Randelli et al., 2008) and of a group of cellular endocytosis and trafficking proteins (e.g. sortin nexin genes) (Worby and Dixon, 2002) as well as the under expression of genes involved in intracellular transport along cytoskeletal tracks such as kinesin and dynein genes (Vale, 2003) in fish fed the 100% plant diet. However, we focus our discussion on the differentially expressed actors of intermediary metabolism from the nutrigenomic point of view.

4.3. Effects on intermediary metabolism

The actors linked with protein metabolism constituted the largest group showing differential gene expressions between the two groups; this could be related to the high protein requirement of rainbow trout and thus a higher sensitivity of these fish to changes in dietary protein quality (Cowey and Walton, 1989). However, it was not very easy to determine precisely a specific – up or down – regulated protein metabolic pathway in fish fed the 100% plant diet; some of these actors in different proteolytic systems were induced (calpain, carboxypeptidase, dipeptidase, 26S proteasome subunit) but for the actors involved in protein synthesis, some were induced (ribosomal proteins L36 and S26) and the others diminished (two translation initiation factors). These results are somewhat in contrast to our previous transcriptomic studies clearly showing a down regulation of a large number of ribosomal actors (10 ribosomal proteins involved in proteosynthesis) in fish fed plant proteins compared to fish fed fish meal (Panserat et al., 2008). Two major reasons to explain this discordance could be (i) the combined effect of low essential fatty acid level (found mainly in fish oil) along with a change in amino acid profile (due to the fish meal replacement) which had never been tested before and (ii) the experimental fasting–refeeding design which could have masked some of the effects at long term observed previously (Panserat et al., 2008). Our data suggest also a decrease in hepatic glucose metabolism as

reflected by lower gene expression of hexokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase enzymes respectively catalyzing the first steps of glycolysis and gluconeogenesis (Pilkis and Granner, 1992). The variation of hexokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression was unexpected due to the similar dietary carbohydrate levels in all diets (almost 10%) and the well known poor control of these two enzymes by feeding in fish (Panserat et al., 2000, 2001). However, since a number of other glucose enzymes and other types of regulation (phosphorylation, allosteric) play key roles in dietary carbohydrate use in the liver, biological significance of the observed changes in glucose gene expression is limited.

At the level of lipid metabolism, data are interesting, confirming some previous observations and discovering potential molecular markers linked to plant ingredient incorporation. Firstly, we confirmed some of the earlier data obtained after substitution of fish oil by vegetable oils in Atlantic salmon (Leaver et al., 2008): we observed higher levels of gene expression of enzymes involved in cholesterol biosynthesis and in the fatty acid desaturation process in fish fed the 100% plant diet, suggesting a potential alteration of the lipid biosynthetic pathway in the liver. The induction of the desaturation metabolic pathway (as confirmed by a 4-fold induction of $\Delta 6$ -desaturase mRNA level by real-time PCR) could be easily explained by the replacement of fish oil (rich in $n-3$ long-chain unsaturated fatty acids known to be strong inhibitors of $\Delta 6$ -desaturase gene expression) by vegetable oils (poor in $n-3$ long-chain unsaturated fatty acids), as was shown in rainbow trout liver (Seiliez et al., 2001). The increase of $\Delta 6$ -desaturase gene expression could be also amplified by the concomitant suppression of fish oil and fish meal (containing 8% of lipids) which results in a diet almost devoid of $n-3$ long-chain unsaturated fatty acids. The positive effects on genes of the cholesterol biosynthesis pathway reveal that fish fed the plant diet were able to respond to reduced dietary cholesterol levels in the plant diet (presently the levels of cholesterol were 0.52% versus 0.3% of dry matter for marine and plant diets, respectively; G Corraze personal communication). Secondly, on the other hand, we found a drastic molecular induction of a new metabolic marker, i.e., the hepatic glycerol kinase, in fish fed the plant diet (3-fold induction as tested by real-time PCR). Glycerol kinase is an important enzyme at the interface of carbohydrate and lipid metabolism, catalyzing the inter-conversion of glycerol and glycerol 3-phosphate, the latter being necessary for re-esterification with fatty acids for lipid (triglyceride) biosynthesis (Dipple et al., 2001). However, the concomitant low level of lysophosphatidyl-glycerol acyltransferase gene expression (Table 5) does not reinforce the possibility of the existence of a higher capacity of lipid biosynthesis in trout liver. In mammals, it is known that over-expression of glycerol kinase enzyme induces the *de novo* biosynthesis of lipids (Sriram et al., 2008); therefore, the over-expression of glycerol kinase in fish fed plant products could be linked to the higher level of lipid found in the viscera of these fish (Table 2).

4.4. Perspectives about the use of transcriptomics data to help the development of novel aquafeeds

In the present paper, our major objective using a transcriptomic approach was to discover potential hepatic molecular markers associated with fish fed 100% plant products, even though our data corresponded to a "single snapshot" of gene expression profile (Leaver et al., 2008; Robinson et al., 2008) after a fasting–re-feeding experimental design. In spite of this, our data suggest variations of intermediary metabolism which were either expected (for enzymes involved in the cholesterol and fatty acid biosynthesis for example) or unexpected (for the new marker glycerol kinase); both of these variations could modify nutrient utilisation and partitioning.

In conclusion, although total removal of ingredients of marine origin is not essential for sustainable aquaculture development (Tacon and Metian, 2008), knowledge on potential implications of such

extreme diets is useful: because no major dysfunction of hepatic metabolism (fish health), no over-expression of hepatic genes involved in stress and welfare (in contrast to what has been previously observed by Vilhelmsson et al. (2004)), and no strong variation of hepatic cell cycle actors such as those involved in apoptosis were found in this study, our data could be interpreted as a weak effect of complete changes in diet ingredient inclusion on the liver. This result is encouraging in the context of the development of new aquafeeds. However, more in-depth research is warranted for evaluating the potential changes due to individual nutrients and their levels. Integrative biological approaches as used here are useful for evaluating novel ingredients and for developing potential biomarkers associated with the use of novel feeds.

Acknowledgements

We acknowledge MJ Borthaire for her excellent technical assistance. We thank F. Terrier, Y. Hontang and F. Sandres for rearing fish in INRA experimental farm (Donzacq, Landes, France).

Sources of funding

This work was financed by 6th PCRD European project (contract n° 016249-2, Sustainable Aquafeeds to Maximise the Health Benefits of Farmed Fish for Consumers (AQUAMAX)). This work was also supported by an EU grant (AQUAMAX project) for M. Lansard.

References

- Aluru, N., Vijayan, M.M., 2007. Hepatic transcriptome response to glucocorticoid receptor activation in rainbow trout. *Physiol. Genomics* 31 (3), 483–491.
- Bell, J.G., Waagbo, R., 2008. Safe and nutritious aquaculture produce: benefits and risks of alternative sustainable aquafeeds. In: Holmer, M., Black, K., Duarte, C., Marba, N., Karakassis, I. (Eds.), *Aquaculture in the Ecosystem*. InKluwer Academic Publishers Group, pp. 185–225.
- Bell, J.G., Tocher, D.R., Henderson, R.J., Dick, J.R., Crampton, V.O., 2003. Altered fatty acid compositions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing linseed and rapeseed oils can be partially restored by a subsequent fish oil finishing diet. *J. Nutr.* 133 (9), 2793–2801.
- Cathelin, R., Lopez, F., Klopp, C., 2007. AGScan: a pluggable microarray image quantification software based on the ImageJ library. *Bioinformatics* 23 (2), 247–248.
- Cho, C., Kaushik, S.J., 1990. Nutritional energetics in fish: energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *World Rev. Nutr. Diet.* 61, 132–172.
- Cowey, C., Walton, M., 1989. Intermediary metabolism. In: Cowey, C., Walton, M. (Eds.), *Intermediary Metabolism*. In Academic Press, New York, pp. 259–329.
- Dipple, K.M., Zhang, Y.H., Huang, B.L., McCabe, L.L., Dallongeville, J., Inokuchi, T., Kimura, M., Marx, H.J., Roederer, G.O., Shih, V., Yamaguchi, S., Yoshida, I., McCabe, E.R., 2001. Glycerol kinase deficiency: evidence for the complexity in a single gene disorder. *Hum. Genet.* 55–62.
- F.A.O. Food and Agricultural Organization, (2006) State of world aquaculture. <http://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0874e/a0874e00.pdf>.
- Folch, J., Lees, M., Sloane, M., Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226 (1), 497–509.
- Gahr, S.A., Vallejo, R.L., Weber, G.M., Shepherd, B.S., Silverstein, J.T., Rexroad III, C.E., 2008. Effects of short-term growth hormone treatment on liver and muscle transcriptomes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Physiol. Genomics* 32 (3), 380–392.
- Gatlin III, D.M., Barrows, F.T., Brown, P., et al., 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquac. Res.* 38, 551–579.
- Glencross, B.D., Hawkins, W.E., Curnow, J.G., 2003. Restoration of the fatty acid composition of red seabream (*Pagrus auratus*) using a fish oil finishing diet after growth-out on plant based diet. *Aquac. Nutr.* 9 (6), 409–418.
- Gomez-Requeni, P., Mingarro, M., Calduch-Giner, J.A., Medale, F., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S., Perez-Sanchez, J., 2004. Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotrophic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 232, 493–510.
- Govoroun, M., Le Gac, F., Guiguen, Y., 2006. Generation of a large scale repertoire of expressed sequences tags (ESTs) from normalised rainbow trout cDNA libraries. *BMC Genomics* 7, 196–203.
- Jordal, A.O., Torstensen, B.E., Tsoi, S., Tocher, D.R., Lall, S.P., Douglas, S.E., 2005. Dietary rapeseed oil affects the expression of genes involved in hepatic lipid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Nutr.* 135 (10), 2355–2361.
- Kaushik, S.J., 1990. Use of alternative protein sources for the intensive rearing of carnivorous fishes. In: Flos, R., Tort, L., Torres, P. (Eds.), *Mediterranean Aquaculture*. In Ellis Horwood, UK, pp. 125–138.
- Kaushik, S.J., Cravedi, J.P., Lalles, J.P., Sumpter, J., Fauconneau, B., Laroche, M., 1995. Partial or total replacement of fish meal by soybean proteins on growth, protein

- utilization, potential oestrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout. *Aquaculture* 133, 257–274.
- Kaushik, S.J., Coves, D., Dutto, G., Blanc, D., 2004. Almost total replacement of fishmeal by plant protein sources in the diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 230, 391–404.
- Kolditz, C., Paboeuf, G., Borthaire, M., Esquerre, D., Sancristobal, M., Lefevre, F., Medale, F., 2008. Changes induced by dietary energy intake and divergent selection for muscle fat content in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), assessed by transcriptome and proteome analysis of the liver. *BMC Genomics* 9 (1), 506.
- Leaver, M.J., Villeneuve, L.A.N., Obach, A., Jensen, L., Bron, J.E., Tocher, D.R., Taggart, J.B., 2008. Functional genomics reveals increases in cholesterol biosynthetic genes and highly unsaturated fatty acid biosynthesis after dietary substitution of fish oil with vegetable oils in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics* 9, 299.
- Lopez, F., Rougemont, J., Llorid, B., Bourgeois, A., Loi, L., Bertucci, F., Hingamp, P., Houllgate, R., Granjeaud, S., 2004. Feature extraction and signal processing for nylon DNA microarrays. *BMC Genomics* 5 (1), 38.
- Naylor, R.L., Goldberg, R.J., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C.M., Clay, J., Folke, C., Libchenko, J., Mooney, H., Troell, M., 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405, 1017–1024.
- Nguyen, C., Rocha, D., Granjeaud, S., Baldif, M., Bernard, K., Naquet, P., Jordan, B., 1995. Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones. *Genomics* 29 (1), 207–216.
- Pan, W., 2002. A comparative review of statistical methods for discovering differentially expressed genes in replicate microarray experiments. *Bioinformatics* 21 (15), 546–554.
- Panaserat, S., Médale, F., Blin, C., Brèque, J., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., Krishnamoorthy, R., Kaushik, S., 2000. Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), common carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, R1164–1170.
- Panaserat, S., Plagnes-Juan, E., Breque, J., Kaushik, S., 2001. Hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression is not repressed by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 204, 359–365.
- Panaserat, S., Perrin, A., Kaushik, S., 2002. High dietary lipids induce liver glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Nutr.* 132, 137–141.
- Panaserat, S., Kolditz, C., Richard, N., Plagnes-Juan, E., Piumi, F., Esquerré, D., Médale, F., Corrèze, G., Kaushik, S., 2008. Hepatic gene expression profiles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed fish meal or fish oil-free diets. *Br. J. Nutr.* 100 (5), 953–967.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, E45.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., 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, 9–36.
- Pilkis, S.J., Granner, D.K., 1992. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 885–909.
- Randelli, E., Buonocore, F., Scapigliati, G., 2008. Cell markers and determinants in fish immunology. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 326–340.
- Regost, C., Arzel, J., Robin, G., Rosenlund, G., Kaushik, S.J., 2003. Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 220, 737–747.
- Rexroad, C.E., Lee, Y., Keele, J.W., Karamycheva, S., Brown, G., Koop, B., Harg, S.A., Palti, Y., Quackenbush, J., 2003. Sequence analysis of a rainbow trout cDNA library and creation of a gene index. *Cyt. Gen. Res.* 102, 347–354.
- Richard, N., Kaushik, S., Larroquet, L., Panaserat, S., Corraze, G., 2006. Replacing dietary fish oil by vegetable oils has little effect on lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nutr.* 96, 299–309.
- Robinson, N., Goddard, M., Hayes, B., 2008. Use of gene expression data for predicting continuous phenotypes for animal production and breeding. *Animal* 2 (10), 1413–1420.
- Saal, L.H., Troein, C., Vallon-Christersson, J., Gruvberger, S., Borg, A., Peterson, C., 2002. Bioarray software environment (BASE): a platform for comprehensive management and analysis of microarray data. *Genome Biol.* 3 (8), 0003.1–0003.6 (software).
- Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., Sturn, A., Snuffin, M., Rezantsev, A., Popov, D., Ryltsov, A., Kostukovich, E., Borisovsky, I., Liu, Z., Vinsavich, A., Trush, V., Quackenbush, J., 2003. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34 (2), 374–378.
- Salem, M., Silverstein, J., Rexroad III, C.E., Yao, J., 2007. Effect of starvation on global gene expression and proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genomics* 8, 328.
- Sargent, J.R., Tacon, A.G.J., 1999. Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. *Proc. Nutr. Soc.* 58 (2), 377–383.
- Seilliez, I., Panaserat, S., Kaushik, S., Bergot, P., 2001. Cloning, tissue distribution and nutritional regulation of a delta-6-desaturase-like enzyme in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol., Part B Biochem. Mol. Biol.* 130, 83–93.
- Sriram, S., Rahib, L., He, J.S., Campos, A.E., Oarr, L.S., Liao, J.C., Dipple, K.M., 2008. Global metabolic effects of glycerol kinase overexpression in rat hepatoma cells. *Mol. Genet. Metab.* 93, 145–159.
- Swanson, K.S., 2008. Using genomic biology to study liver metabolism. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 92 (3), 246–252.
- Tacon, A.G.J., Metian, M., 2008. Global overview of the fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trend and future prospects. *Aquaculture* 285, 146–158.
- Thivend, P., Mercier, C., Guilbot, A., 1972. Determination of starch with glucoamylase. In: Whistler, R.L., Bemiller, J.N. (Eds.), *Methods in Carbohydrate Chemistry*, vol. VI. Academic Press, New York, pp. 100–105.
- Torstensen, B.E., 2008. Novel production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) protein based on combined replacement of fish meal and fish oil with plant meal and vegetable oil blends. *Aquaculture* 285, 193–200.
- Tusher, V.G., Tibshirani, R., Chu, G., 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (9), 5116–5121.
- Vale, R.D., 2003. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112, 467–480.
- Vilhelmsson, O.T., Martin, S.A.M., Médale, F., Kaushik, S.J., Houlihan, D.F., 2004. Dietary plant protein substitution affects hepatic metabolism in rainbow trout. *Br. J. Nutr.* 92, 71–80.
- Watanabe, T., Verakunpiriya, V., Watanabe, K., Viswanath, K., Satoh, S., 1998. Feeding of rainbow trout with non-fish meal diets. *Fish. Sci.* 63, 258–266.
- Watanabe, T., Aoki, H., Shimamoto, K., Hadzuma, M., Maita, M., Yamagata, Y., Viswanath, K., Satoh, S., 1999. A trial to culture yellowtail with non-fishmeal diets. *Fish. Sci.* 64, 505–512.
- Webster, C.D., Lim, C.E., 2002. Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. CAB International, New York, NY.
- Webster, C., Lim, C., Lee, S.-C., 2007. Use of Alternative Protein Sources in Aquaculture Diets. The Haworth Press, Inc, NY, USA, 626 pp.
- Worby, C.A., Dixon, J.E., 2002. Sorting out the cellular functions of sorting nexins. *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* 3, 919–931.
- Zeeberg, B.R., Feng, W., Wang, G., Wang, M.D., Fojo, A.T., Sunshine, M., Narasimhan, S., Kane, D.W., Reinhold, W.C., Lababidi, S., Bussey, K.J., Riss, J., Barrett, J.C., Weinstein, J.N., 2003. GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biol.* 4 (4), R28.

Résumé : Rôle des acides aminés dans la régulation de l'expression des gènes hépatiques du métabolisme intermédiaire chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)

Ce travail de thèse avait pour objectif d'étudier la régulation de l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire par les acides aminés alimentaires dans le foie de truite arc-en-ciel. Ces études ont permis de caractériser, pour la première fois dans le foie de truite, les principaux acteurs de la voie de signalisation Akt/TOR et leurs régulations. Nos résultats *in vitro* montrent qu'un mélange d'acides aminés, seul ou avec l'insuline, est capable de réguler l'expression de nombreux gènes impliqués dans la lipogenèse, la néoglucogenèse et la glycolyse. Les régulations observées en présence conjointe d'un mélange d'acides aminés et d'insuline semblent être, pour la plupart, dépendantes de la voie TOR. Par la suite, nous avons étudié l'effet de certains acides aminés comme la leucine (connue pour son effet « signal ») ainsi que la lysine et la méthionine (souvent ajoutées dans les aliments piscicoles riches en matières premières végétales afin d'atteindre l'équilibre en acides aminés). En présence d'insuline, la leucine, contrairement à la lysine et la méthionine, active la voie de signalisation TOR et régule l'expression de certains gènes (néoglucogenèse et lipogenèse) de façon similaire à un mélange d'acides aminés. Parallèlement, *in vivo*, nous avons étudié la régulation de l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire lors d'un remplacement partiel ou total des huiles et farines de poisson par des produits végétaux dans l'aliment piscicole. Cette expérimentation a montré que, ni les voies de signalisation Akt/TOR, ni l'expression des gènes cibles ne sont affectés par ces nouveaux aliments. En conclusion, ces travaux ont montré que les acides aminés semblent jouer un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes hépatiques du métabolisme intermédiaire chez la truite arc-en-ciel.

Mots clés : truite arc-en-ciel, foie, métabolisme, acides aminés, insuline, expression de gène, signalisation Akt/TOR.

Abstract: Role of amino acids on the regulation of intermediary metabolism related gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver

The objective of my PhD was to characterize the regulation of the intermediary metabolism related gene expression by dietary amino acids in the liver of rainbow trout. This work allowed us to characterize, for the first time in the liver of trout, the main proteins of the Akt/TOR signalling pathway and their regulations. *In vitro* results showed that a mixture of amino acids, in the presence or absence of insulin, is able to regulate the expression of numerous genes involved in lipolysis, gluconeogenesis and glycolysis. Such regulations induced by an amino acid mix together with insulin appear to be, at least partly, TOR-dependent. Afterwards, I studied the effect of specific amino acids known to be a signalling molecule (leucine) or having potential application as supplements to reach essential amino acid balance in plant ingredients-rich diet (lysine and methionine). In the presence of insulin, leucine, in contrast to lysine and methionine, is able to activate the TOR signalling pathway and regulate the expression of several genes involved in gluconeogenesis and lipogenesis in the same way as a mixture of amino acids. Furthermore, we studied *in vivo*, the effect of partial or total replacement of fish oil and fish meal by plant products in fish feed on the regulation of intermediary metabolism related gene expression. This study showed that neither Akt/TOR signalling pathway nor the expression of the target genes were affected by such diets. In conclusion, these studies showed that amino acids seem to play an important role in the hepatic regulation of intermediary metabolism gene expression in the rainbow trout.

Key words: rainbow trout, liver, metabolism, amino acid, insulin, gene expression, Akt/TOR signalling pathway.