



HAL
open science

Etude du rôle de la voie eIF2 α /ATF4 dans la régulation de l'expression des gènes de l'autophagie lors d'une carence en acides aminés

Wafa B'Chir

► **To cite this version:**

Wafa B'Chir. Etude du rôle de la voie eIF2 α /ATF4 dans la régulation de l'expression des gènes de l'autophagie lors d'une carence en acides aminés. Biologie moléculaire. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2013. Français. NNT : 2013CLF1MM13 . tel-01165223

HAL Id: tel-01165223

<https://theses.hal.science/tel-01165223>

Submitted on 18 Jun 2015

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

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

Année 2013

N° d'ordre :

*ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT*

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne
pour l'obtention du grade de Docteur d'Université

Spécialité : **Nutrition** (Biologie Moléculaire et Cellulaire)

Soutenue le 23 Octobre 2013

Wafa B'CHIR

**Etude du rôle de la voie eIF2 α /ATF4 dans la régulation de
l'expression des gènes de l'autophagie lors d'une carence
en acides aminés**

Présidente: Pr. Arlette DARFEUILLE-MICHAUD

Rapporteurs: Dr. Patrice CODOGNO
Dr. Olivier JEAN-JEAN

Examineurs: Dr. Philippe PIERRE
Dr. Jean Christophe POINTUD

Directeur de Thèse : Dr. Alain BRUHAT

Invitée : Dr. Anne-Catherine MAURIN

à mes parents...

Remerciements

J'exprime de sincères remerciements :

Au Professeur Arlette Darfeuille-Michaud, du laboratoire de *Microbes, Infection, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte*, UMR 1071, INSERM, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Au-delà de cette tâche, je la remercie aussi d'avoir accepté de faire partie du jury de mon comité de thèse, pour son soutien, ses conseils, et pour toutes les discussions constructives qu'on a pu échanger le long de ces trois années.

Au Docteur Patrice Codogno, du laboratoire *Dynamique et fonction du système vacuolaire*, INSERM U984, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse, ainsi que de m'avoir donnée l'opportunité de présenter mes résultats dans des congrès nationaux et internationaux.

Au Docteur Olivier Jean-Jean, du laboratoire de *Biologie de l'ARN (RnBi)*, FRE3402-CNRS, Paris, pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Au Docteur Philippe Pierre, du laboratoire *Biologie des cellules dendritiques*, CNRS, UMR7280-CNRS, Marseille, pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

Au Docteur Jean Christophe Pointud, du laboratoire *Génétique, reproduction et développement (GReD)*, UMR6293, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. Je le remercie également d'avoir accepté de faire partie du jury de mon comité de thèse.

Je remercie également :

Le Professeur Jean-Marc Lobaccaro, le directeur de l'école doctorale ED SV pour son aide et son soutien.

Le Docteur Jean-Michel Chardigny pour m'avoir accueillie en stage de M2 et en thèse au sein de l'Unité de Nutrition Humaine de l'INRA de Theix.

Le Docteur Pierre Fafournoux, pour m'avoir acceptée au sein de son équipe Gènes/Nutriments.

Le Docteur Daniel Bechet, pour avoir accepté de faire parti du jury de mon comité de thèse et pour toutes ces discussions scientifiques et non scientifiques qu'on a pu échanger.

Merci à tous les membres de l'unité avec qui j'ai pu discuter ou demander conseils : Cécile Polges, Daniel Taillandier, Christiane, Didier Attaix, Mariane, Agnès, Yohann Wittrant, Laurent Leotoins, Sylvie, Marie-Jeanne, Patrice, Véronique Coxam, Sébastien, Cécile Coudy, Séverine et toutes les autres personnes qui ont pris le temps de me conseiller, de discuter avec moi et de m'encourager.

Merci au Pr Vasson de m'avoir accueillie au sein de son équipe afin d'effectuer mes 3 années de monitorat ainsi qu'à tous les membres de son équipe : Nicolas, Adrien, Marie-Chantal, Jérémie, Aïcha et Lamia de m'avoir donnée le goût de l'enseignement et pour tous ces moments que j'ai pu partager avec eux.

Merci à toute l'équipe Gènes/Nutriments pour ces 3ans et demie (stage M2 compris) que je n'ai pas vu passer! Cette grande famille avec qui j'ai pu partager mes larmes et mes rires, mes craintes et mes « victoires », vous tous! Vous qui avez su trouver les mots pour me soutenir et me rassurer...

Merci à Pierre, Céline, Jules, Cathy, Val, Lolo, Yuki, Ophélie, Florent et Cédric. Des gens formidables que j'ai eu la chance de côtoyer tous les jours et de partager pleins de choses avec eux !

Merci à Val et Lolo pour m'avoir formée et initiée aux différentes approches techniques; Aussi, Val pour ton aide technique surtout ces derniers mois et toutes les discussions échangées entre les 2 paillasses au rythme de RVA ☺

Un grand merci à Cathy pour le soutien que tu m'as apporté, le temps que tu m'as consacré malgré ta charge de travail, de m'avoir encouragée et écoutée et pour toutes les discussions qu'on a eu sur la thèse ou autre.

Et surtout, je tiens à remercier tout particulièrement Alain de m'avoir encadrée durant ces 3 années. Merci de m'avoir appris ce que c'est le travail scientifique, m'avoir poussée toujours plus loin pour obtenir ces beaux résultats qui ont été les nôtres. De m'avoir supportée, soutenue, consacré du temps, encouragée et motivée. D'avoir su partager mes moments de joie au sein de ma famille... Et la liste est longue!! Je te serai toujours redevable pour tout ce que tu m'as appris et transmis... Pour résumer MERCI !

Merci à mes amis : mon trio d'amour Claire, Joule, et Mel ☺ d'avoir su être à mes côtés, partager avec moi les bons moments et les moins bons! Merci pour toutes ces soirées qu'on a passé à papoter et à bien manger ! D'avoir pris la peine de venir jusqu'à Tunis pour vivre avec moi ces moments de bonheur ! Merci les miss vous êtes des amours et je tiens à ce qu'on reste amies même si je vais partir à l'autre bout du monde!!!

Merci à Marine, Rosa, Laurie, Carole et Malek pour leur soutien, tous ces bons moments de délire et pour toutes ces longues discussions sur la thèse et la vie ☺

Merci à Wissal et Khaled mes amis de toujours ! Qui continuent à être là, à me soutenir, à me supporter et à tout partager avec moi ! Mais aussi Inès ! Je vous adore !!

Pour finir, je tiens à remercier :

Mes parents : Naïma et Mohamed, à qui je dédie cette Thèse, l'aboutissement de toutes ces années de sacrifices. Sans eux je ne serai pas là aujourd'hui ! Ils ont su me soutenir dans mes choix, m'encourager, partager mes états d'âmes tous les jours ! La distance n'a fait qu'accentuer l'amour et le respect que j'éprouve envers eux ! J'ai vraiment une chance inouïe de vous avoir comme parents ! Que dieu vous bénisse !

Mon frère Amine, que la distance n'a rien enlevé au partage, au soutien et à l'amour qu'on éprouve l'un envers l'autre, mon deuxième frère Maher et aussi Souhail que j'adore !

Ma grand-mère Saïda, ma deuxième maman que j'aime et à qui je souhaite une longue vie et la santé.

Les différents membres de ma famille : Raoudha, Mounira, Sleh, leurs conjoints et enfants; et ma famille côté maternel ; merci pour votre soutien et votre amour !

Mes beaux parents : Zeineb et Charfeddine, ainsi que Fatma et Majed, Hichem et Myra. Merci de faire partie de ma vie désormais, et pour votre soutien !

Pour finir, un grand merci à mon mari Walid qui a accepté ce sacrifice de vivre toutes ces années à distance afin que je puisse finir ma thèse, et qui a su au quotidien me remonter le moral et me redonner le sourire. J'ai réussi à tenir le coup grâce à son amour et à son soutien !
Merci chéri ☺

Cette Thèse est la concrétisation de ces 9 années passées en France, tous ces sacrifices, toute cette distance qui me séparait de ma famille... Je la dédie aux gens que j'aime et qui comptent vraiment pour moi! Je quitte la France riche de cette expérience et de mes amis!

Liste des publications

Publications présentées:

B'chir W, Maurin AC, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, Parry L, Stepien G, Fafournoux P and Bruhat A.

The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression.
Nucleic Acids Res. Accepted June 4, 2013. [Epub ahead of print]

B'chir W, Carraro V, Maurin AC, Jousse C, Chaveroux C, Maurin AC, Averous J, Muranishi Y, Parry L, Fafournoux P and Bruhat A.

Dual role of CHOP in amino acid-regulated gene transcription of autophagy and Apoptosis.

(En cours de soumission).

Publication non présentée:

Averous J, Lambert-Langlais S, Cherasse Y, Carraro V, Parry L, **B'chir W**, Jousse C, Maurin AC, Bruhat A, Fafournoux P.

Amino acid deprivation regulates the stress-inducible gene p8 via the GCN2/ATF4 pathway.

Biochem Biophys Res Commun. 2011 Sep 16;413(1):24-9.

Liste des illustrations

Partie étude bibliographique :

Figures :

- Figure 1:** Hypothèse de l'implication de la voie de signalisation eIF2 α /ATF4 dans la l'adaptation au stress cellulaire via la régulation de l'autophagie et de l'apoptose. **6**
- Figure 2:** Homéostasie cellulaire chez les mammifères et mise en place de processus de survie (Autophagie) ou de mort cellulaire (Apoptose) en cas de stress environnant. **9**
- Figure 3:** Schéma des différentes kinases impliquées dans la phosphorylation d'eIF2 α chez les mammifères. **10**
- Figure 4:** Inhibition de la traduction générale et induction de la traduction d'ARNm spécifiques tels que ATF4 par les kinases d'eIF2 α en réponses aux stress cellulaires. **10**
- Figure 5:** Modèle d'activation de la kinase GCN2 par modifications allostériques suite à la liaison d'ARNt non chargés. **10**
- Figure 6:** Représentation schématique de l'implication de la kinase PERK dans la réponse UPR (Unfolded Protein Response) en réponse au stress du Réticulum Endoplasmique (RE) **11**
- Figure 7:** Etapes de l'initiation de la traduction chez les mammifères. **13**
- Figure 8:** Intégration des signaux de stress dépendants de GCN2 par eIF2 α . **13**
- Figure 9:** Régulation de la traduction d'ATF4 en réponse à la carence en acides aminés. **15**
- Figure 10:** Séquences CARE de différents gènes cibles de la voie eIF2 α /ATF4. **15**
- Figure 11:** Rôle important de CHOP dans le processus apoptotique lors d'un stress du RE. **16**
- Figure 12:** Aperçu schématique de la réponse intégrée au stress dépendante de la phosphorylation d'eIF2 α (ISR). **18**
- Figure 13:** Signalisation de la mort cellulaire par la réponse au stress du RE/UPR. **19**
- Figure 14:** Exemple de l'implication de PKR dans la réponse antivirale. **20**
- Figure 15:** Implication de GCN2, ATF4 et ASNS dans la mise en place d'une protection cellulaire au sein d'un microenvironnement de stress tumoral. **21**
- Figure 16:** Les acides aminés naturels sont essentiellement des acides alpha aminés. **23**
- Figure 17:** Principaux systèmes responsables du maintien de l'homéostasie des acides aminés et des protéines chez l'homme. **24**

Figure 18: Rôles physiologiques et organisation des complexes mTORC1 et mTORC2 chez les mammifères.	27
Figure 19: Régulation de la phosphorylation de 4EBP1 par mTORC1.	28
Figure 20: Régulation de la phosphorylation d'eIF4B et de la protéine ribosomale S6 par la voie mTORC1/S6K1.	28
Figure 21: Régulation du facteur d'élongation eEF2 par mTORC1.	28
Figure 22: Modèle des voies de détection de la disponibilité en acides aminés impliquant les voies de signalisation mettant en jeu les kinases GCN2 et mTORC1 notamment lors d'une restriction alimentaire.	29
Figure 23: Modèle de régulation de la transcription de l'AARE par la carence en acides aminés chez les mammifères.	30
Figure 24: Schéma général de l'initiation de la transcription chez les mammifères.	31
Figure 25: La séquence CARE est un élément de réponse aux acides aminés (AARE).	31
Figure 26: Identification de la séquence AARE de CHOP.	32
Figure 27: Cinétique d'événements de fixation des protéines régulatrices de l'AARE de CHOP au cours d'une carence en acides aminés (AA).	32
Figure 28: Représentation schématique de la régulation du gène <i>ASNS</i> par les AA.	32
Figure 29: Comparaison des séquences <i>cis</i> AARE impliquées dans la transcription des gènes <i>TRB3</i> , <i>CHOP</i> , <i>SNAT2</i> , <i>ASNS</i> et <i>ATF3</i> par la carence en acides aminés.	33
Figure 30: Structure générale des facteurs de transcription de la famille b-ZIP.	33
Figure 31: Les facteurs de transcription ATF2 et ATF4 régulent la transcription de <i>CHOP</i> lors d'une carence en leucine.	37
Figure 32: Le rôle important de l'autophagie dans le maintien de l'homéostasie cellulaire.	39
Figure 33: Les 3 formes majeures d'autophagie.	39
Figure 34: Schéma du processus autophagique.	39
Figure 35: Différentes autophagies sélectives.	40
Figure 36: Mécanisme général du processus autophagique.	40
Figure 37: Origines de la membrane des autophagosomes.	41
Figure 38: La machinerie autophagique et ses principaux acteurs.	41
Figure 39: Formation du complexe ATG5-ATG12-ATG16L.	41

Figure 40: Formation du système de conjugaison LC3.	42
Figure 41: p62, un récepteur des protéines ubiquitinylées.	43
Figure 42: Différentes voies et acteurs impliqués dans la régulation du processus autophagique en réponse aux stress cellulaires.	43
Figure 43: Régulation de l'autophagie par la protéine kinase mTOR.	44
Figure 44: Régulation moléculaire de l'autophagie par l'AMP Kinase.	45
Figure 45: Régulation moléculaire de l'autophagie par les complexes Beclin-1.	45
Figure 46: FOXO3 régule de manière coordonnée à la fois l'autophagie et le système ubiquitine-protéasome (UPS) au cours de l'atrophie musculaire.	49
Figure 47: Modèle de régulation du réseau autophagique/lysosomal par le facteur TFEB.	50
Figure 48: Vue d'ensemble des voies de stress qui induisent l'autophagie.	51
Figure 49: Différents facteurs de transcription connus dans la littérature pour réguler l'expression de gènes impliqués dans le processus autophagique en réponse aux différents stress cellulaires.	53
Figure 50: Régulation de l'autophagie et ses gènes lors du stress du RE.	53
Figure 51: Voies de l'apoptose (A) extrinsèque indépendante des caspases et (B) intrinsèque dépendante des caspases.	55
Figure 52: Exemples d'interactions entre l'autophagie et l'apoptose.	56
Figure 53: Implications physiologiques et pathologiques de l'autophagie.	57
Figure 54: Rôle de l'autophagie dans la suppression et la progression tumorale.	58
Tableaux :	
Tableau 1: Classement des acides aminés par famille.	23
Tableau 2: Classification des acides aminés chez l'Homme.	23
Tableau 3: Exemples de fonctions des acides aminés.	23
Tableau 4: Tableau récapitulatif des facteurs de transcription appartenant à la famille ATF/CREB.	33
Tableau 5: Les différents Atg et protéines impliqués dans la formation de l'autophagosome.	40

Partie résultats :

- Figure 55:** Technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). 66
- Figure 56:** Etude de la mort cellulaire par cytométrie en flux (FACS) des cellules double marquées par le 7-AAD et l'Annexine V. 72
- Figure 57:** Activation des caspases et leur implication dans le processus apoptotique. 73

Partie discussion :

- Figure 58:** Réponse différentielle de l'expression des gènes en fonction de la sévérité de la carence en leucine. 81
- Figure 59:** Effet de la concentration en leucine sur l'activation de la transcription de gènes dépendants d'ATF4, de CHOP ou des deux. 81
- Figure 60:** Modèle hypothétique de régulation de la transcription des gènes impliqués dans l'autophagie (*p62*, *Nbr1*, *Atg7*, *Atg10*, *Atg5* et *Gabarap*) selon la durée de la carence en leucine 83
- Figure 61:** Fixation du facteur de transcription TFEB sur les séquences promotrices des gènes impliqués dans les processus autophagique et apoptotique. 83
- Figure 62:** Interaction entre l'autophagie et l'apoptose en réponse à un stress cellulaire. 84
- Figure 63:** Induction de l'expression des ARNm de *p62* et *TRB3* au niveau du foie et de l'intestin de souris GCN2+/+ nourries avec un régime contrôle (Ctr) ou carencé en leucine (-Leu) pendant 4h. 85
- Figure 64:** Rôle de GCN2 dans la régulation de l'expression de *p62* au niveau du foie de souris GCN2+/+ nourries avec un régime contrôle (Ctr) ou carencé en leucine (-Leu) pendant 10 jours 85
- Figure 65:** Le foie, un carrefour métabolique bien régulé. 85
- Figure 66:** Modèle d'étude de l'activation de la voie eIF2 α /ATF4 *in vivo*: La lignée de souris transgénique AARE-Luciférase. 86

Partie Conclusion :

- Figure 67:** Rôle de la voie de signalisation eIF2 α /ATF4 dans la régulation de l'expression des gènes de l'autophagie et de l'apoptose lors d'une carence en acides aminés chez les mammifères.

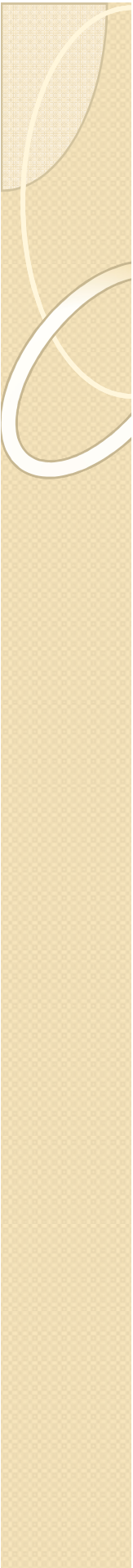
Liste des abréviations

μ M: micro Molaire
4E-BP1: eIF4E-Binding Protein 1
7-AAD: 7-AminoActinomycin D
AARE: Amino Acid Response Element
ADN: Acide DésoxyriboNucléique
ADP: Adénosine DiPhosphate
ALFY: Autophagy-Linked FYVE protein
ALS: Amyotrophic Lateral Sclerosis
AMP: Adénosine MonoPhosphate
AMPK: AMP-activated protein kinase
AP-1: Activator Protein-1
APC: Cortex Piriforme Antérieur
ARE: AU-Rich Element
ARNdb: Acide RiboNucléique
ARNdb: ARN double brin
ARNm: ARN messenger
ARNt: ARN de transfert
ARNti : ARN de transfert initiateur
ASNS: Asparagine Synthase
ATF: Activating Transcription Factor
ATG: autophagy related gene
ATP: Adénosine TriPhosphate
Bax: Bcl-2-associated X protein
BCL2: B-Cell lymphoma 2
Bcl-XL: B-Cell Lymphoma-extra large
Beclin-1: Bcl-2-homology (BH)-3 domain only
Bif-1: Bax-interacting factor 1
BiP: Immunoglobulin-Binding Protein
BNIP: Hypoxia-Inducible BH3-only Proteins
Bnip3: Bcl-2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 3
b-zip: basic leucine-zipper
C/EBP β : CCAAT/Enhancer Binding Protein β
Ca²⁺: Calcium
CARE: C/EBP-ATF Response Element
CAT-1: Cationic Amino acids Transporter 1
CBP: domaine de liaison à la calmoduline
Cdc42: Cell Division Cycle 42
CdkIs: cyclin-dependent kinase inhibitors
ChIP: Chromatin ImmunoPrecipitation
CHOP: C/EBP Homologues Protein
CLEAR: Coordinated Lysosomal Expression And Regulation
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CREB: cAMP Responsive Element Binding protein
CREP: Constitutive Reverter of eIF2 α -phosphorylation
DAG: DiAcyl-Glycérol
DAMP: Danger signals or damage-associated molecular patters
DBD: DNA-Binding Domain

DDIT3: DNA damage-inducible transcript 3
DOC: Downstream Of Chop
DRAM: Damage-Regulated Autophagy Modulator
eEF2K: eukaryotic Elongation Factor-2 Kinase
eIF: eukaryotic Initiation Factor
eIF2 α : eukaryotic Initiation Factor α
ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay
ERK2: Extracellular signal-Regulated Kinase 2
FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting
FIP20: Focal adhesion kinase family-Interacting Protein of 200 kDa
FoxO3: Forkhead box O3
GABARAP: Gamma-AminoButyric acid type A Receptor Associated-Protein
GADD153: Growth Arrest- and DNA Damage-inducible gene 153
GADD34: Growth Arrest and DNA Damage inducible protein 34
GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GATE16: Golgi-Associated ATPase Enhancer of 16KDa
GCN2: General Control Nonrepressed 2
GCN4: General Control Nondepressible 4
GEF: Guanine-nucleotide Exchange Factor
GFP: Green Fluorescent Protein
GRP94: Glucose-Regulated Protein 94 kDa
GTP: Guanidine TriPhosphate
H4: Histone 4
HAT: Histone Acetyl-Transférase
HDAC3: Histones DéACétylases 3
HERP: Homocysteine-induced ER Protein
HIF-1: Hypoxia-Inducible Factor-1
HRI: Heme-Regulated eIF2 α kinase
HuR: Human antigen R
IFN- γ : Interferon gamma
IGF: Insulin-like Growth Factor
IGFBP-1: Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1
IL-1: Interleukin-1
IP3: 1, 4, 5-triPhosphate d'Inositol
IRGM: Immunity Related GTPase M
JDP2: Méthionine
JIP-1: JNK Interacting-Protein 1
JNK2: c-Jun NH2-terminal Kinase 2
LAMP: Lysosomal Associated Membrane Protein
Leu: Leucine
LIR: LC3-Interacting Region
MAP1-LC3: Microtubule Associated Light Chain 3
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinases
MEF: Mouse Embryonic Fibroblast
MEKK1: MAPK/ERK kinase kinase 1
Met: Méthionine
miRNA: miRNA: microRNA
MKK7: Mitogen-Activated Protein kinase kinase 7
mLST8: mammalian lethal with SEC13 protein 8
mTOR: mammalian Target Of Rapamycin

mTORC1: mTOR Complex 1
mTORC2: mTOR Complex 2
NBR1: Neighbour of BRCA1 gene 1
NF- κ B: Nuclear Factor- κ B
NLRP3: NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
NO $^{\circ}$: monoxyde d'azote radicalaire
NOD2: Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2
NRF2: Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2
NSRU: Nutrient Sensing Response Unit
p27kip1: cyclin-dependent kinase inhibitor 1B, cyclin-dependent kinase inhibitor p27
PAMP: Pathogen-Associated Molecular Pattern
PARP: Poly-ADP-Ribose Polymerase
PCAF: P300/CBP Associated Factor
PEPCK: PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase
PERK: Pancreatic Endoplasmic Reticulum eIF2 Kinase
pH: potentiel Hydrogène
PI3K: Phosphatidyl-Inositol 3'-Kinase
PIP2: Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate
PIP3: Phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate
PKC β : Protein Kinase C β
PKR : Protein kinase RNA-activated
PMT: PhotoMultiplikaTeur
PP1c : Protein phosphatase-1 catalytic subunit
PP2A: Protein Phosphatase 2A
PPAR: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PRODH: PROline DÉHydrogénase
PRR: Pattern Recognition Receptor
PtdIns3P: Phosphatidylinositol 3-Phosphate
PTEN: Phosphatase and tensin homolog
Rac1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAG GTPases
REDD1: Regulated in development and DNA damage response 1
Rheb: Ras homolog enriched in brain
Rictor: Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RSV: Respiratory Syncytial Virus
Rubicon: RUN domain and cysteine-rich domain containing, Beclin1-interacting
S6K1: ribosomal s6 kinase 1
Ser: Serine
SIN1: SAPK-interacting protein 1
SNARE: Soluble NSF Attachment Protein REceptor
SNAT2: Sodium-coupled Neutral Tmino acid Transporter 2
SREBP: Sterol Regulatory Element-Binding Protein
STAT3: Signal Transducers and Activators of Transcription 3
STX17: Syntaxine 17
TAR: Trans-Activation Response element
TFEB: Transcription Factor EB
Thr: Threonine
TIGAR: TP53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator
TNF: Tumor Necrosis Factor
TOP: Tract Of Pyrimidine

TRAIL: Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-receptor 2
TRB3: Tribble 3
TSC2: Tuberous Sclerosis 2
UBA: UBiquitin-Associated
ULK: Unc-51-Like Kinase
UORF: upstream Open Reading Frame
UPR: Unfolded Protein Response
UPS: Ubiquitin-Proteasome System
UTR: Untranslated Region
UV: Ultra Violet
UVRAG: UV Radiation resistance-Associated Gene
V-ATPases: Ragulator and vacuolar H (+)-ATPases
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VIH-1: Human immunodeficiency virus 1
VSV: Vesicular Stomatitis virus
WIPI2: WD repeat domain, phosphoinositide interacting 2
xCT: sodium-independent aspartate/glutamate/cystine transporter
XTT: (2, 3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)
YY1-PGC1 α : Yin-Yang 1- Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-alpha



Sommaire

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	6
1. Objectif du travail de thèse.....	6
2. Présentation du manuscrit.....	7
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	9
CHAPITRE I – LA VOIE EIF2A/ATF4, UNE VOIE DE SIGNALISATION IMPLIQUEE DANS L’ADAPTATION AUX STRESS CELLULAIRES.....	9
1. Introduction	9
2. Activation de la voie eIF2 α /ATF4 lors d’un stress cellulaire	10
2.1. Protéines kinases impliquées dans la phosphorylation d’eIF2 α	10
2.2. Conséquences de l’activation des kinases d’eIF2 α	12
a) Phosphorylation d’eIF2 α et inhibition de la traduction.....	12
b) Phosphorylation d’eIF2 α et traduction sélective de certains ARNm	14
2.3. ATF4.....	14
2.4. Gènes cibles de la voie eIF2 α / ATF4.....	15
a) Exemples de gènes cibles de la voie eIF2 α / ATF4	15
b) CHOP: un gène cible de la voie eIF2 α /ATF4	16
3. Rétro-contrôle de la voie eIF2 α / ATF4	18
4. Implications de la voie eIF2 α / ATF4 dans l’adaptation au stress.....	18
4.1. Adaptation à une carence nutritionnelle.....	18
4.2. Adaptation au stress du Réticulum Endoplasmique (RE)	19
4.3. Adaptation aux infections	20
4.4. Adaptation à d’autres stress	21
5. Implication de la voie eIF2 α /ATF4 en pathologie.....	21
CHAPITRE II –MECANISMES D’ADAPTATION A UNE CARENCE EN ACIDES AMINES ET ACTIVATION DE LA VOIE EIF2A/ATF4	23
1. Généralités sur les acides aminés :	23
1.1. Propriétés des acides aminés.....	23

1.2.	Fonctions des acides aminés	23
1.3.	Homéostasie des acides aminés	24
1.4.	Métabolisme des acides aminés	24
1.5.	Catabolisme des acides aminés	25
2.	Acides aminés et régulation de l'expression des gènes	25
2.1.	Régulation des gènes par les acides aminés	25
2.2.	Voies de signalisation régulées par la carence en acides aminés	26
a)	La voie m-TORC1	26
b)	La voie GCN2/ eIF2 α / ATF4	29
c)	La voie G α 12/ JNK/ATF2	29
3.	Mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'expression des gènes par la voie eIF2α/ ATF4	30
3.1.	Mécanismes de stabilisation des ARNm	30
3.2.	Mécanismes de régulation de la transcription	31
a)	Une séquence d'ADN <i>cis</i> indispensable à la régulation transcriptionnelle lors d'une carence en acides aminés : l'AARE	31
b)	Facteurs de transcription interagissant avec la séquence AARE	33

CHAPITRE III - L'AUTOPHAGIE, UN PROCESSUS D'ADAPTATION AUX STRESS CELLULAIRES..... 39

1.	Le processus autophagique	39
2.	Mécanismes moléculaires et gènes de l'autophagie	40
2.1.	Initiation et formation de la membrane d'isolation	40
2.2.	Elongation	41
a)	Le système de conjugaison Atg5-Atg12-Atg16L1	41
b)	Le système de conjugaison LC3B	42
c)	Les protéines cargo p62 et NBR1	42
2.3.	Terminaison de l'autophagosome	43
3.	Régulation du processus autophagique	43
3.1.	Régulation cytoplasmique :	44
a)	Les complexes mTOR	44
b)	Le complexe AMPK	45
c)	Le complexe Beclin-1	45
d)	Le récepteur Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3R)	46
e)	Rôle du cytosquelette	46
f)	Autres mécanismes cytoplasmiques	47

3.2.	<i>Régulation de l'expression des gènes de l'autophagie :</i>	47
a)	JNK/c-Jun	47
b)	NF-κB	48
c)	HIF-1	48
d)	FOXO	48
e)	p53	49
f)	Transcription Factor EB (TFEB)	49
g)	Les miRNA	50
h)	Autres régulateurs de l'expression des Atg	50
4.	Autophagie et adaptation aux différents stress cellulaires	51
4.1.	Les stress cellulaires activateurs et signalisation	51
a)	Carence en acides aminés	51
b)	Carence en glucose	51
c)	Autres stress activateurs	52
4.2.	Stress cellulaire inhibiteur : les facteurs de croissance	52
4.3.	Régulation transcriptionnelle de gènes de l'autophagie	53
a)	Lors de l'activation de la voie eIF2α/ATF4	53
b)	Lors de divers stress via différents facteurs de transcription	53
5.	Autophagie et mort cellulaire	54
5.1.	L'apoptose	54
a)	Généralité	54
b)	Mécanismes de l'apoptose	55
5.2.	Interactions entre l'autophagie et l'apoptose	56
5.3.	L'autophagie : mort cellulaire programmée de type II	57
6.	Dérégulation de l'autophagie et pathologies	57
6.1.	Le cancer	58
a)	Rôle anti-tumoral	58
b)	Rôle pro-tumoral	58
6.2.	Les maladies neurodégénératives	59
6.3.	Les maladies infectieuses et/ou inflammatoires et l'immunité	60
a)	Autophagie et infections	60
b)	Autophagie et immunité	61
c)	Autophagie et inflammation	61
	CONCLUSION	63
	RESULTATS EXPERIMENTAUX	64

PUBLICATION 1	64
1. Introduction	64
2. Stratégie expérimentale.....	64
2.1. Les cellules en culture.....	65
2.2. La carence en leucine.....	65
2.3. p62	65
3. Principale technique utilisée: la ChIP (Immuno-Précipitation de la Chromatine).....	66
4. Publication	66
5. Résultats	67
5.1. Implication des kinases GCN2 et PERK et des facteurs de transcription ATF4 et CHOP dans la régulation de la transcription des gènes de l'autophagie	67
5.2. Classifications des gènes de l'autophagie selon leur dépendance à ATF4 et CHOP	68
6. Conclusion	68
 PUBLICATION 2	 70
1. Introduction	70
2. Stratégie expérimentale.....	71
2.1. Etude de la survie cellulaire : Test XTT	71
2.2. Suivi cellulaire des autophagosomes par fluorescence directe: mCherry-EGFP-LC3B	71
2.3. Etude de la mort cellulaire	72
a) Analyse du double marquage Annexin-V/7-AAD par FACS	72
b) Double marquage Annexin-V et 7-amino-actinomycin D (7-AAD).....	72
c) Clivage de la Caspase 3	73
3. Publication	73
4. Résultats	74
5. Conclusion	74
 DISCUSSION & PERSPECTIVES.....	 76
1. Introduction	76
2. Implication de la voie eIF2α/ATF4 dans la régulation de la transcription des gènes de l'autophagie lors d'une courte carence en acides aminés	77

3.	Etude de la spécificité et de la fonctionnalité de p62 dans le processus autophagique	79
4.	Réponse différentielle de l'expression des gènes en fonction de la sévérité de la carence en acides aminés	80
5.	Régulation de la transcription des gènes de l'autophagie lors de longues carence en acides aminés	82
6.	Etude du processus autophagique <i>in vivo</i>	84
	CONCLUSION GENERALE	87
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	89



Introduction générale

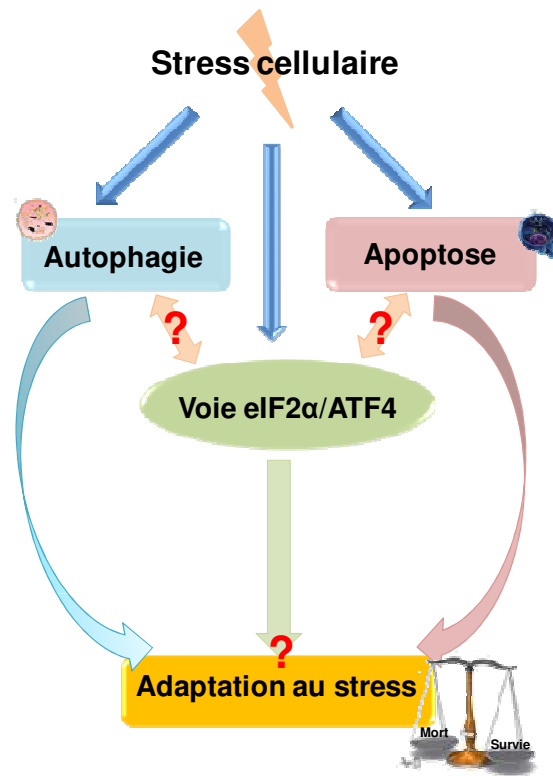


Figure 1: Hypothèse de l'implication de la voie de signalisation eIF2 α /ATF4 dans la l'adaptation au stress cellulaire via la régulation de l'autophagie et de l'apoptose.

INTRODUCTION GENERALE

1. Objectif du travail de thèse

Chez les mammifères, les carences nutritionnelles telles que les carences en acides aminés (malnutrition, sous-nutrition ou situations pathologiques telles que le sepsis ou le cancer) constituent un stress nutritionnel important. Pour faire face à ces situations, l'organisme dispose de processus adaptatifs régulés par de multiples voies de signalisation. En cas de carence nutritionnelle en acides aminés, l'un des mécanismes d'adaptation mis en route par l'organisme, décrit depuis 1977 par l'équipe de Mortimore au niveau du foie de rat, consiste à déclencher une protéolyse, notamment par autophagie. Ceci permet le relargage d'acides aminés libres afin de favoriser la synthèse de protéines impliquées dans le processus adaptatif de la cellule à cette situation. Par la suite, il a été mis en évidence l'activation spécifique du processus autophagique dans des cellules en culture en réponse à une carence en acides aminés. Depuis, de nombreux travaux ont décrit l'importance de l'autophagie dans l'adaptation à divers stress cellulaires notamment la carence nutritionnelle en glucose ou en acides aminés et un certain nombre de mécanismes moléculaires régulant ce processus ont pu être mis en évidence.

Au niveau cellulaire, il est maintenant clairement établi qu'une carence en un acide aminé indispensable active en particulier la voie de signalisation eIF2 α /ATF4 via l'activation de la protéine kinase GCN2 qui phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α permettant ainsi à la fois l'inhibition de la synthèse protéique globale et l'induction de la traduction du facteur de transcription ATF4. Ce facteur de transcription induit la transcription de certains gènes cibles qui jouent un rôle clé dans l'adaptation de la cellule au stress.

Etant donné l'importance du processus autophagique dans le ravitaillement de la cellule en acides aminés manquants et de la voie eIF2 α /ATF4 dans l'adaptation cellulaire à une carence en acides aminés, il apparaît pertinent d'étudier l'implication de cette voie de signalisation dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans le processus autophagique lors d'une carence en acides aminés (**Figure 1**).

L'objectif de mon travail de thèse a été d'abord de caractériser, dans des cellules en culture carencées en acides aminés indispensables, les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'expression des gènes de l'autophagie. Dans ce but, j'ai utilisé le gène *p62*, qui

code pour une protéine qui joue un rôle très important dans le processus autophagique, comme modèle d'étude, afin d'identifier le rôle de la voie eIF2 α /ATF4 et de caractériser la séquence promotrice sur laquelle se fixent des facteurs de transcription jouant un rôle clé dans la réponse au stress: ATF4 et CHOP. Par la suite, afin de déterminer si les mécanismes décrits pour *p62* pouvaient être généralisés à d'autres gènes impliqués dans le processus autophagique en réponse à ce stress cellulaire, je me suis intéressée à étudier les autres gènes impliqués dans ce processus, leurs classes selon leur dépendance à ATF4 et CHOP et la liaison de ces facteurs sur les éléments spécifiques de leurs promoteurs en fonction de l'intensité du stress.

Ensuite, étant donné que la voie eIF2 α /ATF4 représente un carrefour de signalisation activable par différentes kinases qui répondent à divers autres stress, j'ai donc émis l'hypothèse que l'activation par le stress du réticulum endoplasmique (stress ER) de la voie eIF2 α /ATF4 *via* la kinase PERK pourrait aussi entraîner l'activation des différents gènes de l'autophagie.

Enfin, dans la littérature, lors d'un stress cellulaire prolongé tel qu'un stress du réticulum endoplasmique ou une carence nutritionnelle, la voie eIF2 α /ATF4/CHOP est décrite comme étant impliquée dans la régulation de la mort cellulaire par apoptose et CHOP comme un acteur pro-apoptotique. De ce fait, dans la deuxième partie de mon travail, je me suis intéressée au rôle de la voie eIF2 α /ATF4/CHOP dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans l'autophagie et l'apoptose selon la durée de la carence en un acide aminé indispensable.

2. Présentation du manuscrit

Le manuscrit est divisé en six grandes sections : **1.** L'Etude bibliographique, **2.** les résultats, **3.** la discussion et les perspectives, **4.** la Conclusion générale de ce travail **5.** Les Annexes et enfin **6.** Les Références bibliographiques.

La première section qui traite de l'étude bibliographique est divisée en trois chapitres. En premier lieu, est présentée la voie eIF2 α /ATF4 et son rôle dans l'adaptation au stress cellulaire. Puis, le deuxième chapitre traite du rôle de cette voie de signalisation dans la régulation de l'expression des gènes lors d'une carence en acides aminés chez les mammifères. Le dernier chapitre de l'étude bibliographique présente le processus autophagique et son implication dans l'adaptation au stress cellulaire.

Les résultats que j'ai obtenus sont présentés dans la deuxième section du manuscrit. Cette section est elle-même divisée en deux parties correspondant aux projets étudiés :

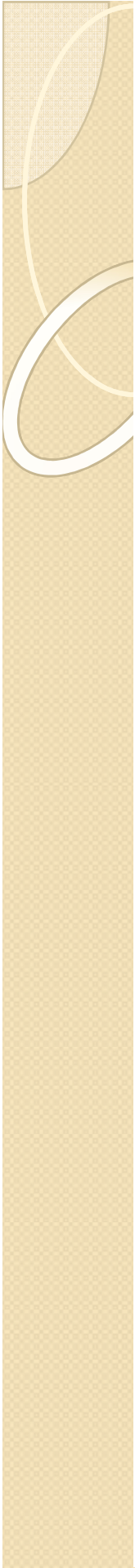
1) Tout d'abord, sont présentés les résultats de la première partie traitant le rôle de la voie eIF2 α /ATF4 dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans l'autophagie lors d'un stress cellulaire (article publié dans *Nucleic Acids Research*, 2013).

2) Ensuite, la deuxième partie traite du rôle de la voie eIF2 α /ATF4/CHOP dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans l'autophagie et l'apoptose selon la durée de la carence en un acide aminé indispensable (article en cours de soumission).

Pour chacun des deux articles les données sont présentées et résumées.

Tous les résultats sont discutés dans la troisième section sous forme d'une discussion générale et de perspectives, suivie d'une conclusion générale en quatrième section.

Enfin, les deux dernières sections de ce manuscrit comportent: les Annexes où sont regroupés les travaux auxquels j'ai également pu participer, et les Références bibliographiques ayant été citées dans cette thèse.



Etude bibliographique

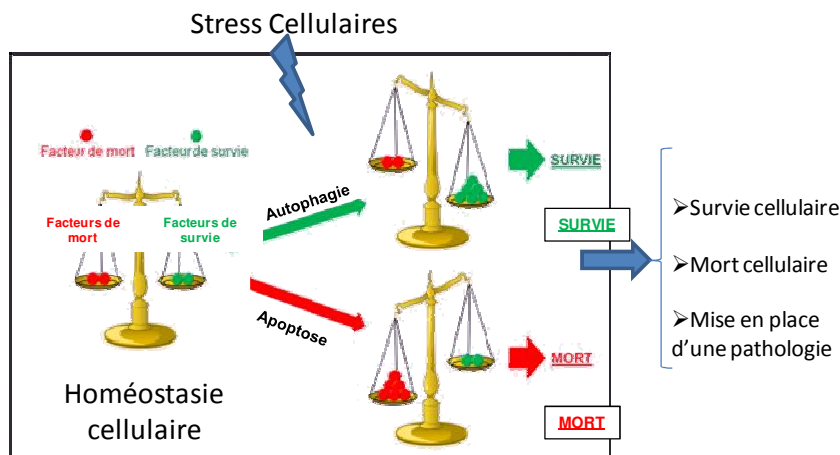


Figure 2: Homéostasie cellulaire chez les mammifères et mise en place de processus de survie (Autophagie) ou de mort cellulaire (Apoptose) en cas de stress environnemental.

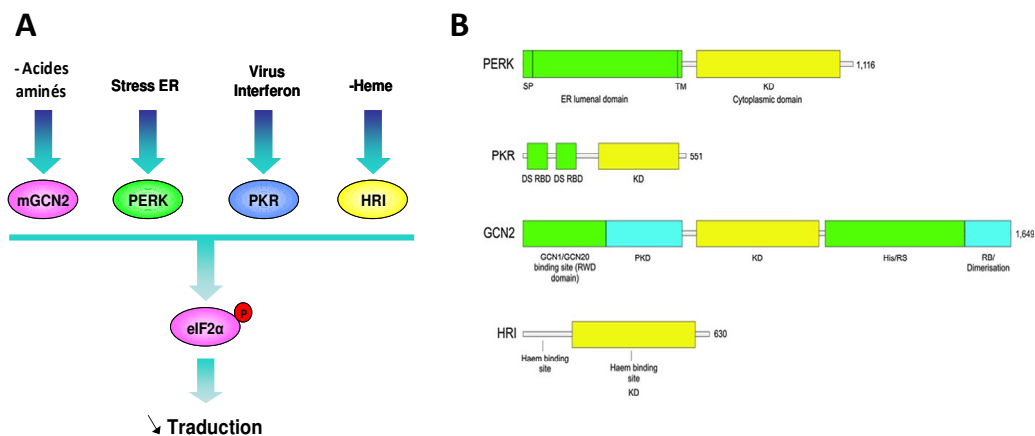


Figure 3: Schéma des différentes kinases impliquées dans la phosphorylation d'eIF2 α chez les mammifères. (A) Les 4 kinases PERK, PKR, GCN2 et HRI qui phosphorylent eIF2 α en réponses aux différents stress. (B) De N- à C-terminal: (SP) peptide signal, (TM) domaine transmembranaire, (KD) domaine kinase, (DS RBD) double brin domaine de liaison à l'ARN, (PKD) pseudokinase domaine, (His/RS) histidyl-ARNt synthétase domaine dépendant, (RB) liaison du ribosome. Les domaines kinases sont en jaune, ceux impliqués dans la détection de signaux du stress sont en vert et les autres sont en bleu (D'après Donnelly N. *et al*, 2013).

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I – La voie eIF2 α /ATF4, une voie de signalisation impliquée dans l'adaptation aux stress cellulaires

1. Introduction

Le stress cellulaire est souvent défini comme une modification aiguë ou chronique des paramètres normaux de l'environnement cellulaire. De nombreux stress cellulaires peuvent perturber l'homéostasie cellulaire comme par exemple le stress oxydatif, les infections, les particules pathogènes, les microcristaux, les ultraviolets, les produits chimiques, la carence nutritionnelle, ou encore l'hypoxie. Face à ces divers stress, deux options s'offrent à la cellule, l'adaptation ou la mise en place du processus de mort cellulaire. Ce choix dépend de trois paramètres, la nature du stress, son intensité et sa durée.

Le programme de défense mis en place à la suite de la réception de ce signal d'alerte aboutit à une réponse positive de la cellule qui s'oppose à l'attaque environnementale sous forme d'activation de cascades de voies de signalisation et de la mise en place de processus physiologiques de survie telle que l'autophagie. En cas d'échec ou de stress prolongé, la cellule met en route un processus apoptotique conduisant à la destruction cellulaire pour protéger les cellules environnantes et les fonctions physiologiques. Généralement, les conséquences d'un stress donné dépendent de la nature de la cellule (cellules à prolifération rapide ou lente, cellules à longue vie ou renouvelables rapidement...), de sa fonction physiologique (sécrétion hormonale, défense immunitaire...) et de son stade de différenciation (**Figure 2**).

Le stress cellulaire intervient dans la plupart des situations pathologiques et concerne toutes les cellules de l'organisme: plus les agressions sont potentiellement dangereuses pour l'organisme, plus le système de défense est évolué et sophistiqué, sollicitant l'activation de plusieurs acteurs moléculaires, la régulation de plusieurs voies de signalisation et de processus d'adaptation. Parmi ces voies de signalisation, la voie eIF2 α /ATF4 joue un rôle clé dans l'adaptation au divers stress cellulaires.

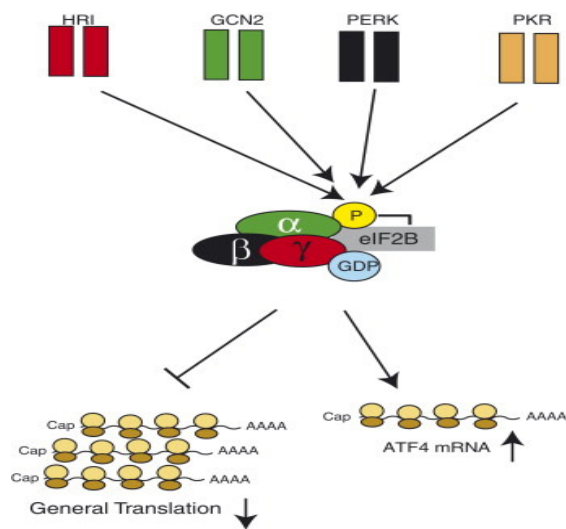


Figure 4: Inhibition de la traduction générale et induction de la traduction d'ARNm spécifiques tels que *ATF4* par les kinases d'eIF2 α en réponses aux stress cellulaires (extrait de Costa-Mattioli M. *et al*, 2008).

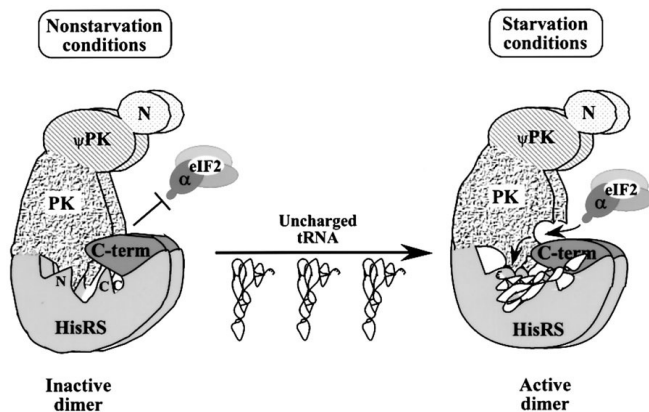


Figure 5: Modèle d'activation de la kinase GCN2 par modifications allostériques suite à la liaison d'ARNt non chargés. La kinase GCN2 possède plusieurs domaines: un domaine de liaison au complexe GCN1-GCN20 à l'extrémité N-terminale (N), un pseudokinase domaine (PK), un domaine de la protéine kinase (PK), une région HisRS. Dans la forme inactive de GCN2 présente dans des conditions basales (à gauche), la liaison du C-term au domaine PK empêche la liaison d'eIF2 α , ainsi que les interactions HisRS-N-PK. Dans des conditions de carence (à droite), les ARNt non chargés se lient à GCN2 en établissant des contacts avec le HisRS-N et le domaine C-terminal. L'ARNt lié induit des changements conformationnels dans les deux domaines qui sont transmis au domaine PK. Ainsi le domaine PK laisse passer EIF2 α qui va être phosphorylé au contact du domaine kinase actif de GCN2 (d'après Hongfang Q. *et al*, 2001).

2. Activation de la voie eIF2 α /ATF4 lors d'un stress cellulaire

Le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α est considéré comme un intégrateur de différents signaux de stress. L'intégration du signal de stress passe par la phosphorylation de ce facteur. A ce jour, quatre kinases pouvant phosphoryler eIF2 α chez les eucaryotes ont été identifiées. Bien qu'elles contiennent toutes un domaine régulateur différent, elles partagent un domaine kinase conservé (**Figure 3**). Leur activation lors de conditions de stress entraîne la phosphorylation d'eIF2 α qui va avoir deux conséquences : d'une part une baisse de la traduction générale (Sullivan et al, 2004), et d'autre part la dérégulation traductionnelle de certaines protéines, dont des facteurs de transcription tels qu'ATF4 qui vont à leur tour induire la synthèse de protéines, spécifiquement impliquées dans la réponse et l'adaptation au stress (**Figure 4**) (Abastado et al, 1991; de Haro et al, 1996).

2.1. Protéines kinases impliquées dans la phosphorylation d'eIF2 α

A ce jour, seules quatre kinases, GCN2, PERK, PKR, et HRI induisant la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α dans les cellules sont connues.

❖ GCN2

La kinase GCN2 (General Control Nonrepressed 2) est un senseur de la disponibilité en acides aminés qui est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes lors d'une carence en acides aminés mais aussi lors d'une carence en glucose (Ye et al, 2010) ou des irradiations par les UV (Jiang & Wek, 2005). GCN2 est composée de cinq domaines (**Figure 5**): un domaine RWD de liaison au complexe GCN1/GCN20 en N-terminal, un domaine pseudo kinase, un domaine kinase, un domaine histidyl-tRNA synthetase like (HisRD), et un domaine de liaison au ribosome et de dimérisation en C-terminal (Rafie-Kolpin et al, 2003). L'activation de GCN2 a lieu lors d'une carence en acides aminés. L'absence d'acides aminés entraîne une accumulation d'ARNt non chargés qui se fixent au domaine histidyl ARNt synthetase-like de GCN2. Le domaine RWD permettrait via son interaction avec le complexe GCN1/GCN20 de faciliter le transfert de l'ARNt non chargé du ribosome vers le domaine HisRD. La fixation de l'ARNt va alors induire un changement de conformation de la protéine : le domaine kinase jusqu'alors replié sur lui-même va être beaucoup plus flexible et permettre l'accessibilité du site actif de l'enzyme à l'ATP. L'autophosphorylation au niveau des résidus thréonine 882 et 889 entraîne l'activation de ce domaine kinase. Les structures cristallographiques des domaines kinases en conformation active ou inactive ont été résolues il y a peu. La structure du domaine RWD a

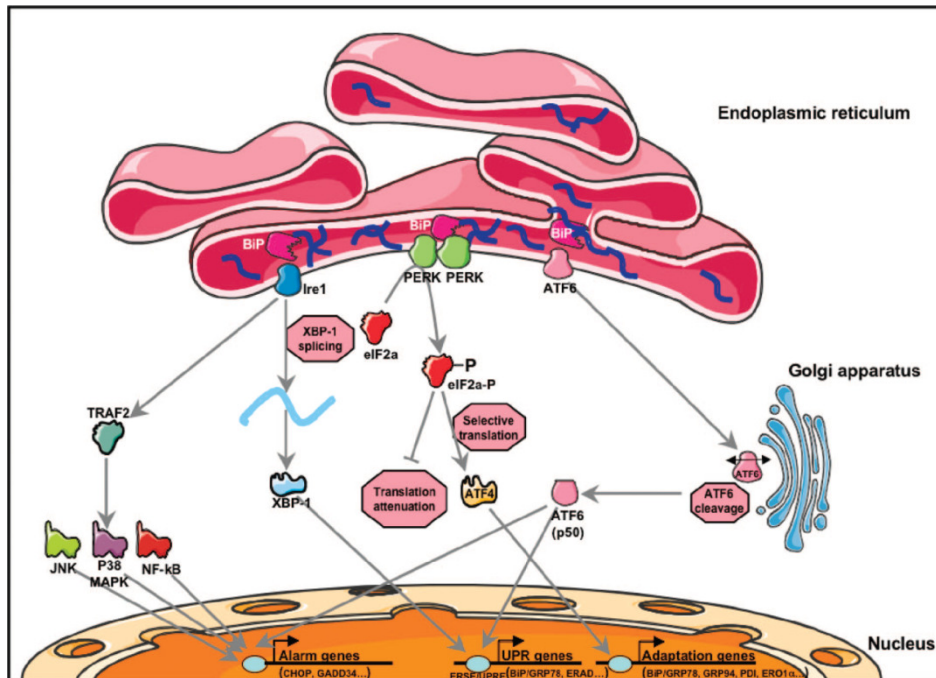


Figure 6: Représentation schématique de l'implication de la kinase PERK dans la réponse UPR (Unfolded Protein Response) en réponse au stress du Réticulum Endoplasmique (RE). Lors de l'accumulation de protéines mal conformées (représentées en bleu sur la figure) dans la lumière du RE, la protéine chaperonne GRP78/BiP se lie préférentiellement à ces protéines malformées et libère les facteurs transactivateurs de la réponse UPR: ATF6, IRE1 α et PERK. ATF6 est un facteur transcriptionnel qui sera clivé dans l'appareil de Golgi, puis migrera dans le noyau pour transcrire les gènes codant les protéines chaperonnes comme BiP, GRP94 ou la calnexine. IRE1 α possède une activité RNase qui va permettre l'épissage de l'ARNm du facteur transcriptionnel XBP1, qui lui aussi va permettre la transcription de gènes de l'UPR. Enfin, PERK activée va phosphoryler eIF2 α qui va bloquer la traduction des ARNm, limitant ainsi la synthèse protéique globale, à l'exception du facteur transcriptionnel ATF4. Ce facteur est impliqué également dans la transcription de gènes de l'UPR et de gènes de l'apoptose, comme CHOP (D'après Pallet et al., 2009).

également été résolue (Nameki et al, 2004), cependant la structure entière de la protéine n'est pas connue. L'étude de l'interaction entre GCN2 et eIF2 a permis de déterminer un domaine de reconnaissance.

Plusieurs isoformes de GCN2 ont été identifiées: α , exprimé abondamment dans le cerveau, β , l'isoforme le plus abondant, et γ , retrouvé à des niveaux semblables dans plusieurs tissus tels que les poumons et le cerveau. Cela suggère des fonctions développementales et physiologiques spécifiques pour chaque isoforme (Zhang et al, 2002). En relation avec cette hypothèse, une équipe des États-unis a identifié en 2003 deux eIF2 α kinases chez *Dictyostelium* qui semblent très homologues à GCN2 et seraient impliquées dans l'initiation du développement de l'organisme (Fang et al, 2003).

❖ PERK

La protéine kinase PERK (Pancreatic Endoplasmic Réticulum eIF2 Kinase) est impliquée dans la voie de réponse au stress du réticulum endoplasmique (stress du RE) (Harding et al, 1999 ; Liu et al, 2000). Le stress du RE correspond à une accumulation de protéines mutantes ou mal repliées au sein du réticulum endoplasmique. Certaines conditions physiopathologiques peuvent conduire à des stress du RE (Ron, 2002). PERK se situe au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, sa partie C-terminale est cytoplasmique et contient le domaine kinase et les sites d'autophosphorylation (Harding et al, 1999). La protéine BiP se lie à la partie N-terminale de PERK dans le lumen du RE et, lors de condition de stress, s'en dissocie pour permettre l'oligomérisation de PERK (**Figure 6**). Cette dissociation permet à PERK de s'autophosphoryler et de s'activer pour, par la suite, phosphoryler eIF2 α et inhiber la traduction. Une délétion de la région permettant l'oligomérisation bloque l'activité kinase (Liu & Kaufman, 2003 ; Ma et al, 2002 ; Shen et al, 2004).

❖ PKR

PKR (Protein kinase RNA-activated) est une protéine kinase activée en réponse à des infections virales et à la voie de l'interféron (Levin et al, 1980 ; Ohtsuki et al, 1980). En effet cette kinase activée par la fixation d'ARNs doubles brins sert de détecteur des infections pathogènes. PKR se compose de deux domaines : un domaine N-terminal composé de deux domaines de fixation aux ARN doubles brins et un domaine C-terminal constitué du domaine kinase de la protéine. Lors d'une infection, l'ARNdb se fixe à un dimère de PKR et entraîne l'activation de la protéine via le domaine kinase qui alors se dimérise et s'autophosphoryle (Baltzis et al, 2002; Gunnery & Mathews, 1998). Ce résultat est aussi produit par l'interféron- γ

(IFN- γ), ce qui implique cette kinase dans la défense anti-virale (Wong et al, 2001). Lorsque la réplication virale augmente, la multiplication de l'ARN viral entraîne alors une monomérisation de PKR et son inhibition. De ce fait, l'activation de PKR et la phosphorylation d'eIF2 α vont induire l'inhibition de la traduction et arrêter ainsi la progression de l'infection virale. Des études récentes ont montré qu'en cas d'infections virales telles que les infections par le VSV (vesicular stomatitis virus), il y aurait une interaction croisée entre PKR et PERK afin de mettre en place une cascade d'événements antiviraux et anti-apoptotiques (Baltzis et al, 2004). La plupart des fonctions jouées par la kinase PKR sont relatives aux infections virales mais aussi à l'inflammation à travers son rôle clé dans la lutte contre les processus inflammatoires notamment dans les maladies neurodégénératives (Couturier et al, 2012). Néanmoins, il avait été décrit que cette kinase pourrait aussi être impliquée dans la différenciation et prolifération cellulaires et dans certaines cascades de signalisation (de Haro et al, 1996).

❖ HRI

HRI (Heme-Regulated eIF2 α kinase), est activée lors d'une diminution en hème (Fagard & London, 1981). La kinase HRI s'autophosphoryle en de multiples sites lors d'un déficit en hème pour inhiber la traduction via la phosphorylation d'eIF2 α . En effet, HRI contient deux domaines de liaison à l'hème en N-terminale qui, une fois liés par l'hème, diminuent son activité. Elle peut aussi être activée lors de stress oxydatifs causés par l'arsenite (Rafie-Kolpin et al, 2003) ou par une exposition à de fortes concentrations d'oxyde nitrique (Inuzuka et al, 2004; Ishikawa et al, 2002). Son inactivation se ferait par dégradation protéolytique car aucun événement de déphosphorylation n'a été observé avec cette kinase.

2.2. Conséquences de l'activation des kinases d'eIF2 α

a) Phosphorylation d'eIF2 α et inhibition de la traduction

La régulation de la traduction est un moyen efficace qui permet aux cellules de faire face aux changements de l'environnement et aux divers stress cellulaires. Comparé à la régulation transcriptionnelle, le contrôle de la synthèse protéique présente le principal avantage de permettre des changements rapides dans le protéome, qui revêt une importance particulière lorsque les cellules sont confrontées à des conditions de stress (Holcik & Sonenberg, 2005). La régulation de la traduction se déroule surtout au niveau de l'initiation, qui représente généralement une étape limitante dans la synthèse protéique. L'étape d'initiation dépend de la formation du complexe de préinitiation, qui est déterminée en grande partie par la phosphorylation d'eIF2.

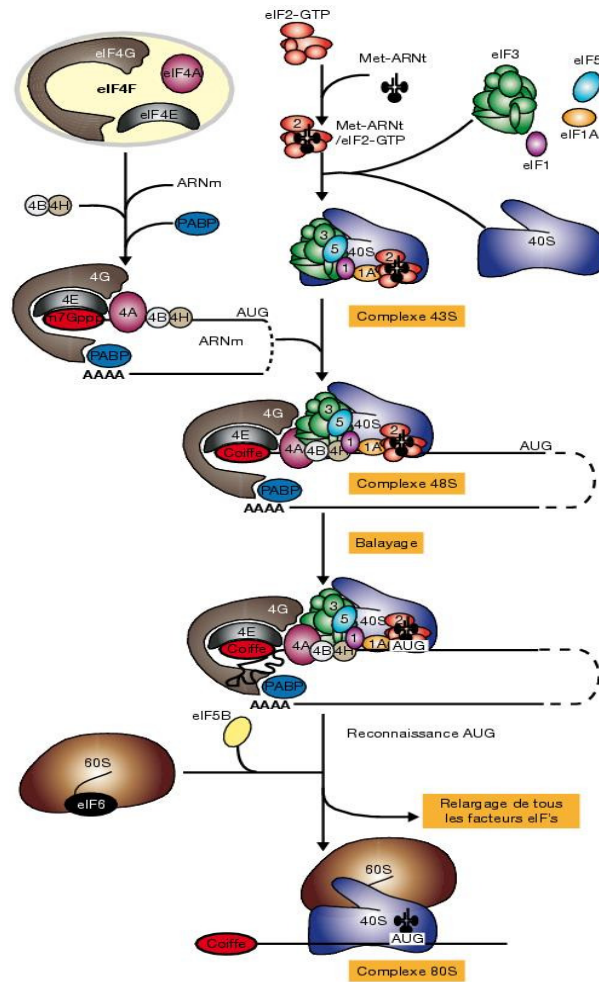


Figure 7: Etapes de l'initiation de la traduction chez les mammifères. Le complexe 43S est formé par l'association de la petite sous-unité ribosomique 40S et des facteurs eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5 et du complexe ternaire eIF2-MetARNTi-GTP. Ce pré-complexe 43S est ensuite recruté via le complexe de coiffe (eIF4F) au niveau de l'extrémité 5' des ARNm. Le complexe eIF4F comprend la sous-unité eIF4E qui s'associe à la coiffe, la sous-unité eIF4G qui fait le lien entre le complexe 43S et la protéine PABP, la sous-unité eIF4A, qui déroule les structures secondaires présentes dans l'ARNm. Cet assemblage constitue le complexe 48S qui balaye la partie 5' UTR à la recherche du codon initiateur. Une fois le complexe correctement positionné sur le codon initiateur, les facteurs eIFs sont éliminés permettant à la grande sous-unité ribosomique 60S d'interagir avec la sous-unité 40S et de former le complexe d'initiation 80S.

❖ Initiation de la traduction

La première étape de l'initiation de la traduction, qui représente l'étape limitante, consiste en la liaison du facteur eIF4E à la coiffe des ARNm (m⁷GpppX) (**Figure 7**). Cette coiffe empêche la dégradation des ARNm et favorise leur transport dans le cytoplasme (Jacquel et al, 2012; Nameki et al, 2004). La protéine d'échafaudage ou de soutien eIF4G se lie à eIF4E grâce à sa partie N-terminale. Du fait de sa taille importante (220 kDa), ce facteur permet à d'autres protéines de s'y lier et de former le complexe d'initiation de la traduction. En effet, lorsqu'eIF4A, qui sert d'hélicase pour défaire les structures secondaires de l'ARNm, est recruté par eIF4G, le complexe eIF4F est alors formé. Le facteur qui amène la sous unité ribosomale 40S près de la partie 5' des ARNm, eIF3, peut également se lier à eIF4G. D'un autre côté, le facteur eIF2 se lie à un Met-ARNt_i^{Met} lorsqu'il est lié à un GTP. Les autres facteurs, eIF5, eIF1 et eIF1A, font également partie du complexe d'initiation de la traduction, et leurs liaisons viennent former et stabiliser la sous unité 43S. Ce complexe avance sur l'ARNm en hydrolysant de l'ATP à la recherche d'un premier codon AUG dans un contexte approprié à l'initiation (Kozak, 1999). eIF1 assure la fidélité de la reconnaissance du codon d'initiation tandis que eIF5 est nécessaire pour l'hydrolyse du GTP du facteur eIF2. Cette hydrolyse entraîne la dissociation de plusieurs facteurs de la sous unité 40S. Le Met-ARNt_i^{Met} se retrouve ainsi sur le site Peptidyl (P) de la grande sous-unité ribosomale. Le facteur eIF5B vient se lier et catalyse la formation du ribosome 80S par l'union des deux sous unités 40S et 60S en hydrolysant un GTP. Il est ensuite relâché et l'élongation peut débuter.

❖ Régulation de la traduction par eIF2

Le facteur d'initiation de la traduction eIF2 fait partie de la famille des protéines G et contient trois sous unités : α , β et γ . La sous unité β participe à l'échange du GDP pour un GTP en interagissant avec le facteur eIF5 tandis que la sous unité γ contient le site de liaison au GTP (**Figure 8**). Lorsque le facteur eIF2 contient un GTP, il peut initier l'élongation en amenant un Met-ARNt_i^{Met} au premier AUG du transcrit. Par contre, en condition de stress, plusieurs kinases phosphorylent la sérine de la sous unité α du facteur en position 51 (Dever, 2002). Ceci a pour but d'inhiber la traduction car cette sérine phosphorylée empêche l'échange GDP-GTP du facteur et, par conséquent, sa liaison avec le Met-ARNt_i^{Met}. eIF2 α joue alors un rôle important dans la régulation traductionnelle en conditions de stress cellulaire (Jackson et al, 2010; Kazemi et al, 2004).

Le facteur eIF2B est un GEF (guanine-nucleotide exchange factor) pour le facteur eIF2, c'est-à-dire qu'il catalyse l'échange du GDP pour un GTP. C'est un facteur important car

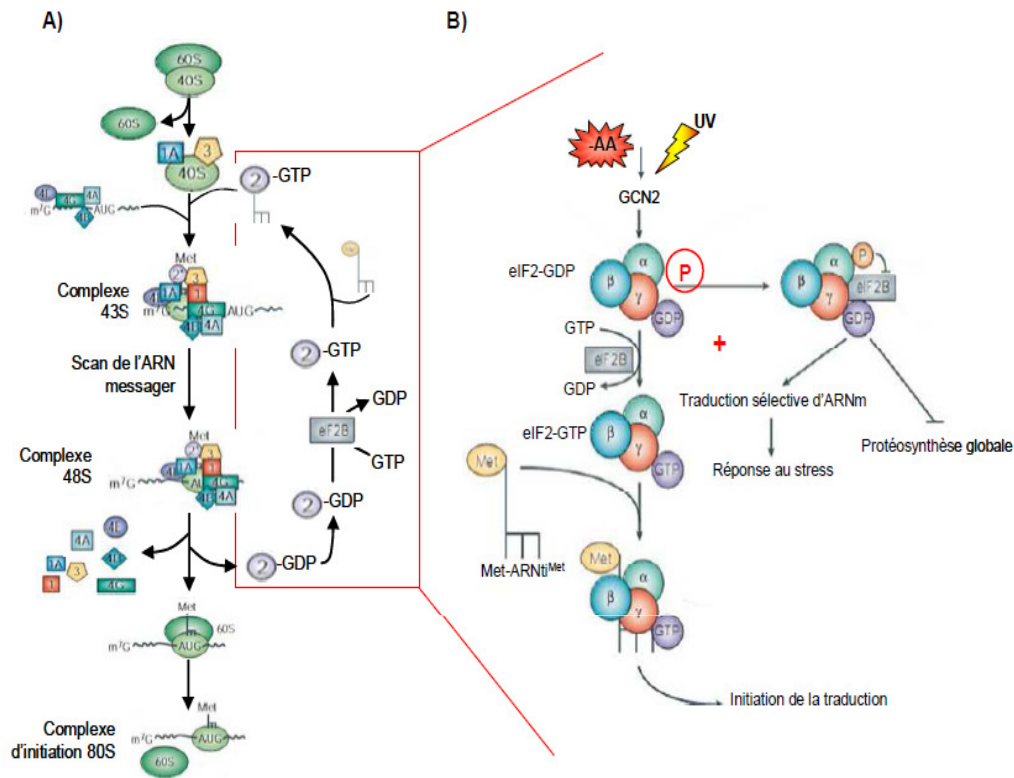


Figure 8: Intégration des signaux de stress dépendants de GCN2 par eIF2 α . (A) Schéma général de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes. eIF2 fait partie du complexe ternaire (eIF2-GTP-Met-ARNt_i^{Met}) et doit être rechargé en GTP pour pouvoir initier la traduction. Ce rechargement est réalisé par le facteur eIF2B. (B) Voie de signalisation GCN2/eIF2 α . La kinase GCN2 peut être activée par autophosphorylation en réponse à une carence en acides aminés ou un traitement aux UV. Cette activation aboutit à la phosphorylation de la sous-unité α d'eIF2, facteur indispensable au complexe ternaire (eIF2, GTP et Met-ARNt_i^{Met}). Cette phosphorylation inhibe le rechargement d'eIF2-GDP en eIF2-GTP et provoque une diminution de la traduction globale. Toutefois certains ARNm permettant l'adaptation cellulaire aux stress peuvent continuer à être traduits (d'après Holcik et Sonenberg, 2005).

l'affinité de eIF2 pour le GDP est 400 fois plus élevée que pour le GTP (Rafie-Kolpin et al, 2003). Il comprend 5 polypeptides qui forment le complexe régulateur et le complexe catalytique. La phosphorylation d'eIF2 α inhibe également l'activité de eIF2B en devenant un compétiteur (Krishnamoorthy et al, 2001). En effet, la concentration d'eIF2 est en excès par rapport à celle d'eIF2B. Ainsi, sa phosphorylation inhibe quantitativement eIF2B. Le déséquilibre du ratio eIF2/eIF2B détermine la sensibilité du système à la phosphorylation d'eIF2 α et le niveau de traduction général (Donnelly et al, 2013).

b) Phosphorylation d'eIF2 α et traduction sélective de certains ARNm

La phosphorylation d'eIF2 α induit l'inhibition de la traduction générale mais aussi la traduction sélective de certains ARNm. A ce jour, un petit nombre de ces ARNm ont été décrits dans la littérature. Parmi ces ARNm traduits on trouve ceux des facteurs de transcription ATF4 (Vattem & Wek, 2004), ATF5 (Hatano et al, 2013), C/EBP β (Wethmar et al, 2010), et de la protéine GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible protein) (Lee et al, 2009b). Le mécanisme impliqué dans l'augmentation de la traduction de ces ARNm suite à la phosphorylation d'eIF2 α met en jeu de courtes phases de lecture ouvertes appelées UORFs (Upstream open reading frame) (Deng et al, 2004). Ces uORFs sont des séquences de petites tailles (~ 30 codons) qui se situent en amont des régions traduites des ORFs principales. Les mécanismes qui régulent l'expression génique induite par le stress par la phosphorylation d'eIF2 α ont d'abord été élucidés chez *S. cerevisiae* avec GCN4 qui est l'homologue d'ATF4 (Hinnebusch, 1988 ; Hinnebusch, 2005).

2.3.ATF4

La phosphorylation d'eIF2 α favorise sélectivement la régulation positive de traduction d'ARNm qui renferment dans leurs séquences de courtes phases ouvertes de lecture (uORFs) dans la région 5' non traduite (5'-UTR) qui précède la séquence codante fonctionnelle. Chez les mammifères, la région 5'-UTR de l'ARNm d'ATF4 contient deux uORFs qui modulent l'expression de la protéine ATF4 quand eIF2 α est phosphorylé (Kilberg et al, 2009). Il a été clairement établi que l'organisation de ces uORFs en 5'-UTR est essentielle pour la réponse au stress via ATF4 (Jackson et al, 2010). Lorsque les niveaux d'eIF2-GTP sont élevés, dans les cellules non stressées, les ribosomes traduisent l'uORF1 dans la région 5'UTR. Suite à la terminaison de la traduction de ce petit polypeptide de 3 acides aminés, la petite sous-unité ribosomale reprend le balayage de la séquence d'ARNm en aval de l'uORF1, recharge le complexe ternaire eIF2-GTP- Met-ARNt_i^{Met} et initie la traduction du polypeptide de 60 acides

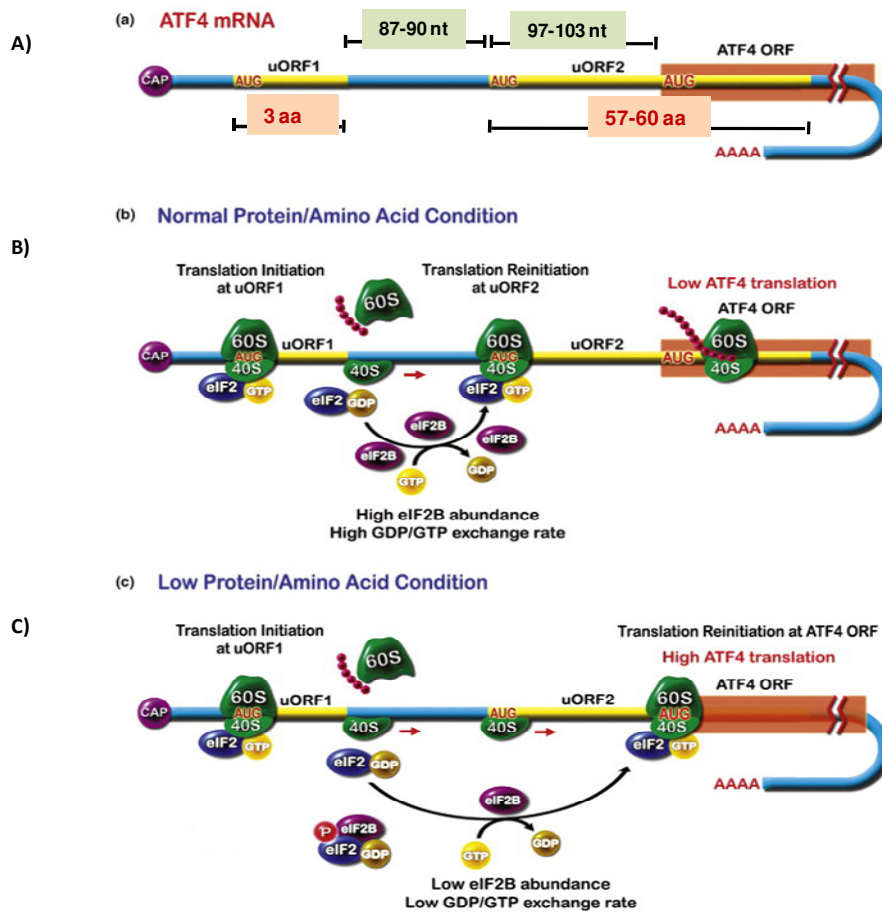


Figure 9: Régulation de la traduction d'ATF4 en réponse à la carence en acides aminés.

(A) La structure de l'ARNm d'ATF4 chez l'homme contient deux uORFs. L'uORF2 chevauche la séquence codante d'ATF4. (B) En condition de concentration normale en protéines et/ou en acides aminés, le scan de l'ARNm opéré par les ribosomes provoque l'initiation de la traduction d'ATF4 au niveau de l'uORF1. Après avoir traduit cet uORF1, la ré-initiation de la traduction, possible par un haut niveau de eIF2-GTP, va se faire au niveau de l'uORF2. La synthèse d'ATF4 sera alors faible. (C) Lors d'une faible concentration en acides aminés ou en protéine, la phosphorylation d'eIF2 va diminuer fortement la réinitiation de la traduction après l'uORF1. La sous unité 40S du ribosome va alors continuer de balayer l'ARNm. La probabilité de réinitier la traduction avant d'atteindre l'uORF2 sera faible. Dans ce cas, la sous-unité 40S va passer cet uORF et parvenir à l'ORF codant pour ATF4. Ce facteur sera traduit et son expression pourra augmenter (extrait de Kilberg M.S. *et al*, 2009).

aminés sur l'uORF2 situé 90 nucléotides en aval du uORF1, qui chevauche l'ORF ATF4 (**Figure 9**). Ainsi, la traduction de l'uORF2 empêche la traduction de l'ORF codant pour ATF4. Lorsque le niveau de eIF2-GTP est faible, lors de la phosphorylation d'eIF2 α en réponse au stress, les petites sous-unités ribosomales qui reprennent le scan de la séquence d'ARNm d'ATF4 après avoir terminé la traduction de l'uORF1, ne sont pas rechargées avec eIF2-GTP- Met-ARNt_i^{Met} quand elles atteignent l'AUG uORF2. De ce fait, la probabilité de la traduction de cet uORF chute. Les 100 autres bases qui séparent l'uORF2 de l'ORF codant pour ATF4, sont suffisantes pour permettre la liaison du complexe ternaire de la petite sous-unité ribosomales et la traduction de la séquence codant pour le facteur ATF4 (Vattem & Wek, 2004). Il a été observé que l'organisation des uORFs d'ATF4 en 5'UTR et les distances séparant uORF1, uORF2 et ORF principal codant pour ATF4 sont strictement conservée chez les mammifères (Ait Ghezala et al, 2012).

2.4. Gènes cibles de la voie eIF2 α / ATF4

La protéine ATF4 étant un facteur de transcription, l'activation de la voie eIF2 α /ATF4 lors d'un stress cellulaire peut induire la transcription de gènes cibles spécifiques impliqués dans la biosynthèse et le transport des acides aminés, dans la réponse au stress oxydant et dans l'apoptose (Harding et al, 2003).

a) Exemples de gènes cibles de la voie eIF2 α / ATF4

Un certain nombre de gènes ont été décrits dans la littérature comme étant dépendants de cette voie et conservant tous la même séquence consensus sur leur séquence promotrice. Cette séquence qui permet la fixation du facteur de transcription ATF4 est appelée CARE pour C/EBP-ATF Response Element (**Figure 10**). Comme son nom l'indique, la séquence CARE est composée sur sa première moitié d'un site consensus de fixation d'ATF4, et sur la deuxième moitié de sa séquence d'un site consensus de la fixation de C/EBP. Parmi les nombreux gènes étudiés on trouve par exemple les gènes de l'ASNS (Asparagine Synthetase), TRB3 (Tribbles 3), ATF3 (Activating Transcription Factor 3), SNAT2 (System A Neutral Amino acid Transporter 2), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), 4E-BP1 (Eukaryotic Initiation Factor 4E Binding Protein 1), xCT (sodium-independent aspartate/glutamate/cystine transporter), HERP (Homocysteine-induced ER Protein), CHOP (C/EBP Homology Protein) et CAT-1 (cationic amino acid transporter-1) (Kilberg et al, 2009). D'autres gènes activés par cette voie ont été décrits dans la littérature. Parmi ces gènes dont la transcription est régulé par ATF4, on trouve le gène codant pour l'enzyme PEPCCK (glucogenic enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase)

CARE elements are C/EBP-ATF composite sites

		ATF	C/EBP	
ASNS	-68	T G A T G	A A A C	-60
Cat-1	+45	T G A T G	A A A C	+53
xCT	-94	T G A T G	C A A A	-86
xCT	-68	T G A T G	C A A A	-76
CHOP	-302	T G A T G	C A A T	-310
SNAT2	+717	T G A T G	C A A T	+709
TRB3	+228	T G A T G	C A A A	+236
TRB3	+261	T G A T G	C A A A	+269
TRB3	+294	T G A T G	C A A A	+302
HERP	-173	T G A T G	C A A C	-181
ATF3	-23	T G A T G	C A A C	-15
VEGF	+1775	T G A T G	T A A T	+1767
4E-BP1	+873	T G A T G	A A A C	+881
4E-BP1	+899	T G A T G	A A A T	+907
Consensus		T G A T G X	A A X	
			C T	
			A C	
			T A	

TRENDS in Endocrinology & Metabolism

Figure 10: Séquences CARE de différents gènes cibles de la voie eIF2 α /ATF4. Gènes renfermant dans leurs séquences promotrices des séquences CARE (C/EBP-ATF Response Element) sur lesquelles se fixent les facteurs de transcription ATF4 et C/EBP (D'après Kilberg M.S. *et al* 2009).

(Vallejo et al, 1993), les facteurs de transcriptions ATF5 (Activating transcription factor 5) (Zhou et al, 2008) et ATF6 (Activating transcription factor 6) (Teske et al, 2011).

La liste des gènes régulés par la voie eIF2 α / ATF4 n'est pas exhaustive. La régulation de tous ces gènes dépend de la phosphorylation d'eIF2 α induite lors d'un stress cellulaire telle qu'une carence en acides aminés ou le stress du réticulum endoplasmique, ainsi que de la fixation d'ATF4 sur leur séquence promotrice afin de réguler leur transcription.

b) CHOP: un gène cible de la voie eIF2 α /ATF4

❖ Le gène et la protéine CHOP

Parmi les cibles de la voie de signalisation eIF2 α /ATF4, le facteur de transcription CHOP connu aussi sous le nom de GADD153 ou DDIT3 est très étudié. Ce gène code pour une protéine de 19kDa appartenant à la famille des facteurs de transcription C/EBP. Son expression est induite en réponse à un stress du réticulum endoplasmique, une carence en acides aminés, une irradiation aux UV ou encore différents autres stress. Comme les autres membres de cette famille, CHOP est composé d'un domaine d'activation, d'une région leucine Zipper de dimérisation (b-zip) et d'un domaine basique de liaison à l'ADN. Tous les membres de cette famille ont un domaine de dimérisation relativement bien conservé, ce qui leur permet de former des homo- ou des hétérodimères avec les autres membres de la famille C/EBP (Wang et al, 1998), mais aussi avec les protéines ATF comme ATF4. La dimérisation de ces facteurs, nécessaire pour qu'il y ait liaison à l'ADN, va conduire à la régulation transcriptionnelle de l'expression d'un certain nombre de gènes cibles appelés gènes DOCs (DOWNstream of CHOP) (Wang et al, 1998) dont celui de l'Anhydrase Carbonique VI (Sok et al, 1999).

❖ Fonctions de CHOP

- *In vitro*

CHOP a été décrit comme étant impliqué dans la différenciation cellulaire, l'apoptose ou encore la cancérogenèse. Il a notamment été mis en évidence que CHOP pourrait jouer un rôle dans la différenciation adipocytaire (Tang & Lane, 2000). L'adipogenèse met en jeu l'expression de nombreux facteurs de transcription, dans un ordre bien précis et de manière coordonnée, dont les facteurs C/EBP qui jouent un rôle très important. Une surexpression précoce de *CHOP* entraîne un arrêt précoce de la prolifération des préadipocytes et une absence de différenciation.

CHOP est également impliqué dans certains processus apoptotiques (**Figure 11**). Des travaux ont mis en évidence que la surexpression de *CHOP* rendait des cellules plus sensibles à l'apoptose lors d'un stress ER induit à la thapsygarine (Matsumoto et al, 1996). Cette

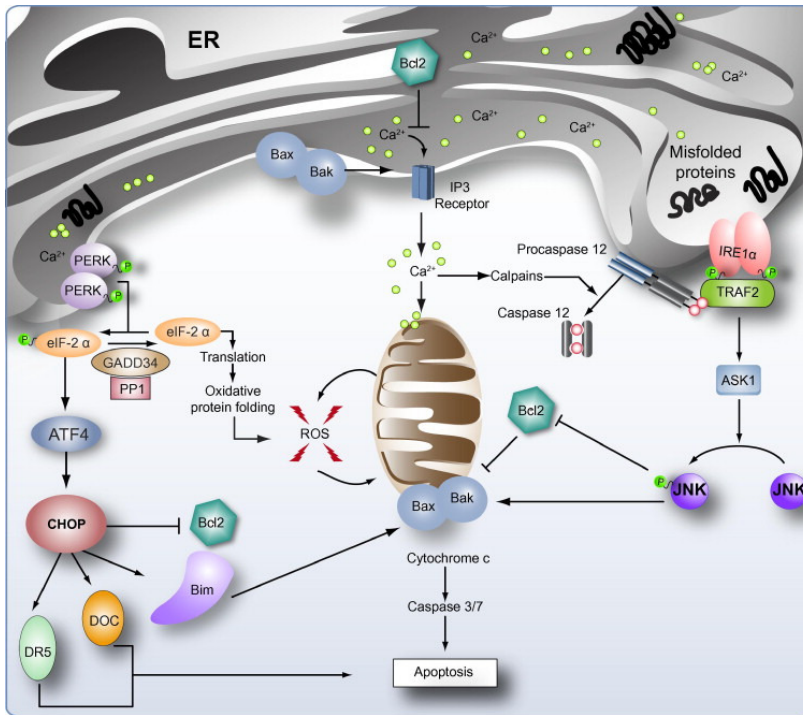


Figure 11: Rôle important de CHOP dans le processus apoptotique lors d'un stress du RE. CHOP peut induire l'expression de la protéine pro-apoptotique Bim, les récepteurs de la mort de la surface cellulaire TRAIL 2, les gènes DOC (Downstream of CHOP), et inhiber la transcription de la protéine Bcl-2. Le mal repliement des protéines oxydatives et le dysfonctionnement mitochondrial sont associés à l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) avec des dommages cellulaires oxydatif plus en aval. JNK est activée par l'intermédiaire de IRE1 α via TRAF2. JNK peut phosphoryler et activer la protéine Bcl-2 de la famille des protéines pro-apoptotiques et inactiver des protéines anti-apoptotiques (extrait de Malhi & Kaufman *et al.*, 2011).

sensibilisation serait due à une diminution du niveau d'expression de *BCL2*, facteur anti-apoptotique régulé de manière négative par CHOP, mais aussi à l'induction positive de l'expression de gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques telles que Bim et PUMA (Altman et al, 2009; Ishihara et al, 2007). La protéine kinase p38 serait également impliquée dans cette régulation. Elle augmenterait l'effet apoptotique de CHOP, bien que cette phosphorylation ne semble pas indispensable. Ainsi la mutation de sites ciblés par p38 n'abolit pas totalement les effets de CHOP sur l'apoptose (Maytin et al, 2001). Récemment il a été mis en évidence le rôle clé de CHOP et ATF4 dans la régulation de la transcription d'ATF5. Les auteurs de ces travaux ont montré qu'un knock-down d'ATF5 augmentait la survie des cellules en réponse à l'inhibition du protéasome, soutenant l'idée que les deux facteurs ATF5 et CHOP ont des fonctions pro-apoptotiques (Koban et al, 2012).

- *In vivo*

Relativement peu d'études *in vivo* se sont intéressées à la fonction de CHOP dans l'organisme. Les souris CHOP^{-/-} ne présentent pas de défauts de développement ou de fertilité. En revanche, un rôle de CHOP a été mis en évidence dans la lignée de souris "Akita". Ces souris ont une mutation du gène de l'insuline 2 entraînant la synthèse d'une protéine mal repliée. Au début de leur vie, ces souris présentent une glycémie normale grâce à une compensation par le gène de l'insuline 1. Mais rapidement un diabète s'installe, et on observe une apoptose des cellules β -pancréatiques due à un important stress ER, provoqué par l'insuline 2 défectueuse (Nozaki et al, 2004). L'invalidation du gène *CHOP* chez ces souris permet de retarder l'apparition du diabète et de diminuer l'apoptose des cellules β du pancréas (Oyadomari et al, 2002). Récemment, Ariyama *et al.* ont étudié *in vivo* le rôle de CHOP dans le développement de l'obésité. Après un régime riche en lipides pendant 24 semaines, les souris femelle CHOP^{-/-} ont ainsi développé un phénotype "obèse" (poids supérieur, taux plasmatique de leptine et d'adiponectine élevés) et étaient plus grosses que les souris sauvages. Ils ont par ailleurs observé une modification dans l'expression des facteurs C/EBP α et C/EBP β . Ceci prouve *in vivo* l'effet capital de CHOP et des autres membres de la famille C/EBP dans les processus de différenciation adipocytaire (Ariyama et al, 2007).

La plupart des études *in vivo* utilisent l'expression de *CHOP* comme "marqueur" du stress ER. En effet, de plus en plus d'études s'intéressent aux effets du stress ER dans diverses pathologies (neurodégénératives, virales,...) (Wang et al, 2007). Dans un autre domaine, il a été démontré que *CHOP* est surexprimé dans les hépatocytes de rats lors de la phase aigüe de la

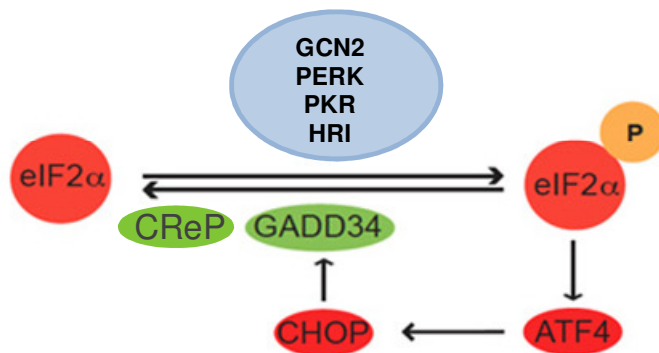


Figure 12: Aperçu schématique de la réponse intégrée au stress dépendante de la phosphorylation d'eIF2α (ISR). Les quatre kinases GCN2, PERK, PKR et HRI qui répondent à des stress distincts, vont phosphoryler eIF2α qui à son tour va induire l'expression d'ATF4 activant ainsi des gènes en aval. Ces derniers comprennent le gène codant pour le facteur de transcription CHOP qui active à son tour la transcription de GADD34, qui code pour une sous-unité spécifique régulatrice d'une phosphatase d'eIF2α et qui induit un rétrocontrôle négatif sur la voie ISR. CReP est une sous-unité régulatrice constitutive d'une phosphatase qui déphosphoryle eIF2α.

réponse inflammatoire. Cette régulation impliquerait les autres membres de la famille C/EBP (Sylvester et al, 1994).

De par son effet apoptotique lors d'un stress ER, CHOP pourrait donc être impliqué dans des cas de diabète, d'ischémie centrale (Paschen et al, 1998), de mort des cellules rétinienne (Das et al, 2012; Shimazawa et al, 2007) ou encore de maladies neurodégénératives (Sokka et al, 2007).

3. Rétro-contrôle de la voie eIF2 α / ATF4

La phosphorylation d'eIF2 α est un événement moléculaire très dynamique et excessivement bien régulé qui permet de contrôler finement la réponse aux stress. En effet, il existe pour les quatre kinases précitées phosphorylant eIF2 α , deux phosphatases connues qui déphosphorylent eIF2 α freinant ainsi son activité (**Figure 12**). Dans les cellules de mammifères, il existe un complexe constitutif, constitué d'une sous-unité régulatrice spécifique d'eIF2 α (CREP) et de la sous-unité catalytique de la protéine phosphatase I (PP1c), qui contribue à l'activité phosphatase basale élevée dirigée contre eIF2 α (Jousse et al, 2003). Dans les cellules stressées, la phosphorylation d'eIF2 α active la transcription et la traduction de GADD34 (Brush et al, 2003; Novoa et al, 2001). La protéine GADD34 traduite va former un complexe avec PP1c et augmenter de manière significative l'activité de la phosphatase dirigée contre eIF2 α dans les cellules. Ce mécanisme de rétrocontrôle va permettre la reprise de la synthèse protéique pendant les phases ultérieures de la réponse au stress activateur des kinases d'eIF2 α (Kojima et al, 2003; Novoa et al, 2003). Jusqu'à maintenant, GADD34 et CREP sont les seuls responsables connus de la déphosphorylation d'eIF2 α .

4. Implications de la voie eIF2 α / ATF4 dans l'adaptation au stress

4.1. Adaptation à une carence nutritionnelle

Chez les mammifères, lors d'une carence en un acide aminé indispensable tels que la leucine ou le tryptophane, la voie eIF2 α / ATF4 joue un rôle important dans l'adaptation à ce stress nutritionnel afin de permettre à l'organisme d'y faire face. Comme vu précédemment (paragraphe 2-1), la kinase qui répond à une carence en un acide aminé indispensable est la kinase GCN2. La kinase GCN2 est exprimée dans de très nombreux tissus, mais avec des niveaux d'expression très variables (Berlanga et al, 1999) et joue des rôles importants au niveau physiologique. Le gène *gcn2* a été inactivé chez la souris et cette kinase ne semble pas être essentielle pour la croissance dans les conditions normales. Par contre lors d'une carence en

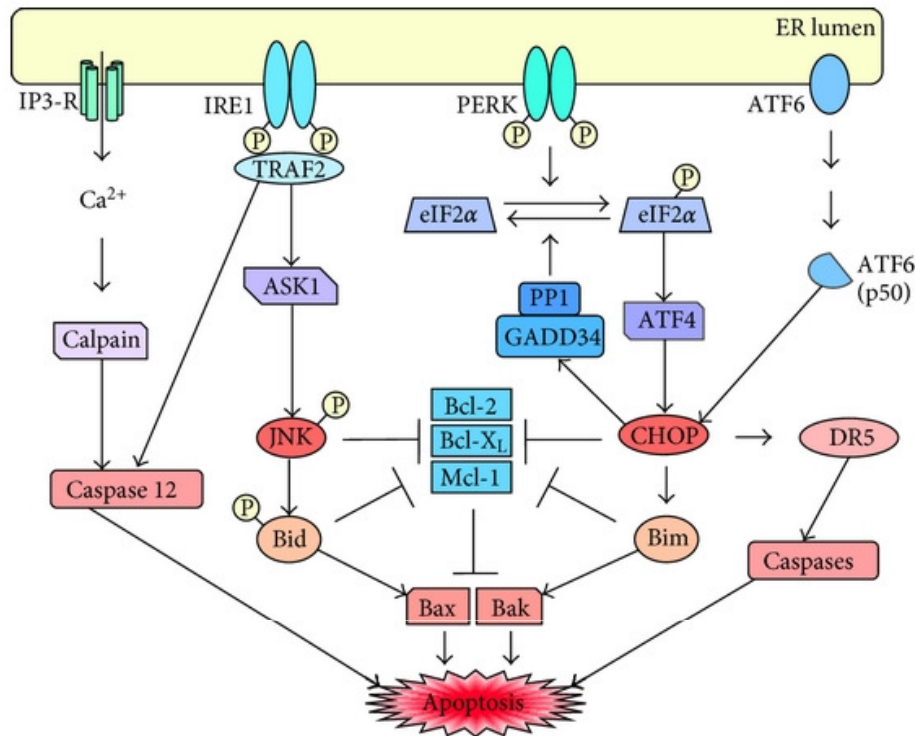


Figure 13: Signalisation de la mort cellulaire par la réponse au stress du RE/UPR. En cas de stress du RE sévère et durable, l'expression d'un certain nombre de gènes pro-apoptotiques est augmentée ce qui conduit à l'apoptose. Les facteurs de transcription ATF4 et ATF6-p50 stimulent l'expression de CHOP. D'une part, CHOP induit l'expression de GADD34, qui s'associe avec PP1, entraînant la déphosphorylation de eIF2 α , réactivant ainsi la synthèse globale des protéines cellulaires. D'autre part, CHOP inhibe l'expression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et stimule celle de Bim qui est pro-apoptotique, l'ensemble entraîne l'hétérodimérisation et l'activation des pro-apoptotique Bax et Bak. CHOP stimule également l'expression de récepteur de mort de la surface cellulaire DR5, ce qui sensibilise les cellules à des stimuli pro-apoptotiques, vraisemblablement via la voie apoptotique extrinsèque impliquant la caspase 12. JNK activée induit une synergie de régulation des cibles de CHOP. JNK est phosphorylée et activée par la protéine kinase ASK1 lors de l'association de TRAF2 avec IRE1 activé. L'association de TRAF2 avec IRE1 activé conduit également à l'activation de la caspase 12. La libération du calcium du RE via les récepteurs IP3 peut activer les calpaines, ce qui stimule davantage l'activation de la caspase 12 par clivage protéolytique de son précurseur pro-caspase inactive (extrait de Schönthal A. H. *et al.* 2012).

acides aminés durant la gestation, le taux de mortalité augmente significativement (Zhang et al, 2002).

La kinase GCN2 est impliquée dans plusieurs processus physiologiques tels que l'adaptation de la prise alimentaire (Gietzen, 1993) notamment via son rôle dans le développement de l'aversion alimentaire résultant de la consommation d'un régime carencé en acides aminés (Hao et al, 2005; Maurin et al, 2005). En effet, la consommation d'un régime déséquilibré en acides aminés induit l'activation de la protéine kinase GCN2 dans les neurones du cortex piriforme antérieur (APC) et de l'hypothalamus qui jouent un rôle clé dans le contrôle de l'appétit.

GCN2 joue aussi un rôle clé dans l'adaptation du métabolisme lipidique (Guo & Cavener, 2007). Ces dernières années, sont apparues quelques perspectives qui laissent suggérer un rôle très large de GCN2 dans la régulation du métabolisme lipidique notamment suite à une carence en leucine, qui induit une répression de l'expression et de l'activité de certaines enzymes de la lipogénèse au niveau hépatique de façon dépendante de GCN2 (Guo & Cavener, 2007).

La kinase GCN2 est impliquée dans la régulation de l'immunité *via* son rôle inhibiteur dans la différenciation d'un type particulier de cellules T « helper » (Sundrud et al, 2009) ainsi que son implication dans la communication entre les cellules dendritiques et les cellules T (Brenk et al, 2009 ; Munn et al, 2005). Enfin, des travaux ont montré son rôle indispensable dans des processus de plasticité synaptique et de mise en mémoire (Costa-Mattioli et al, 2005; Costa-Mattioli et al, 2007).

4.2. Adaptation au stress du Réticulum Endoplasmique (RE)

Le stress du RE se définit comme étant une accumulation de protéines mal repliées au niveau du réticulum endoplasmique. En effet, c'est au sein du réticulum endoplasmique que les protéines sécrétées ou membranaires acquièrent leur conformation définitive. Dans certaines situations, la capacité du réticulum à replier les protéines peut être dépassée par la production de protéines. Certains traitements pharmacologiques aboutissent aussi à des défauts de son fonctionnement. Le stress du RE peut être induit notamment par la carence en glucose ou un certain nombre de drogues (agents alkylants, réducteur des ponts disulfures). Dans de tels cas, il se produit une accumulation de protéines mal formées qui peut être très délétère pour la cellule. Cette accumulation est détectée au sein du réticulum et une réponse de la cellule au stress du RE aussi appelée « Unfolded Protein Response » (UPR) est alors déclenchée (**Figure 13**).

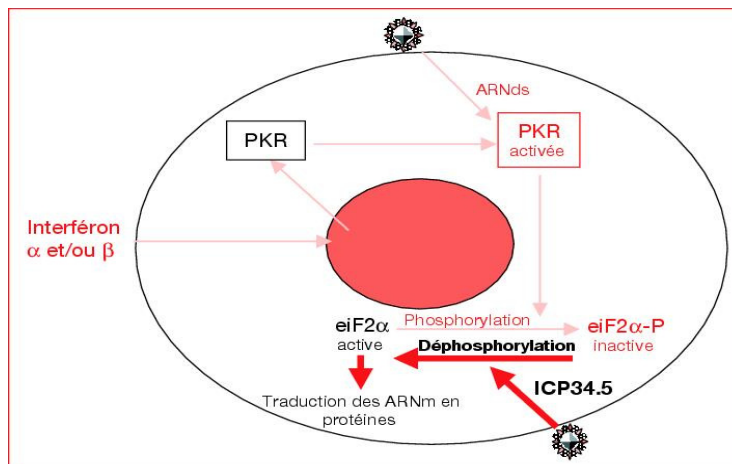


Figure 14: Exemple de l'implication de PKR dans la réponse antivirale. Cascade antivirale (flèches roses) au sein d'une cellule stimulée par les interférons α et β en présence d'ARN viral bicaténaire (ARNds). La protéine kinase PKR phosphoryle la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction. La protéine virale ICP34.5 contrecarre cette cascade d'événements en déphosphorylant la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction (flèches rouges) (extrait de Muylkens B. *et al.* 2003).

Cette réponse UPR comprend l'activation de 3 voies de signalisation dont la voie eIF2 α /ATF4 qui fait appel à la kinase PERK, située au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, et activée par autophosphorylation (Teske et al, 2011). La protéine kinase PERK s'oligodimérise ce qui induit une autophosphorylation de son domaine kinase. Elle va phosphoryler eIF2 α ce qui déclenche une inhibition de la traduction, limitant ainsi l'afflux de protéines au niveau du réticulum endoplasmique dont les capacités de repliement sont saturées. Du fait de la phosphorylation d'eIF2 α , la traduction du facteur ATF4 est induite. Ce facteur de transcription va réguler l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans la réponse au stress (Harding et al, 2003). En effet, ATF4 va activer la transcription de gènes codant des protéines de la réponse UPR tels que BiP et GRP94 ainsi que des protéines du programme de mort cellulaire, comme CHOP (C/EBP HOmologous Protein) (Han et al, 2013) dont un des gènes cibles code GADD34 (Growth Arrest and DNA Damage inducible protein 34).

4.3. Adaptation aux infections

La voie eIF2 α /ATF4 est activée aussi en cas d'infections virales via l'activation de la kinase PKR par la fixation d'ARNs doubles brins (Lemaire et al, 2008) (**Figure 14**). Lorsque la réplication virale augmente, la multiplication de l'ARN viral entraîne alors une monomérisation de PKR entraînant l'inhibition de son activité kinase. Ainsi il a été montré lors de l'infection par le VIH-1 que PKR est activée par de faibles quantités de l'ARN du Trans-activation response element (*TAR*). En culture cellulaire, la surexpression de PKR permet d'inhiber efficacement la réplication du VIH-1 (Adelson et al, 1999). Dans le cadre de l'infection au Virus Respiratoire Syncytial (RSV), PKR est activée par autophosphorylation, cependant la traduction est maintenue. Ceci est dû à la séquestration de PKR par la protéine N du virus qui l'empêche d'aller phosphoryler eIF2 α favorisant ainsi la déphosphorylation d'eIF2 α par la phosphatase PP2A (Groskreutz et al, 2010). De nombreuses études ont décrit le rôle clé joué par PKR dans la défense contre certains virus via l'interféron (Balachandran et al, 2000). Néanmoins, le rôle de PKR demeure limité dans la réponse antivirale de l'organisme lors d'une infection par certains virus tels que le Sindbis virus, le virus de l'encéphalite ou le virus de la grippe qui impliquent des voies antivirales alternatives. D'autres études montrent que lors de certaines infections virales, la voie eIF2 α /ATF4 est activée via l'activation de la kinase PERK permettant ainsi la modulation de la pathogénicité et de la réplication virale (Egan et al, 2011a).

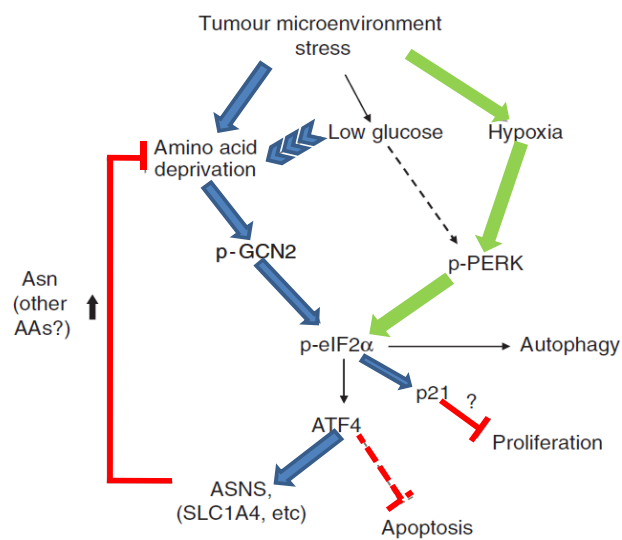


Figure 15: Implication de GCN2, ATF4 et ASNS dans la mise en place d'une protection cellulaire au sein d'un microenvironnement de stress tumoral. Les flèches bleues indiquent une signalisation principalement en réponse à une carence nutritionnelle et les flèches vertes indiquent une signalisation principalement induite par le stress hypoxique. Les voies communes sont indiquées par des flèches noires. ATF4 a probablement des fonctions supplémentaires en réponse à l'hypoxie qui ne sont pas représentées ici (extrait de Ye J. *et al.* 2010).

4.4. Adaptation à d'autres stress

L'activation de la voie eIF2 α /ATF4 par GCN2 est également impliquée dans la réponse cellulaire contre les dommages causés par les irradiations aux UV. En effet, lors d'une irradiation de cellules de souris avec des UV, la phosphorylation d'eIF2 α par GCN2 est détectée (Lu et al, 2009). La phosphorylation d'eIF2 α entraîne l'activation de NF- κ b (Nuclear Factor κ b) et déclenche la transcription de gènes anti-apoptotiques dans le noyau.

D'autre part, il a été montré que dans des conditions hypoxiques (microenvironnement au sein des tumeurs solides), PERK et GCN2 sont activées et conduisent à la phosphorylation d'eIF2 α (Liu et al, 2010). Non seulement GCN2 évite aux cellules mises en conditions de cultures hypoxiques d'entrer en apoptose, mais elle leur permet également de mieux récupérer du stress une fois les cellules remises en condition de culture normale. L'hypoxie est un environnement retrouvé au sein des tumeurs solides, et GCN2 en collaboration avec PERK participent à la survie de ces cellules cancéreuses. Ces deux protéines pourraient donc constituer des cibles potentielles pour développer de nouveaux traitements anticancéreux. Néanmoins, *in vivo*, PERK a été aussi décrit activant la voie eIF2 α /ATF4 et induire ainsi une mort cellulaire par apoptose suite à un stress hypoxique (**Figure 15**) (Zhao & Klionsky, 2011).

5. Implication de la voie eIF2 α /ATF4 en pathologie

La voie eIF2 α /ATF4 joue un rôle important dans l'homéostasie cellulaire. Par conséquent, la dérégulation de cette voie est impliquée dans un certain nombre de pathologies. La dérégulation de cette voie de signalisation peut être à l'origine de certaines pathologies, ou bien une conséquence à la mise en place du processus pathologique et dans ce dernier cas, elle peut servir de marqueur de la maladie.

Étant donné que l'activation de cette voie via la kinase PERK est impliquée dans le développement des cellules β du pancréas, une altération de l'activité de PERK induit la mise en place du diabète (Laybutt et al, 2007). De récentes études ont aussi montré l'implication de la voie eIF2 α /ATF4 dans la prolifération tumorale (lors d'une hypoxie et la diminution de la disponibilité en aliments) (Fels & Koumenis, 2006) et les maladies neurodégénératives (Sun et al, 2013). En effet, l'inactivation de la kinase PERK a été décrite comme étant impliquée dans certaines maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Hoozemans et al, 2009) et la maladie de Parkinson (Bouman et al, 2011). L'implication de cette voie s'étend à de nombreuses pathologies telles que la sclérose latérale amyotrophique (ALS) (Atkin et al, 2008),

les maladies à prion (Hetz & Glimcher, 2009), la stéatose hépatique (Malhi & Kaufman, 2011), et l'atrophie des muscles squelettiques (Ebert et al, 2010).

Ces dernières années, le rôle de voie eIF2 α /ATF4 activée via la kinase GCN2 a été bien caractérisé dans la survie, la prolifération cellulaire et la croissance tumorale (Ye et al, 2010). Néanmoins, son implication dans le processus autophagique reste peu décrite chez les mammifères. Des études ont montré récemment que l'inhibition de la kinase PERK réduit considérablement l'autophagie induite par le proto-oncogène c-Myc et la formation de tumeurs (Hart et al, 2012). D'autres études ont montré que l'activation de PERK amène celle du facteur Nrf2 qui à son tour contribue à la survie cellulaire face au stress oxydatif (Cullinan & Diehl, 2004).

Vu ses nombreuses implications dans diverses pathologies décrites ces dernières années, la voie eIF2 α /ATF4 est devenue une cible thérapeutique putative très étudiée (Fullwood et al, 2012).

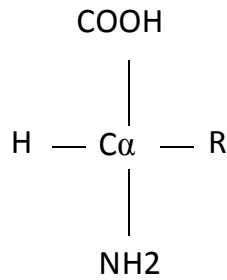


Figure 16: Les acides aminés naturels sont essentiellement des acides alpha aminés. R représente une chaîne latérale spécifique à chaque acide aminé.

aliphatiques hydrophobes	aromatiques hydrophobes	amidés	aromatique hydroxylés	hydrophiles hydroxylés	soufrés	dibasiques	diacides
Glycine (Gly; G)	Phénylalanine (Phe; Y)	Asparagine (Asn; N)	Tyrosine (Tyr; Y)	Sérine (Ser; S)	Cystéine (Cys; C)	Lysine (Lys; K)	Aspartate (aussi appelé Acide Apatique Asp; D)
Alanine (Ala; A)	Tryptophane (Trp; W)	Glutamine (Gln; Q)		Thréonine (Thr; T)	Méthionine (Met; M)	Arginine (Arg; R)	Glutamate (aussi appelé Acide Glutamique Glu; E)
Valine (Val; V)						Histidine (His; H)	
Leucine (Leu; L)							
Isoleucine (Ile; I)							
Proline (Pro; P)							

Tableau 1: Classement des acides aminés par famille. Entre parenthèse sont indiqués les noms abrégés des différents acides aminés.

Acides aminés indispensables	Acides aminés non indispensables
Isoleucine	Arginine (indispensable chez le jeune)
Leucine	Alanine
Valine	Asparagine
Lysine	Aspartate
Méthionine	Glutamate
Thréonine	Sérine
Phénylalanine	Acides aminés conditionnellement indispensables
Tryptophane	Glutamine
Histidine	Glycine
	Proline
	Cystéine (à partir de méthionine)
	Tyrosine (à partir de phénylalanine)

Tableau 2: Classification des acides aminés chez l'Homme. Lors de certaines conditions physiopathologiques, certains acides aminés non indispensables, synthétisés *de novo* par l'organisme, deviennent indispensables et doivent être apportés par l'alimentation : ce sont les acides aminés conditionnels. (adapté de Young *et al.*, 1994)

Chapitre II – Mécanismes d'adaptation à une carence en acides aminés et activation de la voie eIF2 α /ATF4

1. Généralités sur les acides aminés :

1.1. Propriétés des acides aminés

Les acides aminés sont des molécules organiques composées d'un squelette organique et de deux groupes fonctionnels : une amine (-NH₂) et un acide carboxylique (-COOH) (**Figure 16**). Il existe dans la nature plusieurs centaines d'acides aminés, mais seulement 20 sont capables de se fixer sur les ARNs de transfert (ARNt) et de participer à la synthèse protéique : ce sont les acides α -aminés naturels. Ces acides aminés sont les maillons qui constituent les protéines. Ils possèdent également une fonction permettant de les classer selon huit "familles" (aliphatiques hydrophobes, aromatiques hydrophobes, amidés, aromatiques hydroxylés, hydrophiles hydroxylés, soufrés, dibasiques, diacides) (**Tableau 1**). Cependant plusieurs types de classements sont possibles puisque certains acides aminés peuvent entrer dans plusieurs catégories. Parmi ces acides aminés, tous ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme. Ceux-ci doivent alors être fournis par l'alimentation. Les recherches nutritionnelles basées sur des régimes qui permettent l'apport à l'organisme de ces substances sont dues à W.C.Rose (1937), qui a identifié en la thréonine le premier acide aminé essentiel (du latin *essentia*, être) c'est-à-dire indispensable. Depuis, neuf acides aminés indispensables ont été caractérisés chez l'Homme (Young et al, 1994). Par ailleurs, chez l'Homme, dans certaines conditions physiologiques (grossesse, enfants en croissance) ou physiopathologiques (infections, post-opération, brûlures) certains acides aminés peuvent être synthétisés mais en quantité insuffisante pour couvrir l'ensemble des besoins (Barbul, 1986; Souba et al, 1985). On parle alors dans ce cas d'acides aminés conditionnellement indispensables (**Tableau 2**).

1.2. Fonctions des acides aminés

Les acides aminés sont principalement connus pour leur rôle majeur dans la synthèse protéique, ainsi que pour leur implication dans différentes voies métaboliques (**Tableau 3**). Ainsi, les acides aminés peuvent servir de substrat à la synthèse d'hormones, de neurotransmetteurs ou encore de molécules signales. Ainsi ils participent à la synthèse de neuromédiateurs (tryptophane \rightarrow sérotonine) ou sont des neuromédiateurs naturels (glutamate).

FONCTIONS	EXEMPLES
Régulateurs du turnover protéique	Leucine, Arginine
Précurseurs de médiateurs	Arginine (NO°)
Réactions de méthylation	Méthionine
Neurotransmetteurs	Tryptophane (sérotonine), Glutamate
Précurseurs de molécules biologiques	Arginine (créatine), Glutamine (purines)
Transporteur d'azote	Alanine, Glutamine
Pouvoir antioxydant	Cystéine
Précurseurs d'acides aminés	Méthionine (Cystéine) Phénylalanine (Tyrosine)
Néoglucogénèse	Alanine, Sérine, Glutamine

Tableau 3: Exemples de fonctions des acides aminés. (d'après Young *et al.*, 1994)

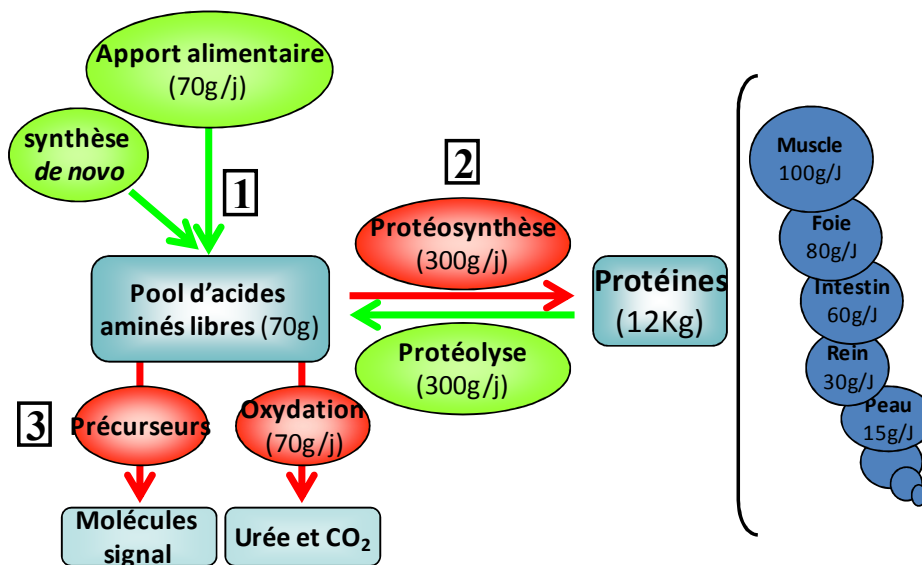


Figure 17: Principaux systèmes responsables du maintien de l'homéostasie des acides aminés et des protéines chez l'homme. Le pool d'acides aminés libres dépend, (1) de l'apport de protéines alimentaires et de la synthèse d'acides aminés *de novo*, (2) de la synthèse et dégradation des protéines, et (3) de l'oxydation des acides aminés ou de leur utilisation pour la synthèse de molécules signal (hormones, neuromédiateurs,...). Les taux de renouvellement et les flux d'acides aminés journaliers pour un adulte sain d'environ 80 Kg sont indiqués entre parenthèse (d'après Cano N. *et al.*, 2007).

Certains sont des précurseurs d'hormones (tyrosine → catécholamines) ou de molécules signales (arginine → monoxyde d'azote radicalaire NO°) allant stimuler les défenses immunitaires ou encore aboutissant à une vasodilatation de l'endothélium vasculaire. Les besoins nutritionnels en acides aminés ont été bien étudiés dans différentes espèces et en particulier chez l'homme (Millward, 1994 ; Young, 1998).

1.3. Homéostasie des acides aminés

Contrairement aux autres nutriments comme les lipides ou les glucides, il n'existe pas d'organe de stockage pour les acides aminés. Au sein de l'organisme, le pool d'acides aminés libres est en équilibre dynamique entre les flux "entrants", augmentant ce pool, et les flux "sortants", le diminuant (**Figure 17**). Les entrées proviennent des apports alimentaires, de la dégradation des protéines et de la synthèse *de novo*. A l'inverse, les sorties sont le fait de la protéosynthèse, du catabolisme des acides aminés et de leur utilisation en tant que précurseurs. Lorsque l'un de ces mécanismes varie, l'organisme régule les autres flux afin de maintenir cet équilibre. La description de ce système illustre bien la notion d'acide aminé indispensable: si l'un de ces acides aminés vient à manquer dans l'alimentation, il sera fourni par la dégradation des protéines. Cette régulation se fait donc au détriment de certains organes, essentiellement l'intestin, le muscle et le foie, mais ne peut être permanente.

1.4. Métabolisme des acides aminés

Après un repas, en situation post-prandiale, une partie importante des acides aminés issus de la digestion des protéines alimentaires est captée par le foie, en particulier les acides aminés dicarboxyliques et glucoformateurs. Une partie d'entre eux est alors utilisée pour la synthèse protéique hépatique tandis que le reste sera utilisé pour la néoglucogenèse et l'uréogenèse. La position centrale du foie dans l'organisme lui confère un rôle majeur dans l'utilisation de l'azote ingéré, en modulant quantitativement et qualitativement la redistribution post-prandiale des acides aminés vers les tissus périphériques.

En revanche, les acides aminés à chaîne ramifiée (leucine, isoleucine, valine) ainsi que la méthionine ne sont pas métabolisés par le foie. Ils vont donc passer dans la circulation périphérique où leur concentration peut être fortement augmentée en situation post-prandiale. C'est d'ailleurs pendant cette période que les acides aminés à chaîne ramifiée et le glutamate sont captés par les muscles squelettiques et utilisés pour la synthèse protéique et la synthèse de glutamine.

1.5. Catabolisme des acides aminés

Les acides aminés sont utilisés dans de très nombreuses voies métaboliques, aboutissant à l'accumulation de multiples produits de dégradation tels l'ammoniac. Celui-ci, toxique pour les cellules, est alors transporté jusqu'au foie par la glutamine (synthétisée à partir du glutamate) ou d'autres acides aminés tels l'alanine qui peuvent également participer à ce transfert. Arrivée dans le foie, la glutamine est à nouveau catabolisée en glutamate, libérant ainsi son ammoniac qui pourra alors être pris en charge par la machinerie enzymatique du cycle de l'urée. Le muscle peut également être catabolisé afin de libérer des acides aminés, et en particulier ceux à chaîne ramifiée et le glutamate. Ainsi, au cours d'un jeûne prolongé ou d'un état cachectique, on observe un catabolisme important des protéines musculaires et une forte libération d'acides aminés comme l'alanine ou la glutamine qui sont les principaux substrats de la néoglucogenèse.

Les acides aminés non indispensables peuvent être synthétisés dans les cellules à partir du glucose, du pyruvate, de l'oxaloacétate ou encore de l' α -cétoglutarate par des réactions de transamination. Chez l'Homme, deux acides aminés indispensables, la cystéine et la tyrosine, peuvent être synthétisés dans certaines circonstances en faible quantité à partir de la méthionine et de la phénylalanine, qui sont eux aussi des acides aminés indispensables.

2. Acides aminés et régulation de l'expression des gènes

2.1. Régulation des gènes par les acides aminés

Chez les mammifères, un certain nombre de travaux ont montré que les acides aminés sont capables de moduler de l'expression de certains gènes. Des résultats de puces à ADN ont montré que de nombreux gènes pouvaient répondre (positivement ou négativement) à une variation de la concentration en acides aminés. Ainsi, une puce Affymetrix de 11.000 gènes a été hybridée avec des ARNm de lymphomes humain (Peng et al, 2002). La grande majorité des gènes réprimés par la carence en leucine (80%) le sont également par la carence en glutamine. En revanche, seulement 40% des gènes réprimés par la glutamine le sont également par la leucine. Ce résultat illustre qu'il existe différents types de régulation qui ne sont pas partagés par tous les acides aminés.

Différentes études ont aussi montré qu'une carence en un ou plusieurs acides aminés était capable d'augmenter la quantité de certains ARNm. Cette observation, décrite pour la première fois en 1981, concernait l'augmentation du nombre de transporteurs d'acides aminés SNAT2

(système A), conséquence selon l'hypothèse des auteurs d'une augmentation des transcrits suite à la carence. La première confirmation d'un tel mécanisme a été apportée dix ans plus tard par (Gazzola et al, 1981) qui ont pu démontrer que la transcription du gène *Asparagine Synthase* (*ASNS*) et la stabilité de son transcrit étaient augmentés lors d'une carence en acides aminés (Gong et al, 1991). En 1993, des études ont mis en évidence une régulation similaire pour le gène *Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1* (*IGFBP-1*) (Straus et al, 1993), puis l'année suivante cette même équipe a identifié six nouveaux gènes surexprimés par la carence en acides aminés, dont le gène *C/EBP Homologous Protein* (*CHOP* ou *GADD153*) (Marten et al, 1994). Depuis, *CHOP* et *ASNS* sont les gènes dont la régulation transcriptionnelle par la carence en acides aminés a été la plus étudiée. Récemment, une étude transcriptomique a mis en évidence les différents gènes dépendants de GCN2 ou non, régulés lors d'une carence en acides aminés (Deval et al, 2009). Cependant, la connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'expression des gènes reste limitée et révèle des spécificités en fonction de la nature des gènes, de leurs implications dans les processus physiologiques et du type de carence en acides aminés (carence totale ou en un seul acide aminé indispensable) (Palii et al, 2009). Cette régulation de l'expression peut s'effectuer à trois niveaux: (1) traductionnel, (2) stabilisation du messager et (3) transcriptionnel. La régulation de la traduction par les acides aminés est un phénomène relativement bien décrit. Par contre peu de données existent sur la régulation de la stabilité des ARNm par les acides aminés. Enfin, concernant la régulation de la transcription, de nombreuses études ont permis de caractériser les mécanismes impliqués.

2.2. Voies de signalisation régulées par la carence en acides aminés

En plus de leur rôle de substrats pour la synthèse protéique, les acides aminés sont des médiateurs ou « molécules signal » agissant sur des kinases intracellulaires impliquées dans les régulations de voies métaboliques dont la phase d'initiation de la traduction des ARNm (Jefferson & Kimball, 2003). Le rôle signal des acides aminés a été principalement étudié avec la leucine (acide aminé à chaîne ramifiée). La signalisation induite par les acides aminés fait intervenir 2 voies principales impliquant respectivement les kinases mTOR et GCN2.

a) La voie m-TORC1

❖ Présentation de la voie

Chez les mammifères, mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), une enzyme de la famille des sérine/thréonine kinase a été bien décrite, et comme son nom l'indique est inhibée par la rapamycine. mTOR est capable de former des complexes avec d'autres protéines,

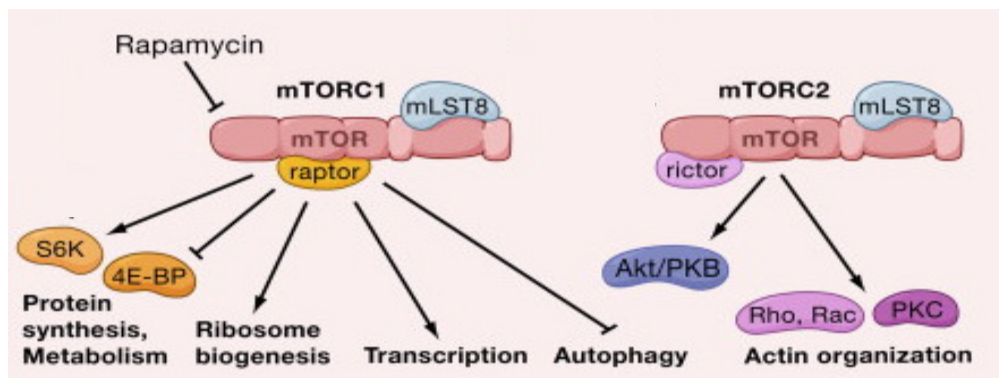


Figure 18: Rôles physiologiques et organisation des complexes mTORC1 et mTORC2 chez les mammifères. mTORC1 est impliqué dans la biogénèse des ribosomes, la transcription, l'activation de la S6K, et inhibe 4EBP et l'autophagie. mTORC1 peut être inhibé par la rapamycine. mTORC2 intervient dans l'organisation de l'actine et l'activation de la voie Akt/PKB (d'après Wullschleger *et al.*, 2006).

possédant des caractéristiques bien différentes: on parle du complexe mTORC1 quand mTOR s'associe avec raptor et du complexe mTORC2 quand elle s'associe à rictor (**Figure 18**). mTOR joue un rôle prédominant dans le contrôle de la croissance cellulaire en réponse à de multiples voies de signalisation, incluant l'insuline, les facteurs de croissance (comme l'IGF-1 et l'IGF-2), le statut énergétique et oxydoréducteur, ou encore la disponibilité des nutriments (Hung et al, 2012).

mTORC1 fonctionne comme l'intégrateur des signaux de disponibilité des nutriments, de l'énergie ou du potentiel redox et contrôle la synthèse protéique (Jewell & Guan, 2013). L'activité de ce complexe est stimulée par l'insuline, les facteurs de croissance, les acides aminés (en particulier la leucine) et le stress oxydatif (Kim et al, 2002 ; Roux et al, 2004; Sarbassov & Sabatini, 2005). L'activation de mTORC1 conduit à la phosphorylation de ses cibles S6K1 et 4EBP-1, ce qui va induire la régulation de la synthèse protéique, de la transcription, de la biosynthèse des ribosomes et à une inhibition de l'autophagie (mécanisme détaillé dans le chapitre III) et de régulations transcriptionnelles spécifiques. Récemment, un modèle d'activation de mTORC1 au niveau lysosomal *via* une cascade de détection d'acides aminés comportant les RAG GTPases et les V-ATPases (Regulator and vacuolar H(+)-ATPases) a été décrit (Jewell et al, 2013). D'autres études récentes ont mis en évidence le rôle de mTORC1 dans de divers processus cellulaires physiologiques et pathologiques via la régulation de l'expression de facteurs de transcription spécifiques, notamment STAT3, SREBPs, PPAR, HIF1 α , YY1-PGC1 α et TFEB (Laplane & Sabatini, 2013). De par toutes ces caractéristiques, certains inhibiteurs de mTOR sont actuellement utilisés dans la prévention du rejet de greffe après transplantation. Des essais thérapeutiques sont également en cours pour évaluer leur efficacité dans le traitement de certains cancers (Sun, 2013). La plus part de ces études se reposent sur l'utilisation des inhibiteurs de mTORC1, plus spécifiquement l'administration de la rapamycine.

De son côté, mTORC2 (mTOR Complex 2) est constitué de la protéine mTOR, de mLST8 et de rictor. Ce complexe est insensible à l'insuline, et intervient dans la régulation de la polymérisation de l'actine, ce qui joue un rôle clé dans la mobilité cellulaire (Cybulski & Hall, 2009). Ces dernières années, mTORC2 est devenue une cible d'étude suite à la découverte de son rôle clé dans la stabilité des protéines Akt et du coup son implication dans l'immunité (développement des lymphocytes B) et le développement tumoral (Lazorchak & Su, 2011; Wu et al, 2011).

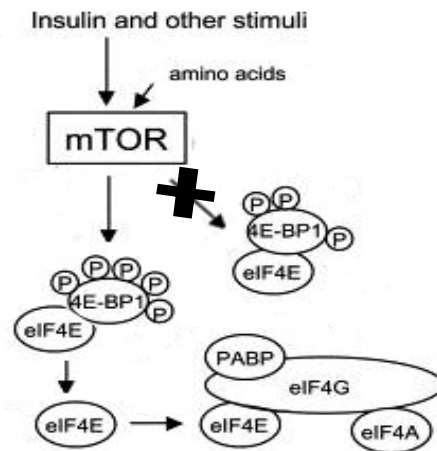


Figure 19: Régulation de la phosphorylation de 4EBP1 par mTORC1. L'activation de mTORC1 par les facteurs de croissance ou la supplémentation en acides aminés, induit la phosphorylation du facteur 4EBP1. Ceci provoque la levée de la séquestration de 4EBP1 par eIF4E et donc une stimulation de l'initiation de la traduction (d'après Proud C.G., 2004).

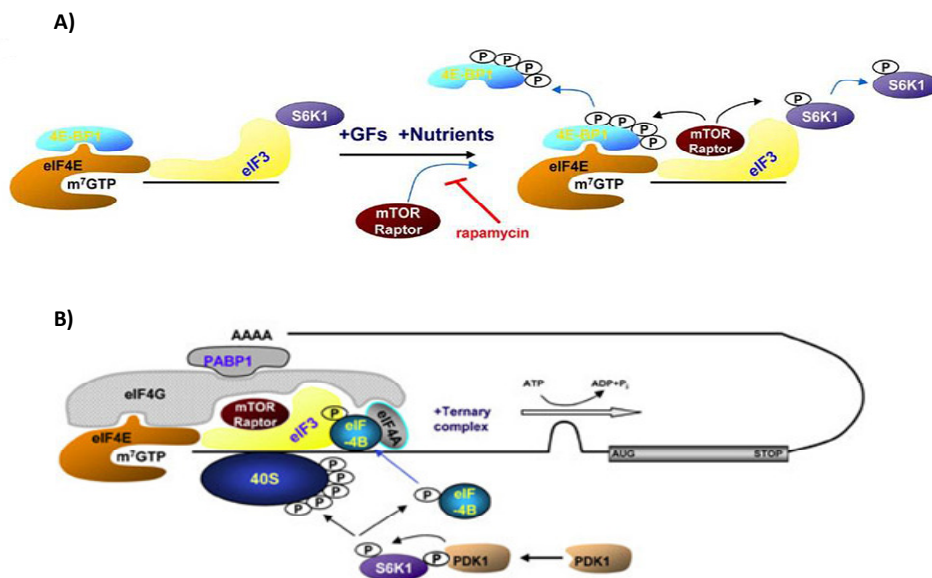


Figure 20: Régulation de la phosphorylation d'eIF4B et de la protéine ribosomale S6 par la voie mTORC1/S6K1. (A) L'activation de mTORC1 par les facteurs de croissance ou la supplémentation en acides aminés, induit son recrutement au niveau du complexe eIF3/S6K1. Cette activation provoque la phosphorylation par mTOR de 4EBP1 mais également de S6K1 et sa libération de eIF3. (B) Elle va alors être activée par la kinase PDK1. S6K1 va à son tour phosphoryler la protéine ribosomale S6 (au sein du 40S) mais également eIF4B afin de stimuler l'activité hélicase de eIF4A (extrait de Holz M.K. *et al.*, 2005).

❖ Rôle de 4EBP1 dans la régulation de la fixation du complexe 43S

Au cours de la régulation de la traduction, la disponibilité d'eIF4E pour son partenaire eIF4G est un point essentiel. Les protéines 4EBP1, -2 et -3 (eIF4E Binding Protein 1, -2 et -3) peuvent se lier à eIF4E et sont capables d'inhiber la traduction en inhibant de manière compétitive l'association entre eIF4E et eIF4G (Gingras et al, 1999). C'est le niveau de phosphorylation des 4EBP qui contrôle leur association à eIF4E: le facteur 4EBP1 hypophosphorylé interagit avec eIF4E, tandis que son hyperphosphorylation provoque sa dissociation d'eIF4E. Il a été montré que les acides aminés, et en particulier la leucine, étaient capables d'induire la phosphorylation de 4EBP1, et donc une stimulation de la synthèse protéique (Hara et al, 1998). L'utilisation de rapamycine provoque une diminution de la phosphorylation de 4EBP1, ce qui démontre l'implication de mTOR dans ces modifications (**Figure 19**).

❖ Régulation de l'expression de protéines ribosomales et de facteurs d'élongation

L'initiation de la traduction de certains ARNm codant pour des protéines ribosomales et de certains facteurs d'élongation est sous le contrôle de la protéine S6, elle-même régulée par la protéine kinase p70 S6K (et tout particulièrement l'isoforme S6K1) (**Figure 20**). L'activité enzymatique de S6K1 est régulée principalement par son degré de phosphorylation. On ne compte pas moins de douze sites de phosphorylation sur la protéine. Parmi ces sites, la phosphorylation des sites Thr229, Ser371 et Thr389 serait primordiale pour conférer à S6K1 une activation maximale (Shah et al, 2000). Lorsque S6K1 est activée, la protéine ribosomale S6 est phosphorylée, ce qui induit son activation. La protéine S6 est impliquée dans la traduction des TOP mRNA (Tract Of Pyrimidine), ARNm codant entre autre pour des protéines ribosomales et des facteurs d'élongation (Jefferies et al, 1997). Différentes études ont montré que mTOR était responsable de la phosphorylation des thréonines 229 et 389 de S6K1 (Burnett et al, 1998; Dennis et al, 1996). Ainsi, via mTOR, la disponibilité en acides aminés peut réguler le niveau de traduction des TOP mRNA, capitaux pour la régulation globale de la synthèse protéique (Meyuhas, 2000).

❖ Rôle de S6K1 dans la régulation du facteur d'élongation 2

Il a récemment été mis en évidence que la kinase eEF2K régulant le facteur d'élongation de la traduction eEF2 est aussi une cible de S6K1 (**Figure 21**). eEF2 est le facteur chargé de déplacer le ribosome de trois nucléotides sur l'ARNm après l'ajout de chaque acide aminé dans la séquence protéique néo-synthétisée. L'activation de mTOR (par exemple par une supplémentation en acides aminés) provoque la phosphorylation d'eEF2K (Browne & Proud,

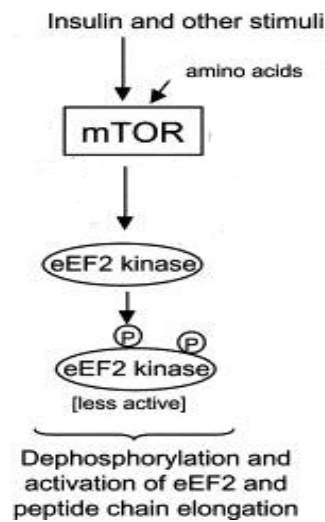


Figure 21: Régulation du facteur d'élongation eEF2 par mTORC1. L'activation de mTORC1 par les facteurs de croissance ou la supplémentation en acides aminés, induit la phosphorylation d'eEF2K. Cette phosphorylation inhibe l'activité kinase de cette dernière et provoque une hypo-phosphorylation de son substrat eEF2 et donc une stimulation de l'élongation (d'après Proud C.G., 2004).

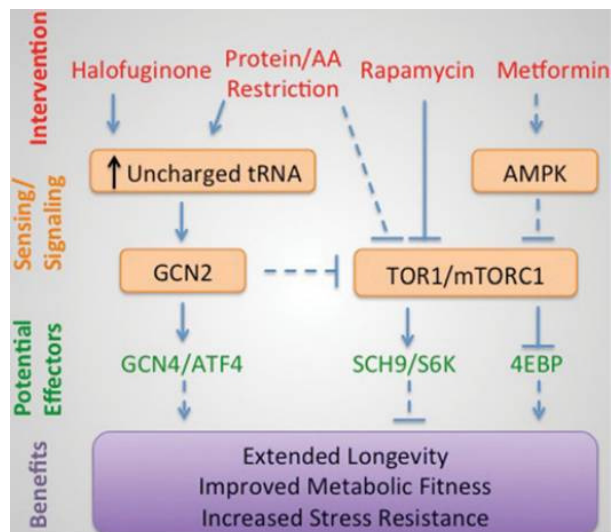


Figure 22: Modèle des voies de détection de la disponibilité en acides aminés impliquant les voies de signalisation mettant en jeu les kinases GCN2 et mTORC1 notamment lors d'une restriction alimentaire (d'après Gallinetti J. *et al*, 2013).

2004), ce qui entraîne son inhibition. eEF2 est alors activée et l'élongation est accélérée. A l'inverse, une carence en acides aminés inhibe mTOR et donc également S6K1. La kinase eEF2K n'étant pas phosphorylée, elle sera active et pourra phosphoryler le facteur d'élongation eEF2. eEF2 phosphorylé ne pouvant se fixer au ribosome (Carlberg et al, 1990), son activité est donc inhibée, réduisant la vitesse d'élongation ce qui permet à la cellule d'économiser les stocks d'acides aminés libres.

b) La voie GCN2/ eIF2 α / ATF4

Comme décrit précédemment chez les eucaryotes (voir chapitre I), la voie de signalisation impliquant la protéine kinase GCN2 (General Control Nonrepressed 2) a été bien décrite comme un système de détection des déficits en acides aminés (Deval et al, 2008; Kimball, 2001). Chez les mammifères comme chez la levure, la protéine kinase GCN2 est activée par l'accumulation d'ARN de transfert (ARNt) non chargés induite par une carence en acides aminés. Ainsi, lorsque GCN2 est lié à l'ARNt non chargés, le domaine kinase adjacent est activé par autophosphorylation et eIF2 α est phosphorylé. GCN2 est impliquée à la fois dans la régulation de la traduction et de la transcription en réponse à une carence en acides aminés.

Chez la levure, des études ont décrit une interaction croisée avec la cascade signalétique TOR et l'activation de GCN2. En effet, chez *S. cerevisiae*, la rapamycine active GCN2 même en l'absence d'ARNt non chargés. Contrairement à une carence en acides aminés, la rapamycine n'induit pas l'accumulation des ARNt non chargés pour activer GCN2. Cette activation passe par l'augmentation de l'affinité de GCN2 en déphosphorylant sa sérine 577 (Cherkasova & Hinnebusch, 2003). Cependant chez les mammifères, l'interaction entre les voies de signalisation impliquant la kinase GCN2 et celle impliquant mTOR reste encore à démontrer (Gallinetti et al, 2013; Watanabe et al, 2007) (**Figure 22**).

c) La voie G α 12/ JNK/ATF2

Récemment, une autre voie de signalisation répondant à la carence en acides aminés a été décrite chez les mammifères (Chaveroux et al, 2009). Cette voie met en jeu un module MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) indépendant de GCN2 et de mTORC1, composé d'une cascade de kinases, MEKK1>MKK7>JNK2 (c-Jun NH₂-terminal Kinase 2) contrôlant la phosphorylation d'ATF2 sur les résidus thréonine 69 et 71. Cette cascade de signalisation est régulée en amont par deux GTPases Cdc42 (Cell Division Cycle 42) et Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) et par la protéine G membranaire G α 12. Cette voie de signalisation

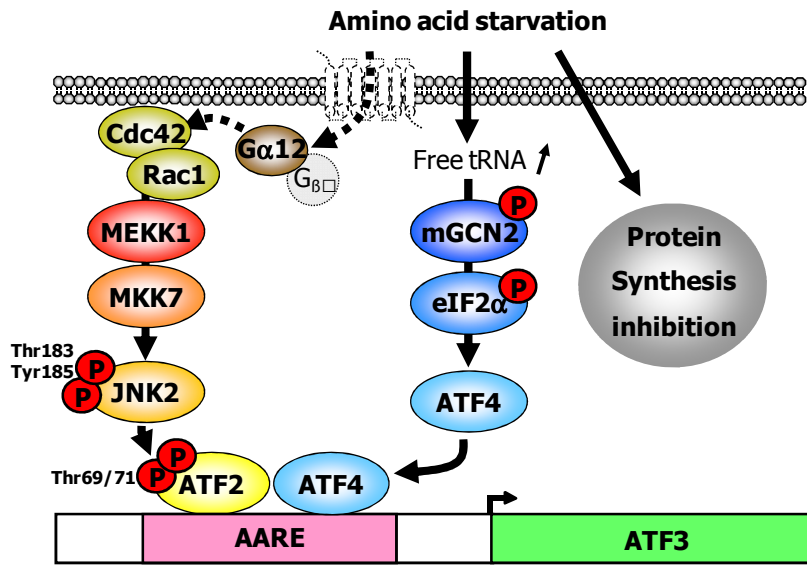


Figure 23: Modèle de régulation de la transcription dépendante de l'AARE par la carence en acides aminés chez les mammifères. La carence en acides aminés provoque une inhibition de la synthèse protéique et l'accumulation d'ARNt libres au sein de la cellule. Cette dernière va induire la voie mGCN2/ATF4 et entraîner la fixation d'ATF4 à l'AARE de certains gènes spécifiques. En parallèle, cette même carence va induire la voie de signalisation G12>Rac1+Cdc42>MEKK1>MKK7>JNK2 et induire la double phosphorylation d'ATF2. Ces deux voies de signalisation vont permettre l'induction du gène ATF3 en réponse à la carence en acides aminés (d'après Chaveroux C. *et al.* 2009).

pourrait participer à l'ouverture de la chromatine *via* le recrutement par P-ATF2 d'une histone acétylase HAT et ainsi précocement participer avec ATF4 à l'induction des gènes comme celui de *CHOP* en réponse à une carence en acides aminés (**Figure 23**).

3. Mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'expression des gènes par la voie eIF2 α / ATF4

L'augmentation du niveau d'expression d'un ARNm en réponse à une carence en acides aminés peut s'expliquer soit par l'augmentation de sa transcription, soit par l'augmentation de sa stabilité (demi-vie de l'ARNm).

3.1. Mécanismes de stabilisation des ARNm

Chez les mammifères, la régulation de la stabilité d'un ARNm nécessite la présence de séquences régulatrices et le recrutement de facteurs protéiques principalement au niveau des régions 3' non-traduites (3'UTR : 3' UnTranslated Region) de l'ARNm. En réponse à une carence en acides aminés, il a été mis en évidence que l'augmentation de la quantité d'ARNm des gènes *p21* et *p27* (cyclin-dependent kinase inhibitors, CdkIs) (Leung-Pineda et al, 2004), *CAT-1* (calcium transport protein 1), *CHOP* et *ASNS* impliquait la stabilité de leurs ARNm (Bruhat et al, 1997b ; Gong et al, 1991 ; Yaman et al, 2002).

❖ Exemple de la régulation de la stabilité du messager : CAT-1

- Présentation de la protéine CAT-1

CAT-1 est un transporteur d'acides aminés Na⁺-indépendant. Il transporte de manière pH-indépendante la lysine, l'arginine et l'ornithine. En 1997, il a été montré que le niveau d'expression de la protéine CAT-1 ainsi que le transport de l'arginine sont induits par une carence en acides aminés (Hyatt et al, 1997). L'augmentation de l'expression de CAT-1 fait intervenir à la fois la régulation de sa traduction, de sa transcription et de la stabilité de son messager.

- Régulation de la stabilité de son messager

La stabilité de l'ARNm de CAT-1 est le premier mécanisme à avoir été mis en évidence dans la régulation son expression par la carence en un acide aminé (Aulak et al, 1999). La stabilité d'un ARNm dépend principalement de sa queue polyA et de sa région 3'UTR. Dans le cas de CAT-1, une séquence AU-Rich Element (ARE) particulière de 11 nucléotides a été identifiée dans la partie 3'UTR de son ARNm (Aulak et al, 1996). Cet ARE a été identifié comme responsable de la stabilisation de l'ARNm au cours d'une carence en acides aminés (Yaman et al, 2002), d'où son appellation de "Nutrient Sensor ARE" (NS-ARE). Yaman *et al.*

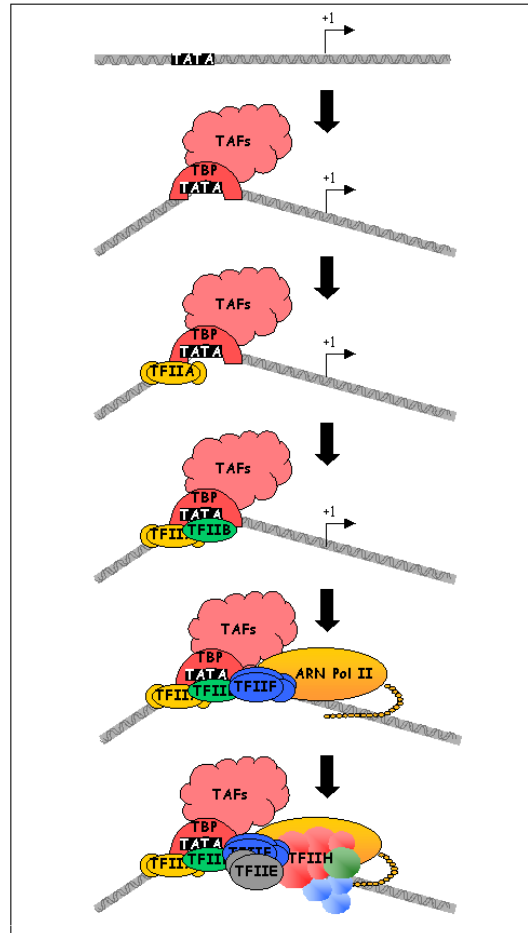


Figure 24: Schéma général de l'initiation de la transcription chez les mammifères. L'initiation de la transcription nécessite le recrutement séquentiel des facteurs généraux au niveau d'un motif particulier : la TATA box. Les protéines impliquées dans ce processus sont TFIIA, B, D, E, F H et l'ARN polymérase II. TBP : TATA box-Binding Protein.

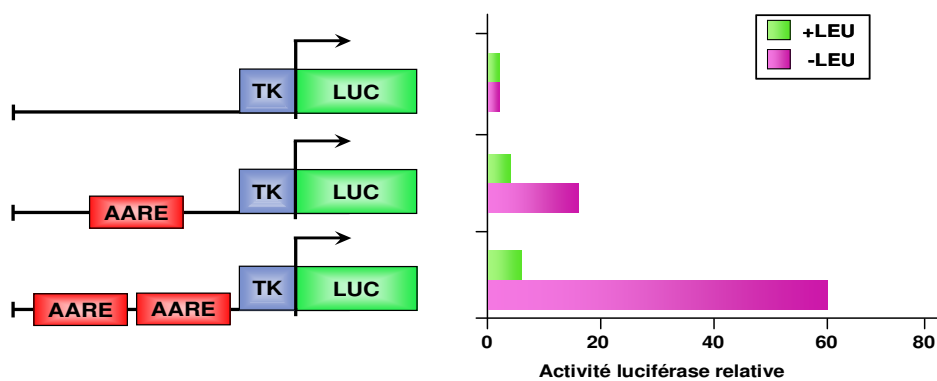


Figure 25: La séquence CARE est un élément de réponse aux acides aminés (AARE). La séquence CARE (site C/EBP/ATF) a été clonée en une ou deux copies en amont d'un promoteur minimum TK et du gène rapporteur *luciférase*. Ces constructions ont été transfectées transitoirement dans des cellules Hela qui ont été cultivées dans un milieu contrôlé (+LEU) ou carencé en leucine (-LEU) pendant 16h. La cotransfection d'un plasmide pCMV β -gal a permis de normaliser les résultats (d'après Bruhat *et al.*, 2000).

ont aussi démontré que la protéine HuR avait la capacité de se fixer au NS-ARE durant des conditions de stress tels une irradiation aux UV ou une carence en acides aminés. Il a également été montré qu'au cours de la diminution de la concentration en acides aminés, la protéine HuR était transloquée dans le cytoplasme et qu'elle pourrait être responsable de l'augmentation de la stabilité de l'ARNm de CAT-1 au cours de ce stress.

3.2.Mécanismes de régulation de la transcription

Schématiquement, la transcription des gènes codant pour des protéines est catalysée par l'ARN polymérase II (pol II) et une série de facteurs généraux de transcription (TFIIA, B, D, E, F et H) (**Figure 24**). A la transcription basale, s'ajoute une régulation positive ou négative de la transcription, contrôlée par des activateurs et des répresseurs transcriptionnels. Ces derniers répondent à des stimuli externes, interagissent avec les acteurs de la machinerie transcriptionnelle, ainsi qu'avec des séquences spécifiques de la séquence promotrice des gènes. Les mécanismes mis en jeu permettent ainsi de réguler de manière très précise et spécifique la transcription de chaque gène, en fonction du tissu considéré et de son environnement.

a) Une séquence d'ADN *cis* indispensable à la régulation transcriptionnelle lors d'une carence en acides aminés : l'AARE

A la fin des années 1990, les mécanismes par lesquels une carence nutritionnelle en acide aminé conduit à la surexpression d'un gène (alors que le niveau général de la transcription est réduit) n'étaient que très peu connus et très peu étudiés. Des études menées sur les promoteurs des gènes *CHOP* et *ASNS* ont permis de mettre en évidence un élément de régulation indispensable à l'induction de ces gènes par la carence en acides aminés et qui a été appelée AARE (Amino Acid Response Element).

❖ AARE de CHOP

CHOP est le gène le plus inductible en réponse à une carence en acides aminés identifié (Marten et al, 1994). En utilisant la régulation de ce gène par une carence en leucine comme modèle, notre équipe avait identifié dans le promoteur de ce gène, un élément de réponse aux acides aminés (Bruhat et al, 2000; Bruhat et al, 1997a).

Le clonage de la région promotrice de ce gène (900pb en amont du site d'initiation de la transcription) confère une inductibilité à un gène rapporteur comme la luciférase en réponse à une carence en n'importe quel acide aminé indispensable (**Figure 25**). Des expériences de délétion du promoteur de *CHOP* ont permis d'identifier une séquence de 33 nucléotides dont

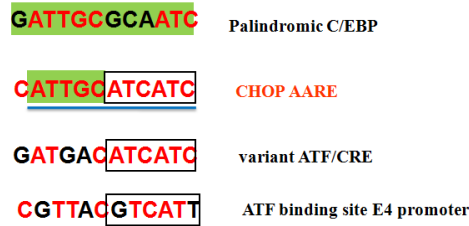


Figure 26: Identification de la séquence AARE de CHOP. La séquence AARE de CHOP présente des similitudes avec la moitié de celle du palindrome C/EBP β et l'autre moitié de la séquence variante du consensus d'ATF4/CRE.

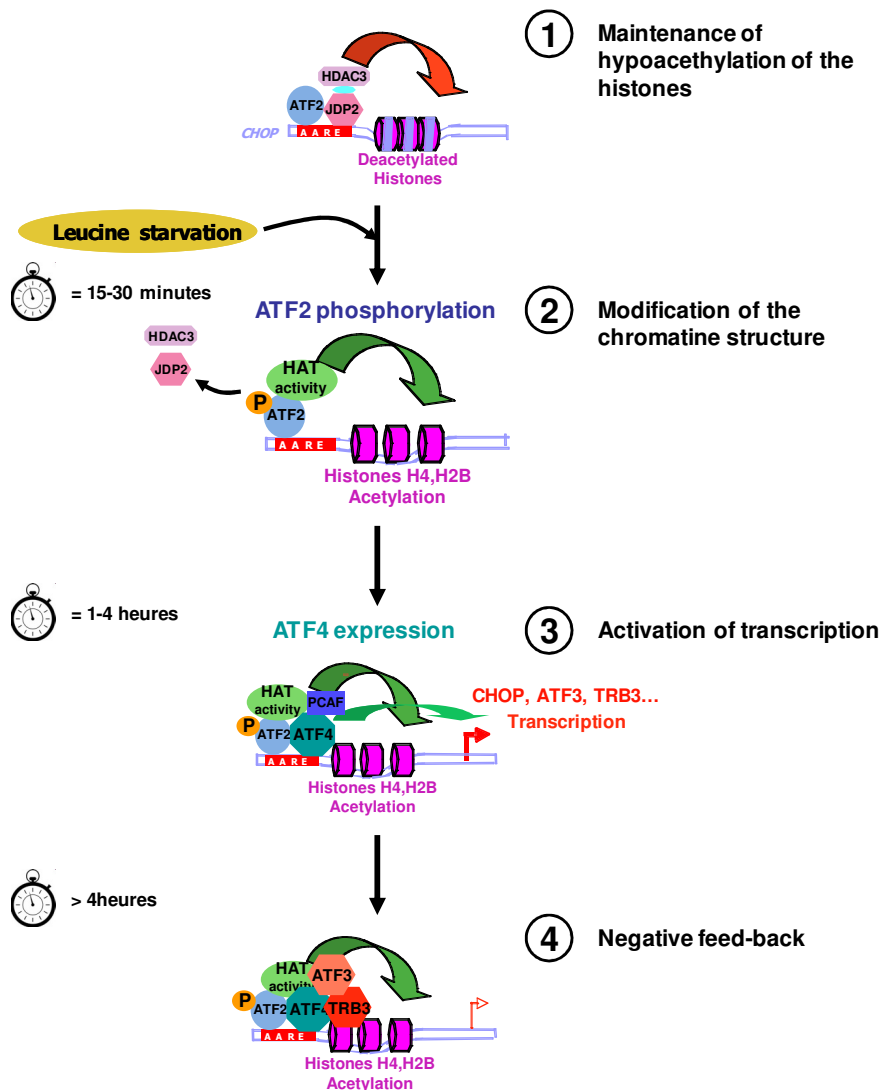


Figure 27: Cinétique d'événements de fixation des protéines régulatrices sur l'AARE de CHOP au cours d'une carence en acides aminés (AA). (1) A l'état basal, les protéines ATF2 et JDP2 sont constitutivement fixées à l'AARE. JDP2 recrute une activité HDAC3 réprimant le gène. (2) Entre 0 et 30 minutes de carence en AA, ATF2 est phosphorylé sur la Thr71. Cette phosphorylation participe au recrutement d'une activité HAT qui va acétyler les histones H2B et H4. JDP2 et l'AHDC3 sont relargués de l'AARE. (3) Entre 1 et 4 heures, l'augmentation de l'expression d'ATF4 et sa fixation à l'AARE permettent le recrutement de PCAF. L'ensemble de ces facteurs participe à l'induction des gènes cible de la carence en AA. (4) Enfin, les protéines ATF3 et TRB3 vont lier l'AARE et réprimer la transcription AARE-dépendante, constituant ainsi une boucle de régulation négative (d'après Bruhat A. *et al*, 2009).

l'absence inhibe la réponse à la carence en leucine. L'analyse de cette séquence a permis d'identifier un site mixte C/EBP-ATF ou CARE (5'-ATTGCATCA-3') localisé entre -313 et -295 du site d'initiation de la transcription. En effet, la moitié de cette séquence s'aligne parfaitement avec la moitié de celle du palindrome C/EBP β (3'-ATTGC-5') et l'autre moitié correspond à une séquence variante de celle d'ATF/CRE (3'-ATCATC-5') (**Figure 26**). Cette séquence CARE qui a été appelée aussi AARE est nécessaire et suffisante à la régulation de CHOP par une carence en un acide aminé indispensable et peut agir indépendamment de son orientation. Une mutation dans cette séquence suffit pour perdre l'induction d'un gène rapporteur en réponse à la carence en leucine (Bruhat et al, 2000) (**Figure 27**).

❖ AARE d'ASNS

Le laboratoire de M.S. Kilberg a aussi identifié une séquence similaire dans le promoteur d'ASNS (entre -68 et -60). Cette séquence fut alors désignée par l'acronyme NSRE-1 (Nutrient Sensing Response Element-1) (5'-GTTTCATCA-3'). Cet élément est impliqué dans l'induction d'ASNS par une carence en acides aminés indispensables mais aussi en glucose ou lors de stress du réticulum endoplasmique (Barbosa-Tessmann et al, 2000). Un second NSRE a été localisé dans ce même promoteur sous le nom de NSRE-2 (entre -48 et -43 : 5'-GTTACA-3'). La combinaison de ces deux éléments de réponse (NSRE-1+NSRE-2) fut nommée NSRU (Nutrient Sensing Response Unit) (Zhong et al, 2003). De la même manière que l'AARE de CHOP, le NSRU est capable de conférer à un gène rapporteur une inductibilité par la carence en leucine (**Figure 28**). De plus, outre la séquence du NSRU, la distance entre les deux NSRE joue également un rôle crucial dans la réponse à la carence en acides aminés. Cette distance correspond à 12 paires de base, soit un tour d'hélice d'ADN. Ce résultat suggère que l'agencement de ces deux éléments de réponse facilite l'interaction entre les facteurs de transcription et ces NSRE.

❖ *Séquence consensus*

Par la suite, des séquences fonctionnelles identiques ont été identifiées dans les promoteurs d'autres gènes régulés par les acides aminés : le transporteur d'acides aminés « Système A » (SNAT2) (Bain et al, 2002), la pseudokinase TRB3 (Tribble 3) (Carraro et al, 2010), ou encore le facteur de transcription ATF3 (Pan et al, 2007). Par ailleurs, une étude par mutagenèse dirigée contre les 9 bases de la séquence AARE de CHOP a permis de définir la séquence minimale (séquence core) nécessaire à sa régulation par les acides aminés (5'-^R/_CTT^R/_T-CRTCA-3' avec R= G or A) (Bruhat et al, 2002).

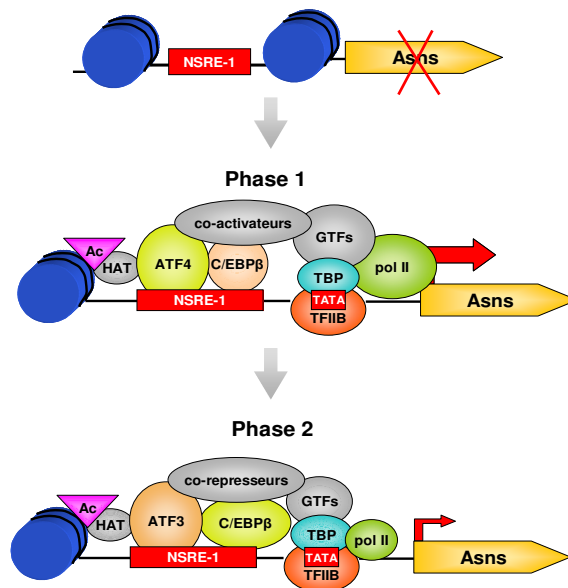


Figure 28: Représentation schématique de la régulation du gène *ASNS* par les acides aminés. La transcription d'*ASNS* croît entre 1 à 4H après la carence (phase 1). Puis la transcription diminue entre 4 et 24H suivant la carence, tout en restant forte par rapport aux conditions contrôles (phase 2). Les composants non identifiés sont représentés en gris. (d'après Richards & Kilberg, 2006)

	<i>AARE core</i>
<i>TRB3</i> (-7131/-7099) (-7098 /-7066) (-7066 /-7034)	CGGTTTGCATCACCCG
<i>CHOP</i> (-313/-295)	AACATTGCATCATCCC
<i>SNAT2</i> (+709/+724)	GATATTGCATCAGTTT
<i>ASNS</i> (-72/-57)	GAAGTTTCATCATGCC
<i>ATF3</i> (-12/-27)	AGCGTTGCATCACCCG
<i>consensus</i>	R ₁ TT ₂ G ₃ CATCA

Figure 29: Comparaison des séquences *cis* AARE impliquées dans la régulation de la transcription des gènes *TRB3*, *CHOP*, *SNAT2*, *ASNS* et *ATF3* par la carence en acides aminés. (avec R= G or A)

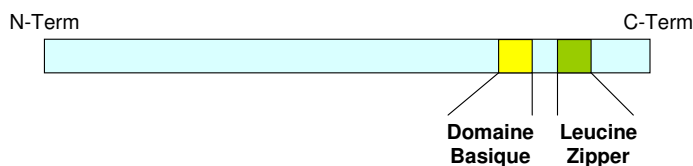


Figure 30: Structure générale des facteurs de transcription de la famille b-ZIP.

L'ensemble de ces données ont permis d'établir un consensus de la séquence AARE bien conservé entre les différents gènes régulés par la carence en acides aminés ($5' \text{-}^R\text{/}_T\text{TT}^G\text{/}_T\text{-CATCA-3'}$ avec R= G or A) (**Figure 29**).

b) Facteurs de transcription interagissant avec la séquence AARE

L'identification des éléments cis indispensable à la régulation transcriptionnelle lors d'une carence en acides aminés (AARE) décrits précédemment, suggère que les facteurs de transcription des deux familles ATF/CREB et C/EBP peuvent se fixer au niveau de cette séquence. Cependant, leur fixation à l'AARE de la séquence promotrice n'est pas toujours corrélée avec leurs implications dans la régulation de ces gènes lors de la carence en acides aminés. Ces deux familles de facteurs de transcription appartiennent à la superfamille b-ZIP qui possèdent un motif de type "basic-leucine zipper" dans leur région COOH-terminale. Ces facteurs sont actifs sous forme d'homo- ou d'hétéro-dimères avec d'autres facteurs de la même famille. Les dimères protéiques ainsi formés possèdent deux régions importantes. La première, située à la base du dimère, est constituée de deux hélices alpha se trouvant face à face et qui sont riches en leucine. C'est le domaine « Leucine-zipper », interagissant par des liaisons hydrophobes, qui est responsable de la dimérisation des protéines. La seconde région est riche en charges positives (domaine basique) et permet au dimère de se fixer sur les groupes phosphates de l'ADN. (**Figure 30**).

❖ *Les facteurs de transcription ATF/CREB qui se fixent à l'AARE*

La famille ATF/CREB (Activating Transcription Factor/cAMP Responsive Element Binding protein) a été caractérisée dans la fin des années 1980 (Montminy & Bilezikjian, 1987). Les facteurs de transcription de cette famille se fixent à l'ADN sur un site consensus dont la séquence est $5'\text{-TGACGT(C/A)(G/A)-3'}$ (Deutsch et al, 1988; Lin & Green, 1988). On compte aujourd'hui environ une vingtaine de protéines identifiées faisant partie de cette famille de facteurs de transcription (**Tableau 4**). La forte hétérogénéité des protéines formant cette famille fait que les facteurs de transcription ATF/CREB interviennent dans de très nombreux processus, incluant la morphogenèse, la survie cellulaire, l'apoptose ou encore la réponse à de multiples stress (Persengiev & Green, 2003). Au sein de cette famille de facteurs de transcription, seuls ATF4 et ATF2 sont indispensables à la régulation dépendante de l'AARE de l'expression de CHOP en réponse à une carence en acides aminés (Averous et al, 2004).

Sous-groupe	Membres	Variants d'épissage	Noms alternatifs
CREB	CREB		ATF-47
	CREM		
	ATF1		TREB36, TCRATF1, ATF43
CRE-BP1	CRE-BP1	CRE-BP1	ATF2, HB16, TREB7, TCR-ATF2
		CRE-BP2	mXBP
		CRE-BP3	
	ATFa	ATFa	ATF7
		ATFa Δ	
		ATFa3	
		ATFa0	
	CRE-BPa	CRE-BPa α	
		CRE-BPa β	
		CRE-BPa γ	
		CRE-BPa δ	
ATF3	ATF3	ATF3	LRF-1, LRG-21, CRG-5, TI-241
		ATF3 Δ Zip	
	JDP-2		
ATF4	ATF4	ATF4	CREB2, TAXREB67, mATF4, C/ATF, mTR67
	ATFx	ATFx	
ATF6	ATF6	ATF6	
	CREB-RP	CREB-RP	G13
B-ATP	B-ATF		
	JDP1	JDP1	

Tableau 4: Tableau récapitulatif des facteurs de transcription appartenant à la famille ATF/CREB. (d'après Hai *et al.*, 1999)

ATF4: le « master » régulateur

ATF4 est un facteur de transcription membre de la famille b-Zip, préférentiellement traduit lors de la phosphorylation d'eIF2 α (mécanisme décrit dans le chapitre I). Son expression est contrôlée à la fois au niveau transcriptionnel et traductionnel et son activité fonctionnelle met en jeu des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation (Ampofo et al, 2013).

- Interaction avec d'autres facteurs:

ATF4 est actif uniquement sous forme d'hétérodimère avec plusieurs partenaires comme les facteurs appartenant aux familles Jun, Fos et C/EBP (C/EBP β et CHOP), les facteurs bZIP, NRF2, ATF3, et des protéines de la machinerie transcriptionnelle comme la sous-unité RPB3 de la RNA Polymérase II ou encore avec des kinases telles que la Zip-Kinase (Ameri & Harris, 2008; De Angelis et al, 2003 ; Kawai et al, 1998). Cherasse *et al.* ont identifié une nouvelle protéine partenaire d'ATF4 impliquée dans la régulation de *CHOP*: la protéine PCAF qui est une protéine ubiquitaire de 90kDa, très fortement homologue à la protéine de levure GCN5. Elle possède par ailleurs un domaine histone acétyltransférase (HAT), capable de moduler la structure chromatinienne et de réguler l'expression de plusieurs gènes. Cette protéine est également connue pour interagir avec les facteurs P300 et CBP, eux-mêmes capables de former des complexes, respectivement avec ATF4 et ATF2. L'interaction de PCAF avec ATF4 pourrait ainsi participer à l'ouverture de la chromatine permettant l'activation de la transcription de *CHOP* lors d'une carence en acides aminés.

- Rôle fonctionnel:

Le facteur de transcription ATF4 a été décrit comme étant impliqué dans l'activation et la répression d'un grand nombre des gènes impliqués dans le métabolisme, le transport et l'hémostasie des acides aminés, l'homéostasie redox, la signalisation et la mort cellulaire (Ameri & Harris, 2007; Han et al, 2013). Ce facteur a un rôle majeur dans la réponse à une carence en acides aminés. En effet, les analyses de puces à ADN réalisées sur des cellules ATF4 $^{+/+}$ et $^{-/-}$ ont révélé que plus de 80% de gènes induits par ce stimulus sont dépendants de la présence de ce facteur (Jousse et al, 2007). L'activité transactivatrice d'ATF4 en réponse à la carence en acides aminés est associée à une forte hausse de sa traduction (mécanisme décrit en chapitre I) (Siu et al, 2002). Compte tenu de cette diversité de fonction, les cellules dépourvues d'ATF4 ont besoin d'un supplément d'acides aminés et sont également hypersensibles au stress oxydatif. Des travaux menés dans notre laboratoire dans des cellules invalidées pour l'expression d'ATF4 (ATF4 $^{-/-}$) ont montré qu'environ 60% des gènes répondant à la carence en acides aminés sont dépendants de ce facteur de transcription, démontrant définitivement son importance dans ce

contexte (résultats non publiés). Récemment, la fixation du facteur de transcription ATF4 sur l'AARE de TRB3 dans le foie de souris nourries avec un régime carencé en leucine a été mise en évidence (Carraro et al, 2010). Néanmoins, les cofacteurs d'ATF4 ou les autres facteurs pouvant réguler l'expression de TRB3 dans le foie de souris, restent à déterminer.

Le KO d'ATF4 a été réalisé chez la souris. Les souris ATF4 -/- présentent de sévères problèmes de viabilité, de développement, de formation de la masse osseuse, et de métabolisme (Sowa & Karsenty, 2007). D'autre part, en absence d'ATF4 les souris ont un métabolisme énergétique augmenté, elles sont maigres et hypoglycémiques indiquant que ATF4 joue un rôle important dans le métabolisme des lipides chez les mammifères. En outre, l'absence d'ATF4 augmente la mise en place du diabète, de l'hyperlipidémie et de la stéatose hépatique (Chen et al, 2012; Wang et al, 2013).

ATF2

- Structure et phosphorylation:

ATF2 (ou CRE-BP1) est également un facteur de transcription appartenant à la superfamille des ATF/CREB. Il a été cloné à partir d'une banque d'ADNc de cerveau humain pour sa capacité à lier des éléments CRE, des séquences palindromiques de 8 paires de bases « TGACGTCA », éléments de réponse crucial dans les cascades moléculaires impliquant l'AMPc (Maekawa et al, 1989; Nomura et al, 1993). Le gène codant pour ATF2 est localisé sur le chromosome humain 2q32, et produit une protéine de 505 acides aminés (54KDa) (Bhoumik et al, 2005; Vlahopoulos et al, 2008). Son expression est ubiquiste avec une forte expression au niveau cérébral (Takeda et al, 1991). Il existe de nombreuses isoformes d'ATF2 issues d'épissages alternatifs ou de l'expression de promoteurs alternatifs. Plusieurs de ces isoformes partagent les mêmes domaines DNA binding ou de dimérisation, coté C-terminal, mais différent par le coté N-terminal (Georgopoulos et al, 1992; Kara et al, 1990). La forme issue d'un épissage alternatif d'ATF2 la plus décrite est ATF2-small (ATF2-sm). Ceci produit une protéine de 28 KDa, possédant une activité transactivatrice et régulant de nombreux gènes notamment au niveau des cellules du myomètre. En revanche, la fonction de ce variant d'ATF2 reste pas très bien connue (Bailey & Europe-Finner, 2005; Bailey et al, 2002). ATF2 est essentiellement régulée par des modifications post-traductionnelles. Ainsi en condition non stimulé, une interaction moléculaire entre le domaine bZIP et le domaine d'activation (acides aminés 1 à 112) inhibe l'activité transcriptionnelle d'ATF2. En revanche, lors de divers stress cellulaires, la phosphorylation des thréonines 69 et 71 (ATF2 humain) vont rompre cette interaction conférant à ATF2 une activité transcriptionnelle (Chaveroux et al, 2009; Li & Green, 1996).

- Interaction avec d'autres facteurs:

Pour acquérir une activité maximale, ce facteur doit s'associer avec d'autres facteurs de la famille des ATF/CREB (comme ATF1, JDP2 ou CREB) ou de la famille des AP-1(c-Jun, Fos, Fra2). Le choix du partenaire liant ATF2 va conditionner son activité transcriptionnelle (Bhoumik et al, 2005). Dans le cadre de la régulation de la transcription de *CHOP* lors d'une carence en acides aminés, le rôle d'ATF2 et sa fixation ainsi que celle d'*ATF4* sur la séquence promotrice de *CHOP* ont été étudiés (Averous et al, 2004 ; Bruhat et al, 2000 ; Chaveroux et al, 2009). Il a été montré que (i) dans des cellules invalidées pour l'expression d'ATF2, l'induction de la transcription de *CHOP* par la carence en acides aminés est complètement perdue, (ii) ATF2 se lie à l'AARE de *CHOP* dans les deux conditions basale et carencée en acides aminés, (iii) la phosphorylation d'ATF2 est nécessaire pour l'activation de la transcription AARE dépendante de *CHOP*. ATF2 peut aussi interagir avec JDP2 (dimérisation des protéines jun 2) qui est une protéine bZIP et qui est décrite comme réprimant la transcription d'ATF2 *via* le recrutement d'une activité histone déacétylase (HDAC3) sur le promoteur des gènes cibles (Jin et al, 2002). Notre laboratoire a montré que JDP2 peut lier l'AARE de *CHOP* en condition basale, contribuant à une inhibition constitutive de ce gène. Lors d'une carence en acides aminés, cette liaison est rompue et JDP2 est libéré, levant ainsi la répression (Cherasse et al, 2008). Jin et al. ont démontré que JDP2 régule l'expression des gènes *via* le contrôle direct de la modification des histones et l'assemblage de la chromatine (Jin et al, 2006).

- Rôle fonctionnel:

Les souris Knock In (mutations ponctuelles sur un gène) pour les sites de phosphorylation d'ATF2 (Breitwieser et al, 2007) présentent une létalité embryonnaire causée par des défauts de développement cardiaque et hépatique. Ces phénotypes sont concordants avec ceux observés chez les animaux présentant une délétion du DBD d'ATF2, montrant l'importance cruciale de la phosphorylation de ces sites pour l'activité biologique d'ATF2 (Maekawa et al, 1999 ; Reimold et al, 1996).

ATF2 est un facteur capable de recruter une activité HAT après stimulation. Le groupe de KK.Yokoyama a démontré une activité intrinsèque HAT d'ATF2. Cette activité est localisée au niveau du domaine riche en proline et nécessite la phosphorylation des résidus 69 et 71 en réponse aux UV (Kawasaki et al, 2000). D'autres groupes ont montré le recrutement de complexe HAT de type p300 HAT et TIP60 après stimulation. Ainsi, ATF2, *via* son domaine b-ZIP, peut interagir directement avec p300 HAT. Cette interaction conduit à une acétylation d'ATF2 sur les lysines 357 et 374. Egalement, ATF2 interagit avec TIP60, une histone acétyltransférase. Après irradiation, l'association ATF2-TIP60 est moins forte. Il en résulte une

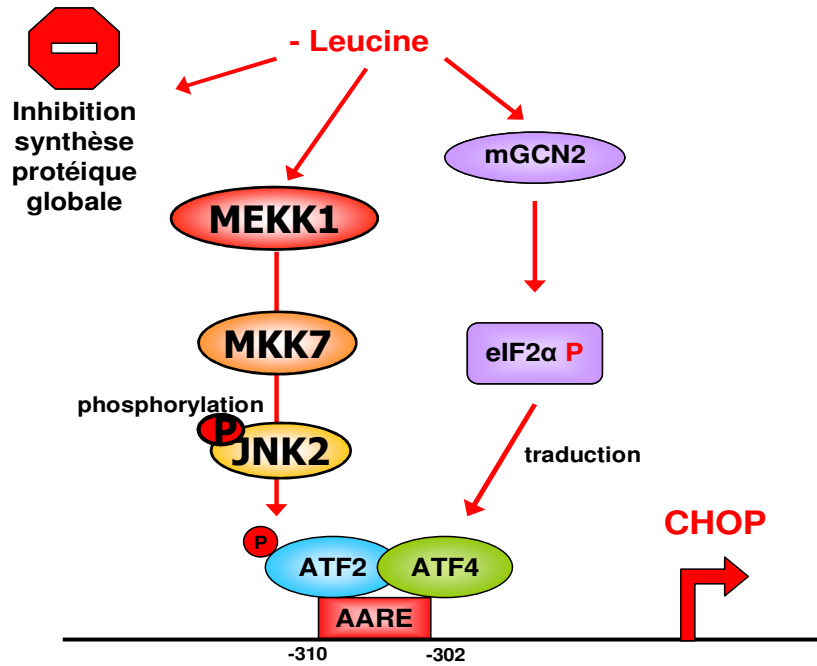


Figure 31: Les facteurs de transcription ATF2 et ATF4 régulent la transcription de *CHOP* lors d'une carence en leucine. Au cours d'une carence en leucine, la kinase mGCN2 va phosphoryler la sous unité α d'eIF2 et par conséquent induire la traduction d'ATF4. Par ailleurs, ATF2 est phosphorylé par une kinase suite à la carence. Lorsqu'ATF2 est phosphorylé et ATF4 fixé sur l'AARE, la transcription de *CHOP* peut commencer.

stabilisation de l'HAT ainsi qu'une hausse de son activité (Bhoumik et al, 2008 ; Karanam et al, 2007). Le rôle d'ATF2 dans l'acétylation des histones H4 a été étendu à ATF3, un autre gène régulé par la disponibilité en acides aminés (Lee et al, 2010). Ainsi, ATF2 semble être impliqué dans le processus de modification de la structure de la chromatine pour améliorer la transcription de CHOP et d'ATF3 en réponse à une carence en acides aminés.

❖ *Facteur de transcription de la famille des C/EBP qui se fixe à l'AARE*

En plus des facteurs ATF/CREB, les facteurs de transcription de la famille C/EBP peuvent se fixer sur la séquence AARE au niveau des promoteurs des gènes régulés par la carence en acides aminés. Cependant, dans certains cas la fixation de ces facteurs au niveau de l'AARE n'implique pas un rôle régulateur de l'expression tel que c'est le cas pour la fixation du facteur C/EBP β sur l'AARE de CHOP.

Le facteur de transcription CHOP

Le gène CHOP a été utilisé dans notre laboratoire comme modèle d'étude des gènes régulés par la carence en acides aminés. Néanmoins, il s'avère que CHOP est aussi un facteur de transcription, membre de la famille C/EBP (CCAAT / enhancer-binding protein) et qui peut potentiellement se fixer au niveau de la séquence AARE promotrice (Guerrini et al, 1993). L'expression du gène CHOP est fortement induite par divers stress cellulaire tels que le stress ER, les dommages de l'ADN (Cudna & Dickson, 2006), mais également par la carence en acides aminés (Averous et al, 2004).

Interaction avec d'autres facteurs:

Il est maintenant établi que dans les cellules carencées en acides aminés, un complexe ADN-protéines comprenant les séquences AARE, CHOP et un nombre de protéines régulatrices telles que ATF4, ATF2, et JDP2 est mis en place. Ces facteurs sont impliqués soit dans l'induction ou réprimer la transcription de gènes cibles en réponse à une carence en acides aminés (**Figure 31**). Il a été montré que la protéine CHOP est capable d'hétérodimériser avec les autres membres de sa famille (b-zip) (Bromati et al, 2011; Su & Kilberg, 2008). Toutefois, deux prolines étant substituées à deux résidus de la région basique impliquée dans la liaison à l'ADN, les homodimères CHOP/CHOP sont incapables de se fixer à l'ADN. De plus, les hétérodimères CHOP / C/EBP ne peuvent pas se fixer aux cibles classiques des facteurs de transcription C/EBP (Ron & Habener, 1992). CHOP a été ainsi souvent présenté comme un dominant négatif des C/EBP vis-à-vis de leurs cibles classiques. Néanmoins, les hétérodimères CHOP/C/EBP ont

aussi la capacité de se fixer sur des séquences spécifiques CHOP-RE et de réguler l'expression de certains gènes, alors que les hétérodimères CHOP/ATF4 régulent les gènes ayant dans leurs séquences promotrices des séquences AARE. CHOP peut former des hétérodimères avec les facteurs de transcription jun-d, c-jun ou encore c-fos, et peut réguler l'expression de gènes tels la *Somatostatine*, la *Collagénase*, *Jun-d* ou encore *Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-receptor 2 (TRAIL2/DR5)* (Ubeda et al, 1999; Yamaguchi & Wang, 2004).

❖ *Autres facteurs capables de se lier directement ou indirectement à l'AARE*

TRB3 (Tribble 3)

TRB3 est une pseudokinase dont l'expression est fortement augmentée au cours d'une carence en acides aminés. Cette régulation est strictement dépendante d'ATF4. Jousse et al. ont montré que la surexpression de TRB3 induisait un rétrocontrôle négatif sur l'expression des gènes dépendants de la voie eIF2 α /ATF4 dont *CHOP* et *ASNS* lors d'une carence en acides aminés. Cette inhibition la transcription dépendante de l'AARE des gènes cibles, passe par l'interaction indirecte de TRB3 avec l'AARE via sa fixation sur la protéine ATF4 (Jousse et al, 2007).

ATF3

ATF3 (Activating Factor 3) est un gène cible de la carence en acides aminés. Il peut également réguler la transcription dépendante de l'AARE d'autres gènes cibles. Ainsi, Pan et al. ont montré qu'une carence en acides aminés de 8 heures induisait la fixation d'ATF3 sur l'AARE de son propre gène (Pan et al, 2007). Ce facteur peut également lier l'AARE de *SNAT2*, *ASNS* ou *CHOP*. La fixation d'ATF3 sur les promoteurs de ces gènes réprime leurs expressions. Il apparaît clairement qu'ATF3, comme TRB3, participe à la mise en place d'une boucle de régulation négative de la transcription dépendante d'ATF4.

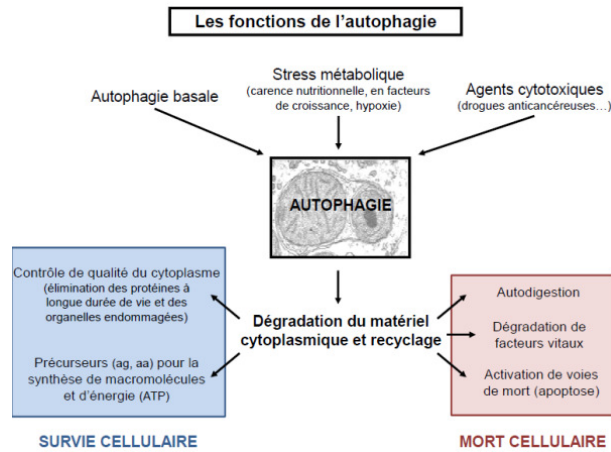


Figure 32: Le rôle important de l'autophagie dans le maintien de l'homéostasie cellulaire.

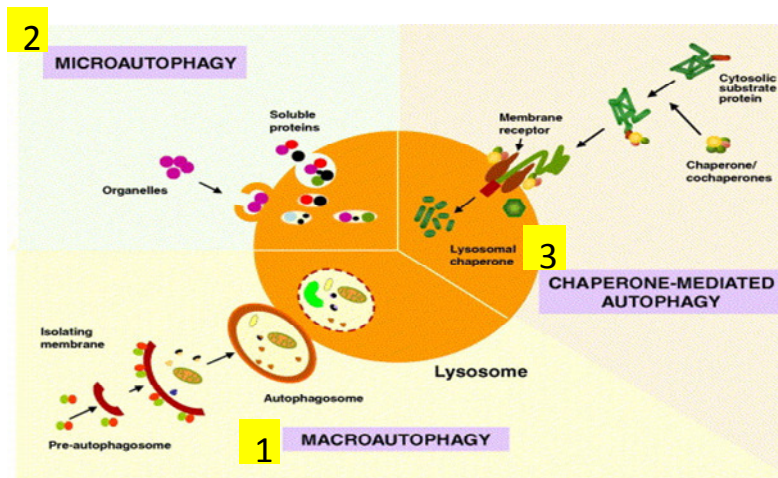


Figure 33: Les 3 formes majeures d'autophagie. (1) La macro-autophagie correspond à la séquestration d'une portion de cytoplasme dans une vacuole à double membrane appelée autophagosome, qui va fusionner avec les lysosomes pour donner un compartiment de dégradation, l'autophagolysosome. (2) La micro-autophagie correspond à l'internalisation d'une portion de cytoplasme par invagination directe de la membrane des lysosomes. (3) L'autophagie assurée par des protéines chaperonnes se caractérise par le transport actif de protéines cytosoliques dans les lysosomes (d'après Bandhyopadhyay U. *et al*, 2007).

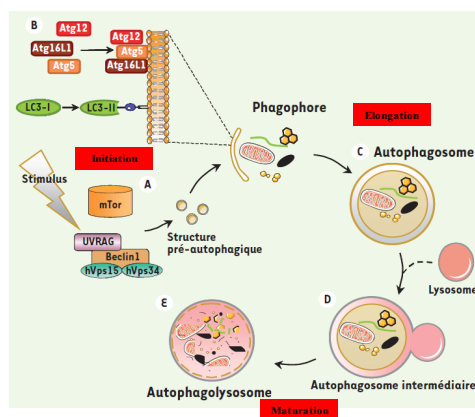


Figure 34: Schéma du processus autophagique. En réponse à différents stress cellulaires, les complexes protéiques mTOR et Beclin1 induisent la formation d'une structure membranaire pré-autophagique (A). Les 2 systèmes de conjugaison Atg16L1/Atg5/Atg12 et LC3 permettent la formation du phagophore par élongation de la membrane et séquestration d'éléments cytoplasmiques (B). La fermeture de la double membrane conduit à un autophagosome (C) qui fusionne avec des lysosomes (D) et conduit à la dégradation de la membrane interne et du contenu intra-vacuolaire (E) (d'après Glasser A.L. *et al*, 2009).

Chapitre III – L'autophagie, un processus d'adaptation aux stress cellulaires

1. Le processus autophagique

Dans la biologie de la cellule, l'autophagie, ou autophagocytose, est un processus catabolique impliquant la dégradation des propres composants d'une cellule par la machinerie lysosomale. C'est un processus finement régulé qui joue un rôle clé dans la croissance, le développement et l'homéostasie cellulaire via le maintien de la balance entre la synthèse, la dégradation et le recyclage des composants cellulaires (**Figure 32**). Ainsi, lors d'un stress tels qu'une carence nutritionnelle, la cellule met en place le processus autophagique, permettant aux fonctions essentielles d'être alimentées et à l'organisme de survivre.

L'autophagie est un processus ubiquitaire dans les cellules eucaryotes qui correspond à la dégradation d'éléments cytoplasmiques tels que des organites (mitochondrie, peroxyosome) ou des agrégats protéiques par les lysosomes. On distingue deux types d'autophagie : l'autophagie basale appelée aussi autophagie « de ménage » et l'autophagie induite par un stress cellulaire. En effet, à un niveau basal, l'autophagie se produit dans toutes les cellules eucaryotes et permet un « contrôle qualité » du cytoplasme en permettant le renouvellement des protéines à longue durée de vie et de certains organites d'où son rôle protecteur contre le vieillissement. En cas de stress cellulaire, ce processus est activé permettant ainsi l'adaptation de la cellule à des changements environnementaux ou développementaux. Trois formes majeures d'autophagie sont distinguées (**Figure 33**): (i) la macro-autophagie qui correspond à la dégradation d'une portion de cytoplasme contenue dans une vacuole à double membrane fusionnant avec les lysosomes, (ii) la micro-autophagie qui est l'incorporation directe de cytoplasme au sein des lysosomes par invagination de leur membrane, et enfin (iii) l'autophagie assurée par des protéines chaperonnes qui correspond à un transport actif de protéines anormales au travers de la membrane des lysosomes. Par la suite, le terme autophagie sera utilisé pour se référer uniquement à la macro-autophagie.

Le processus autophagique se décompose en trois étapes : (1) l'initiation et la formation de la membrane d'isolation, (2) l'élongation et enfin (3) la maturation ou terminaison de l'autophagosome par fusion avec le lysosome (**Figure 34**). Il est souvent classé comme un

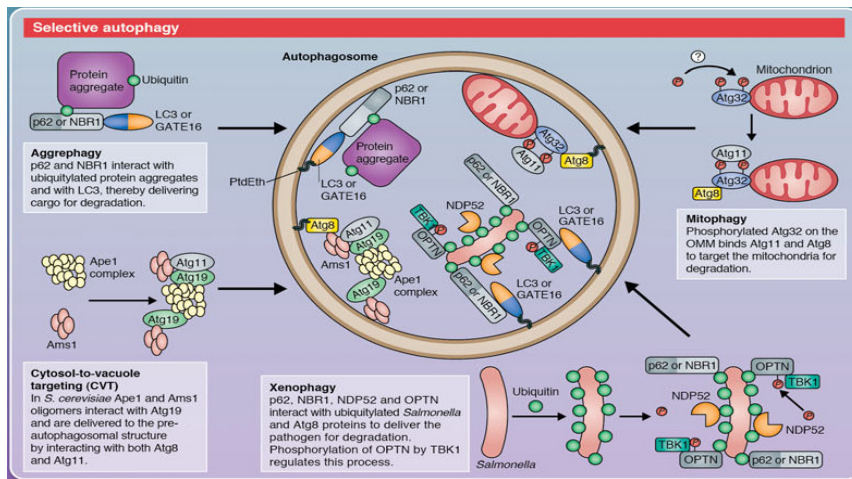


Figure 35: Différentes autophagies sélectives. (d'après Shpilka T. *et al*, 2012).

	Yeast	Mammals	Features	Function
Atg1/ULK complex	Atg1	ULK1/2	Ser/Thr kinase; phosphorylated by mTORC1	This complex is negatively regulated by (m)TORC1 in a nutrient-dependent manner. In yeast, Atg17 forms a complex with Atg29 and Atg31, and further interacts with Atg1 and Atg13 upon starvation to mediate PAS organization. By contrast, ULK1, Atg13, FIP200, and Atg101 form a stable complex irrespective of nutrient conditions and translocate to the autophagosome formation site upon autophagy induction in mammalian cells. Although FIP200 and Atg13 are phosphorylated by ULK1, physiologically relevant substrates of Atg1/ULK1 remain largely unknown. FIP200 and Atg101 may have functions similar to yeast Atg17, Atg29, and Atg31, although they show no sequence similarity with each other.
	Atg13	Atg13	Phosphorylated by (m)TORC1	
	Atg17	-	Ternary complex with Atg29 and Atg31	
	Atg11	-	Scaffold for the PAS organization in selective autophagy	
	Atg29	-	Ternary complex with Atg17 and Atg31	
	Atg31	-	Ternary complex with Atg17 and Atg29	
	-	FIP200	Scaffold for ULK1/2 and Atg13	
	-	Atg101	Interacts with Atg13	
Class III PI3K complex	Vps34	Vps34	PI3K	This complex produces PI3P in the PAS or on the ER. Vps34, Vps15 and Atg6/Beclin 1 are shared with the Vps38/UVRAG complexes, which function in the endocytic pathway. Rubicon negatively regulates autophagosome-lysosome fusion through interaction with the UVRAG complex. Bcl-2 inhibits autophagy by sequestering Beclin 1 from the PI3K complex.
	Vps15	Vps15	Ser/Thr kinase; myristoylated	
	Vps30/Atg6	Beclin 1	BH3-only protein; interacts with Bcl-2	
	Atg14	Atg14(L)/Barkor	Autophagy-specific subunit	
	-	AMBRA1	Interacts with Beclin 1	
Others	Atg2	Atg2A/B	Interacts with Atg18	DFCP1 localizes to the omegasome on the ER, where other Atg proteins are assembled. DFCEP1 itself is not essential for autophagy. Atg9, WIP1s, and VMP1 are present on the autophagic membrane. Atg9 also exists in other compartments such as endosomes and the <i>trans</i> -Golgi network.
	Atg9	Atg9L1/2	Multispan transmembrane protein	
	Atg18	WIP1/2/3/4	PI3P-binding proteins	
	-	DFCP1	PI3P-binding FYVE-containing protein	
	-	VMP1	Multispan transmembrane protein	
Atg12 conjugation system	Atg12	Atg12	Ubiquitin-like; conjugates to Atg5	The Atg12-Atg5-Atg16(L) dimer is important for Atg8/LC3-PE conjugation. This complex is present on the outer side of the isolation membrane and is essential for proper elongation of the isolation membrane. The function of Atg16L2 remains uncharacterized.
	Atg7	Atg7	E1-like enzyme	
	Atg10	Atg10	E2-like enzyme	
	Atg5	Atg5	Conjugated by Atg12	
	Atg16	Atg16L1/2	Homodimer; interacts with Atg5	
Atg8/LC3 conjugation system	Atg8	LC3A/B/C, GABARAP, GABARAPL1/2/3	Ubiquitin-like; conjugates to PE (GABARAPL2 = GATE16)	The formation of Atg8/LC3-PE conjugates and their deconjugation by Atg4 are important for isolation membrane elongation and/or complete closure. Atg8/LC3 is present on both inner and outer membranes of autophagosomes and also interacts with receptors/adaptors such as Atg19 and Atg32 in yeast, and p62, NBR1, and Nix in mammals, for selective cargo incorporation into the autophagosome.
	Atg4	Atg4A-D	LC3/Atg8 C-terminal hydrolase; deconjugating enzyme	
	Atg7	Atg7	E1-like enzyme (shared with Atg12)	
	Atg3	Atg3	E2-like enzyme	

Tableau 5: Les différents Atg et protéines impliqués dans la formation de l'autophagosome (d'après Mizushima U. *et al*, 2011).

mécanisme cytoprotecteur favorisant la survie de la cellule en réponse aux stress du microenvironnement (Cecconi & Levine, 2008). Cependant, dans certains cas (développement embryonnaire, Cancer...), l'autophagie peut aussi conduire à la mort cellulaire par une dégradation excessive du contenu intra-cytoplasmique qui se distingue de l'apoptose par ses critères morphologiques et moléculaires (mort cellulaire programmée de type II, présentée ultérieurement). De nombreuses études décrivent un effet bénéfique et protecteur de l'autophagie vis-à-vis de la survenue ou de la progression de certaines pathologies telles que des maladies neurodégénératives, les infections par les agents pathogènes intracellulaires, le cancer (Mizushima & Klionsky, 2007). Cependant le processus autophagique peut, dans certaines situations, contribuer au développement d'une maladie (White, 2012).

Jusqu'à récemment, la macro-autophagie était décrite comme un processus non spécifique de son substrat, dégradant différents constituants cytoplasmiques de façon aléatoire. Ceci a été appuyé par des observations en microscopie électronique montrant des autophagosomes renfermant des mitochondries, diverses petites vésicules, des ribosomes et autres constituants cellulaires. La macro-autophagie est maintenant davantage considérée comme un mécanisme de dégradation pouvant cibler les constituants à dégrader. On parle par exemple de mitophagie (ciblant les mitochondries), de peroxyphagie (ciblant les peroxyosomes), de réticulophagie (pour le réticulum endoplasmique) (Beau et al, 2008 ; Gottlieb & Carreira, 2010) (**Figure 35**).

2. Mécanismes moléculaires et gènes de l'autophagie

Au niveau moléculaire, les processus d'autophagie impliquent des protéines et leurs gènes appelés ATG (autophagy related gene). A l'heure actuelle, 31 gènes de la famille des ATG ont été identifiés chez la levure. Tous ces gènes se sont révélés être très conservés au cours de l'évolution dans leur séquence au sein des différentes espèces capables de mettre en place le processus autophagique (**Tableau 5**). Ces gènes sont a priori tous impliqués soit dans la régulation de l'autophagie, soit dans la formation des autophagosomes ou dans leur maturation (allongement, fermeture, fusion lysosomiale...) (**Figure 36**) (Shpilka et al, 2012).

2.1. Initiation et formation de la membrane d'isolation

La phase d'initiation du processus autophagique se caractérise par la formation dans le cytoplasme de la cellule d'une membrane d'isolation, également appelée phagophore, qui par la suite va entourer et enfermer les composants destinés à la dégradation. Cette étape est sous la dépendance du complexe hétéro-trimérique ULK1-Atg13-FIP200 en coopération avec la PI3

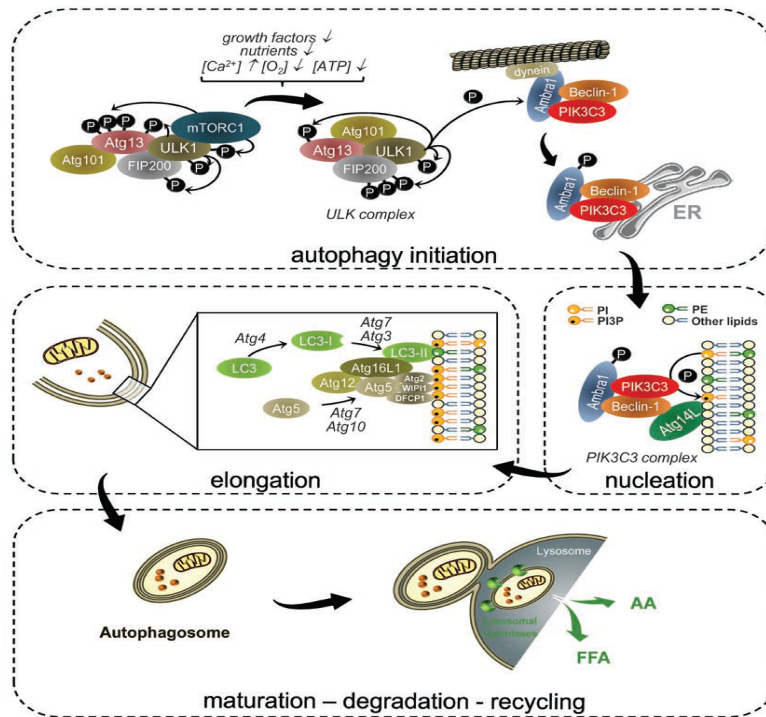


Figure 36: Mécanisme général du processus autophagique. (1) L'initiation : en intégrant différents stimuli, les complexes protéiques de régulation de l'autophagie, mTOR et Beclin-1 induisent la formation d'un phagophore. (2) L'élongation : les 2 systèmes de conjugaison Atg16L1/Atg5/Atg12 et LC3 permettent l'élongation du phagophore et la séquestration d'éléments cytoplasmiques (3) La maturation : la fermeture de la double membrane conduit à la formation d'un autophagosome qui fusionne avec les lysosomes et ceci conduit à la dégradation du contenu intravacuolaire. (d'après Wirawan E. *et al*, 2011).

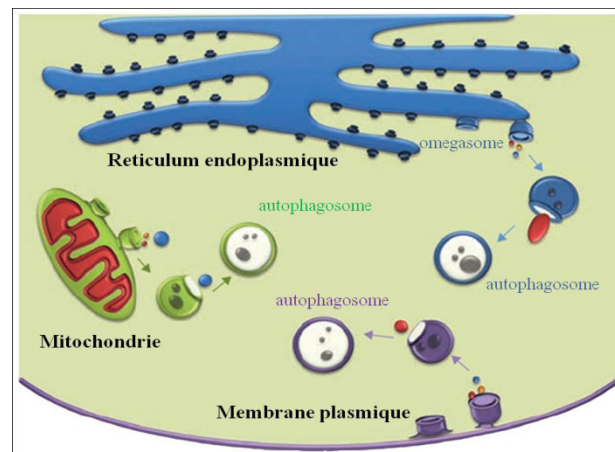


Figure 37: Origines de la membrane des autophagosomes. Les autophagosomes se formeraient à partir de différents compartiments membranaires de la cellule, soit par un transfert direct de matériel membranaire ou soit par une synthèse de novo ou un transport de lipides. Les origines les mieux documentées à ce jour sont : les omegasomes à la surface du RE, la mitochondrie et la membrane plasmique (d'après Cuervo M. *et al*, 2010).

kinase de classe III Vps34 et la protéine adaptatrice Beclin-1. L'induction va débuter lorsque ULK1 et ULK2 (Unc-51-like kinase) (équivalents d'Atg1 chez la levure) vont phosphoryler Atg13 et FIP200 dans le complexe ULK-Atg13-FIP200. Une nouvelle protéine nommée Atg101 pourrait également être nécessaire à l'initiation de l'autophagie chez les mammifères (Mercer et al, 2009).

Deux hypothèses majeures non exclusives sont avancées concernant l'origine de la membrane d'isolation (Kraft & Martens, 2012). La première est une synthèse *de novo* ou un transport de lipides au sein de la cellule afin de former la membrane d'isolation (Ravikumar et al, 2010). La seconde hypothèse avancée pour expliquer l'origine de la membrane d'isolation est un transfert direct de matériel membranaire pouvant provenir de différents éléments de la cellule tels que le RE, le trans-Golgi, les endosomes et les mitochondries (Axe et al, 2008 ; Simonsen & Tooze, 2009) (**Figure 37**). Cependant, la part de chacun de ces organites dans l'apport de lipides pour la formation du phagophore reste controversée, et il y a vraisemblablement des variations selon les types cellulaires considérés ou les stimuli à l'origine de la formation de l'autophagosome (Luo et al, 2009 ; Rubinsztein et al, 2012). Deux études récentes basées sur l'analyse de l'ultrastructure par tomographie électronique ont montré une association étroite entre les membranes d'isolation en formation et le RE (Hayashi-Nishino et al, 2009 ; Yla-Anttila et al, 2009). En 2013, Hamasaki et al. ont montré que lors de conditions de carence, la protéine SNARE associée au RE appelée syntaxine 17 (STX17) se lie à l'ATG14 qui est ainsi recrutée au niveau du site de contact ER-mitochondries (Hamasaki et al, 2013). Ces résultats apportent un nouvel éclairage sur la biogenèse des organites en démontrant que le site de contact ER-mitochondries est important dans la formation de l'autophagosome (Bernard & Klionsky, 2013).

2.2.Elongation

L'expansion de la membrane d'isolation autour de la portion cytoplasmique renfermant les protéines et les organites à dégrader est contrôlée par deux systèmes *ubiquitin-like*. Le premier implique un hétéro-trimère Atg5-Atg12-Atg16L1 et le second implique la protéine LC3 (Ohsumi, 2001) (**Figure 38**).

a) Le système de conjugaison Atg5-Atg12-Atg16L1

Ce premier complexe conduit à la conjugaison d'Atg5 avec Atg12 (**Figure 39**). Pour cela, Atg7 (enzyme E1-like) active le résidu glycine de la partie carboxy-terminale d'Atg12 en utilisant de l'ATP. La protéine est ensuite prise en charge par Atg10 (Enzyme E2-like) qui

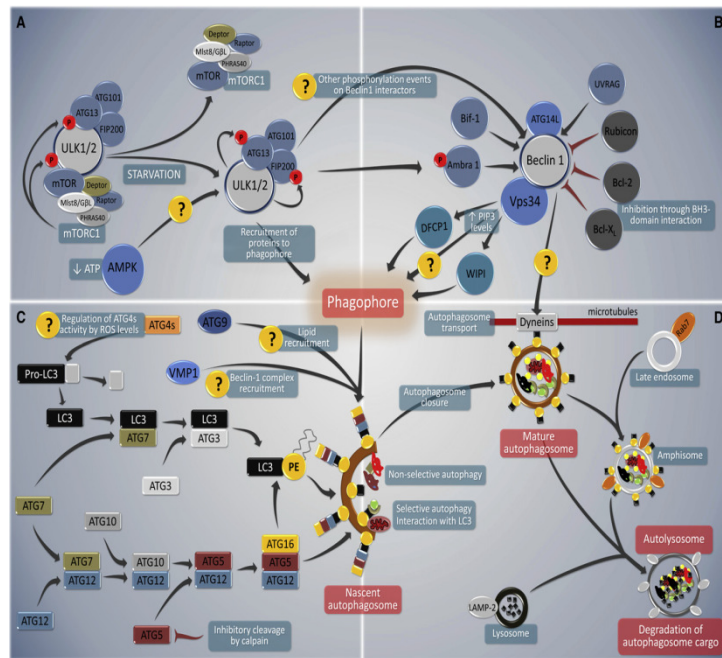


Figure 38: La machinerie autophagique et ses principaux acteurs. De nombreux acteurs participent aux étapes de l'autophagie : initiation, élongation, maturation et fusion. **(A)** Les inducteurs de l'autophagie, tels que la carence en nutriments, entraînent la dissociation de TORC1 et du complexe ULK1/2. **(B)** Ce dernier, une fois activé, entraîne la phosphorylation de Ambra1 et stimule l'activité de Beclin-1, deux constituants du complexe PI3K de classe III. Beclin-1 interagit avec des facteurs activateurs (bleu) et inhibiteurs (gris) qui régulent la liaison de Beclin-1 à Vps34, l'unité catalytique du complexe PI3K. **(C)** En plus de ces deux complexes, la formation des autophagosomes à partir du phagophore requiert l'intervention de deux systèmes de conjugaison « ubiquitine-like » impliquant les protéines Atg12 et LC3. La protéine LC3 est nécessaire au transport et à la maturation des autophagosomes ainsi qu'à la sélection des substrats destinés à être dégradés par l'autophagie. **(D)** Les autophagosomes complètement matures fusionnent avec les endosomes tardifs pour former des amphisomes. Enfin, les autophagosomes ou les amphisomes fusionnent avec les lysosomes ce qui aboutit à la formation d'autolysosomes. Ces derniers, grâce à leur activité d'hydrolyse, dégradent le matériel séquestré qui est ensuite recyclé pour synthétiser de nouvelles molécules au sein de la cellule (d'après Levine B. *et al.*, 2010).

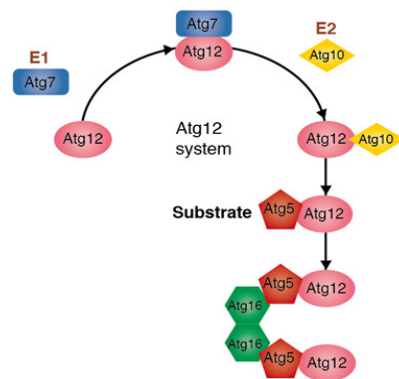


Figure 39: Formation du complexe ATG5-ATG12-ATG16L. Contrairement à d'autres protéines analogues à l'ubiquitine, la protéine Atg12 possède une glycine en C-terminal, qui la protège de toute altération. Atg12 est conjugué au substrat Atg5 via l'action d'Atg7 (une protéine E1-like, et qui agit au niveau de la conjugaison de LC3I au PE) et Atg10 (une protéine E2-like). Le conjugué Atg12-Atg5 forme un complexe avec Atg16. L'auto-oligomérisation de Atg16 aboutit à un multimère du complexe Atg12-Atg5-Atg16.

catalysera la création d'une liaison covalente entre Atg12 et Atg5 au niveau de sa lysine 130. La protéine de fusion ainsi générée recrute ensuite Atg16L pour former le complexe multimérique Atg12-Atg5-Atg16L qui intègre la membrane de la vésicule autophagique en formation (Mizushima et al, 2003).

b) Le système de conjugaison LC3B

Parallèlement à la formation du premier complexe, la protéine Atg8/LC3B appelée aussi MAP1-LC3 (Microtubule Associated Light Chain 3) est modifiée par un second système *ubiquitin-like* (Kabeya et al, 2000). Initialement, LC3B est exprimée dans la cellule sous forme inactive de 18KDa. Une fois l'autophagie induite, LC3B est clivée par la cystéine protéase Atg4, conduisant à la formation d'une protéine LC3B-I de 16KDa. Ce processus de clivage met en jeu la protéine ATG7 qui va activer un résidu glycine en C-terminal de LC3B (**Figure 40**). Par la suite, LC3B-I est transférée à Atg3, une enzyme *E2-like* qui conjugue la protéine à un phosphatidyléthanolamine (Ichimura et al, 2000). La protéine ainsi lipidée, appelée LC3B-II est ensuite prise en charge par le complexe Atg12-Atg5-Atg16L et intégrée à l'autophagosome en formation ce qui va permettre son élongation et l'expansion de sa courbure. Deux autres protéines GABARAP (gamma-aminobutyric acid type A receptor associated-protein) et GATE16 (Golgi-Associated ATPase Enhancer of 16KDa) connue aussi sous le nom de GABARAPL2, sont prises en charge par la même voie que LC3B et sont aussi intégrées dans la membrane de l'autophagosome, mais le rôle précis qu'elles y jouent reste encore peu décrit (Shpilka et al, 2011; Sou et al, 2006).

c) Les protéines cargo p62 et NBR1

La protéine p62/sequestosome1 va permettre la reconnaissance et le transport de protéines et organites destinés à être dégradés. p62 se lie aux protéines ubiquitinylées via le domaine UBA d'une part (ubiquitin-associated) et à la protéine LC3B grâce à son domaine LIR (LC3-interacting region) d'autre part, permettant ainsi l'internalisation du complexe p62-agrégat/protéine ubiquitinylée et la dégradation de ce dernier (Pankiv et al, 2007). Son homologue NBR1 (neighbour of BRCA1 gene 1), se lie aussi à LC3B via un domaine LIR, néanmoins le rôle et la régulation de NBR1 demeurent moins étudiés que ceux de p62 (Johansen & Lamark, 2011).

Toutes ces découvertes ont permis de remettre en cause l'aspécificité de la macroautophagie. En effet, pendant longtemps LC3B a été considérée comme une protéine

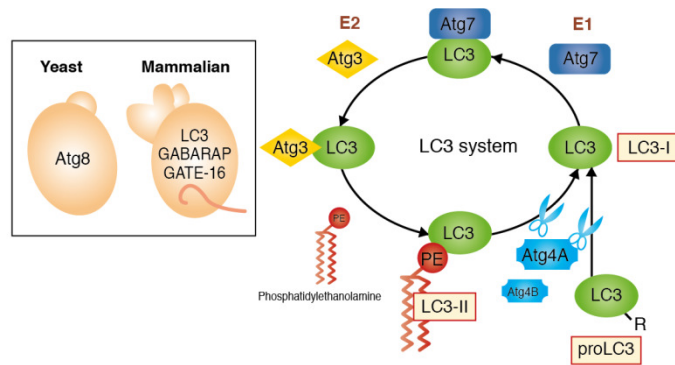


Figure 40: Formation du système de conjugaison LC3. Suite au clivage du résidu d'arginine en C-terminal de la protéine LC3I par la protéase à cystéine Atg4, LC3 est transmis à E1 (Atg7) et E2 (Atg3) et couplé à un groupement PE donnant la forme LC3II lipidée. LC3II fonctionne comme une partie du composant de la membrane de l'autophagosome. LC3II peut être recyclée suite au découplage du PE par ATG4.

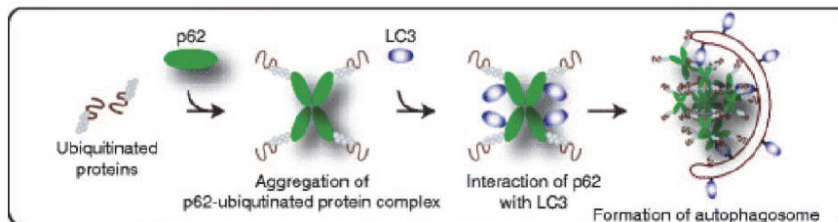


Figure 41: p62, un récepteur des protéines ubiquitylées. Les protéines poly-ubiquitylées qui seront dégradées interagissent avec le domaine UBA de la protéine p62. Le complexe ainsi formé sera séquestré dans l'autophagosome grâce à la liaison entre le domaine LIR/LRS de p62 et LC3 (d'après Ichimura and Komatsu, 2010).

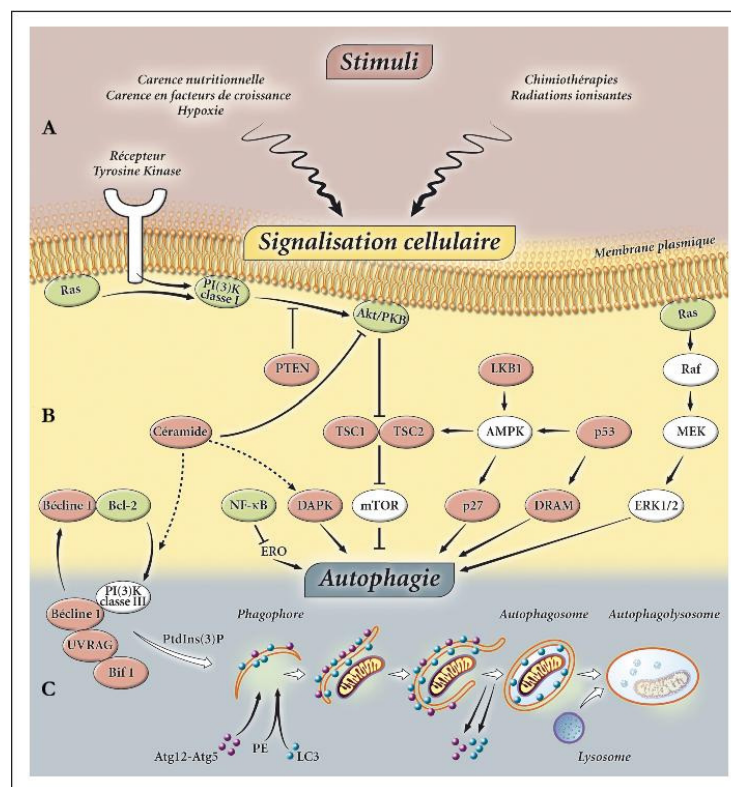


Figure 42: Différentes voies et acteurs impliqués dans la régulation du processus autophagique en réponse aux stress cellulaires. (d'après Lorin S. *et al*, 2008).

structurant l'autophagosome et permettant sa maturation. Par la suite, l'interaction entre LC3B et la protéine p62/SQSTM1 qui fixe les protéines et les agrégats ubiquitinylés a été mis en évidence, montrant que cette interaction permet le ciblage spécifique de ces substrats à dégrader (Pankiv et al, 2007) (**Figure 41**).

2.3. Terminaison de l'autophagosome

La dernière étape de l'autophagie conduit à la fermeture de la membrane pour donner un autophagosome, dont la taille est en général de 0,5 à 1,5 µm de diamètre (Mizushima et al, 2002), qui fusionne alors séquentiellement avec les endosomes précoces, puis tardifs, pour donner une vacuole intermédiaire appelée amphisome, qui lui-même fusionne avec le lysosome pour former un autophagolysosome (Mizushima, 2007). Ces événements de fusion et de maturation font intervenir plusieurs acteurs. Des études ont montré que la bafilomycine A1, un inhibiteur des pompes H⁺ lysosomales, est un inhibiteur de fusion autophagosome/lysosome ce qui suggère qu'un pH acide puisse être nécessaire à la fusion (Mousavi et al, 2001). Des protéines endosomales et lysosomales sont aussi nécessaires à la maturation de l'autophagosome ; c'est notamment le cas de LAMP1, LAMP2 (Lysosomal Associated Membrane Protein 1 et 2) ainsi que des GTPases Rab24 et Rab7 dont l'inhibition d'expression bloque la fusion autophagosome/lysosome (Munafò & Colombo, 2002 ; Zhang et al, 2009). Le complexe At6/Beclin1-hVps34 régule également cette dernière étape : associé à UVRAG, il favorise la maturation de l'autophagosome, alors qu'associé à UVRAG et Rubicon il l'inhibe (Zhong et al, 2009).

3. Régulation du processus autophagique

L'autophagie fait partie des processus physiologiques qui participent à l'homéostasie cellulaire (Ryter et al, 2013). De ce fait, les voies de signalisation régulant l'autophagie sont intimement liées à celles contrôlant la croissance, la prolifération, la survie et la mort cellulaire. Afin d'assurer la survie de la cellule dans des conditions de stress environnementaux (une carence en acides aminés, des conditions d'hypoxie ou bien encore des dommages à l'ADN), l'autophagie va être activée. Afin d'intégrer cette grande variété de stress et ajuster finement l'intensité de la réponse autophagique, de nombreux détecteurs et intermédiaires moléculaires vont participer à la régulation de cette réponse (Boya et al, 2013) (**Figure 42**).

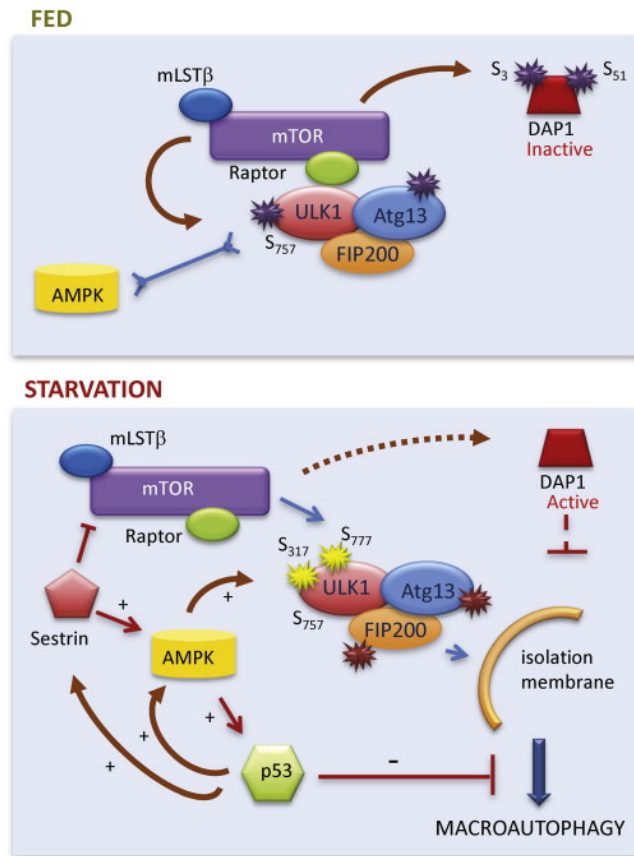


Figure 43: Régulation de l'autophagie par la protéine kinase mTOR. (1) En présence de nutriments, le complexe mTORC1 contenant la protéine kinase mTOR est associé au complexe hétéro-trimérique ULK1, Atg13 et FIP200. mTOR phosphoryle ULK1 et Atg13, rendant ces protéines inactives et le processus autophagique est réprimé. (2) Lors d'une carence en nutriments, la protéine mTOR devient inactive et elle se dissocie de ULK1. La protéine kinase ULK1 peut alors s'autophosphoryler et phosphoryler Atg13 et FIP200, ce qui permet une activation du processus autophagique. (d'après Pescarmona G. *et al*, 2007).

3.1. Régulation cytoplasmique :

L'activation rapide de l'autophagie basale et est essentiellement médiée par des modifications post-traductionnelles des protéines par phosphorylation globale, acétylation, ubiquitinylation, oxydation, lipidation, clivage protéolytique et interactions protéine-protéine, (Pietrocola et al, 2013).

a) Les complexes mTOR

❖ Rôle de mTORC1:

De nombreuses études ont montré l'implication de la voie mTOR (détaillée dans le Chapitre II) dans la régulation de l'autophagie. D'une part l'inhibition du complexe mTORC1 par la rapamycine augmente l'autophagie, d'autre part la stimulation du complexe mTORC1 diminue ce processus. Le complexe mTORC1 phosphoryle et inhibe des protéines qui sont essentielles au processus autophagique. mTORC1 inhibe directement des protéines comme ULK1 (unc-51-like kinase 1), ATG13 (autophagy-related gene 13) en les phosphorylant, et indirectement la protéine FIP200 (focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa) qui n'est plus phosphorylée par ULK1 (Jung et al, 2010).

Au niveau cellulaire, l'activité de mTORC1 est notamment régulée par la quantité de nutriments présents. Lorsque l'environnement est riche en nutriments, en particulier en acides aminés et en facteurs de croissance, mTORC1 est activé et empêche la formation du complexe ULK1/2-Atg13-FIP200 par phosphorylation d'ULK1/2 et Atg13 inhibant ainsi l'autophagie à l'étape d'initiation de la formation du phagophore (**Figure 43**). Seuls certains acides aminés sont impliqués dans l'inhibition de l'autophagie par l'intermédiaire de la voie mTORC1. L'alanine, la leucine, la glutamine et la phénylalanine semblent être de puissants inhibiteurs de l'autophagie (Naito et al, 2013). Des études ont montrées que les acides aminés, et en particulier la leucine, pourraient induire les PI3K de classe III mais également les PI3K associées à Beclin-1 sans affecter la liaison entre ces deux derniers, entraînant ainsi l'activation de mTORC1 (Meijer & Codogno, 2009 ; Suzuki & Inoki, 2011). A l'inverse, en cas de carence en acides aminés, mTOR est inactivé et le processus autophagique peut être induit. L'autophagie peut également être activée par la rapamycine, un inhibiteur connu de mTOR (Huang & Houghton, 2001 ; Laplante & Sabatini, 2013), indépendamment de la concentration en acides aminés.

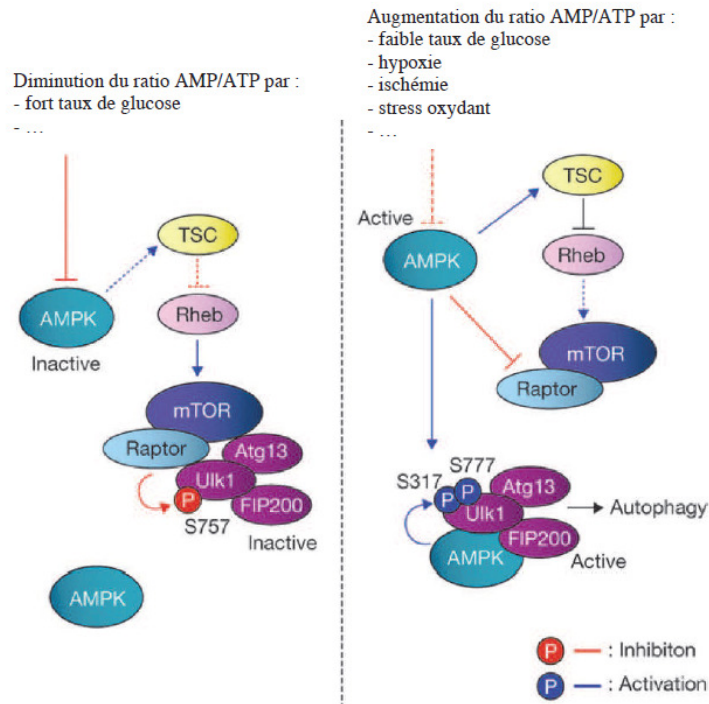


Figure 44: Régulation moléculaire de l'autophagie par l'AMP Kinase. *A gauche* : Lorsque le ratio AMP/ATP est faible, l'AMPK est inactive et ne phosphoryle donc pas ULK1 sur ses sites activateurs. Mais le complexe mTORC1 est actif et phosphoryle ULK1 sur la sérine 757 de manière à inhiber son activité. *A droite* : Lorsque le niveau d'énergie est limité dans la cellule (caractérisé par une diminution de l'ATP), l'AMPK est activée et inhibe le complexe mTORC1 après phosphorylation de TSC2 et Raptor. De plus, la phosphorylation inhibitrice de la Sérine 757 est diminuée ce qui permet l'interaction entre ULK1 et l'AMPK. Cette dernière entraîne deux phosphorylations activatrices sur les Sérines 317 et 777 de ULK1 permettant l'initiation de l'autophagie (d'après Kim *et al*, 2011).

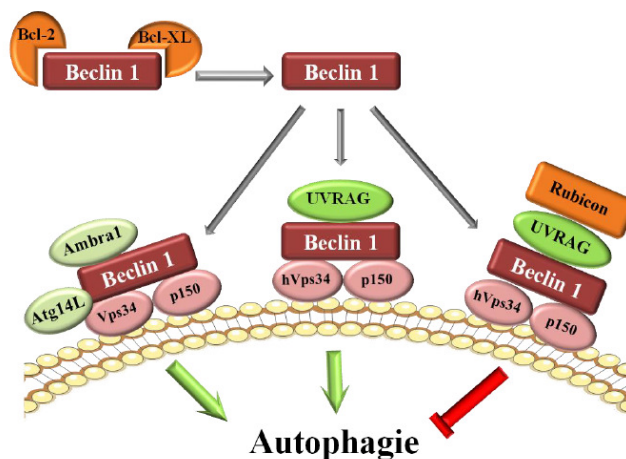


Figure 45: Régulation moléculaire de l'autophagie par les complexes Beclin-1. En condition de répression du processus autophagique, Beclin-1 est associé à des protéines telles que Bcl-2 et Bcl-XL, qui empêchent son association avec les PI3K de classe III. Lorsque l'autophagie est activée, Beclin-1 se dissocie de Bcl-2 et/ou Bcl-XL et peut s'associer à la PI3K de classe III Vps34 et sa sous-unité régulatrice p150 afin d'initier le processus autophagique. L'association des protéines Atg14L, Ambra1 ou UVRAG au complexe Beclin-1-Vps34-p150 favorise l'initiation de l'autophagie alors que l'association de la protéine Rubicon la diminue.

❖ **Rôle de mTORC2 :**

Le complexe mTORC2, constitué de mTOR, Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), mLST8 et SIN1 (SAPK-interacting protein 1), a un rôle encore mal défini dans la régulation de l'autophagie. Son induction pourrait inhiber indirectement l'autophagie via l'activation de la voie Akt suivie de la phosphorylation inhibitrice de FoxO3, un facteur de transcription régulant l'expression des gènes pro-autophagiques comme LC3 et Bnip3 (Bcl-2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 3) (Mammucari et al, 2007). Récemment il a été montré que l'inhibition simultanée des deux complexes mTORC1 et 2 induisait l'autophagie dans les cellules leucémiques (Sini et al, 2010; Vakana et al, 2010).

b) Le complexe AMPK

L'activité de l'adénosine monophosphate-protein kinase (AMPK) est sensible aux variations du rapport AMP/ATP cytosolique observées notamment en situation de stress métabolique, par exemple en cas de carence en glucose, lors d'une hypoxie, d'une ischémie ou d'un stress oxydatif (Inoki et al, 2012; Shaw, 2009). L'augmentation de ce ratio, due à une déplétion en ATP, active l'AMPK qui détecte donc les diminutions d'énergie. Une fois activée, la kinase AMPK régule positivement l'autophagie par le biais de la phosphorylation directe de ULK1 sur des sites activateurs (Egan et al, 2011b) mais également via l'inhibition de la voie mTOR de manière directe (Wong et al, 2013) ou indirecte par l'activation de TSC2 (Tuberous Sclerosis 2), une protéine suppresseur de tumeur, qui inhibe mTORC1 (Ng et al, 2011) (**Figure 44**). L'AMPK régule également l'autophagie par le biais de l'activation de p27kip1 (He & Klionsky, 2009) et de la proline déhydrogénase (oxydase) (PRODH/POX) dans des conditions hypoxiques et de formation d'espèces réactives de l'oxygène (Liu & Phang, 2012).

c) Le complexe Beclin-1

La Beclin-1 (Bcl-2-homology (BH)-3 domain only) (Atg6 chez la Levure), joue un rôle clé dans la régulation de l'autophagie chez les mammifères. En effet, la Beclin-1 et son partenaire de liaison la phosphoinositide 3-kinase de classe III (PI3K), également nommée Vps34, sont nécessaires pour l'initiation de la formation de l'autophagosome. La Beclin-1 interagit avec différentes protéines, et selon la nature de ces dernières, elle régule positivement ou négativement l'initiation du processus autophagique (**Figure 45**).

En effet, les facteurs anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia 2) inhibent l'autophagie en se fixant à la Beclin1. La protéine UVRAG (ultraviolet irradiation

resistance-associated gene) va également interagir avec la Beclin1 pour former un complexe excluant Atg14L et permettant l'interaction avec Bif-1 (Bax-interacting factor 1). Ceci va induire la déformation des membranes, et en s'associant avec les protéines Vps de classe C, le complexe UVRAG-class-C-Vps va permettre la fusion de l'autophagosome avec le lysosome (Liang et al, 2008). En revanche, Rubicon (RUN domain and cysteine-rich domain containing, Beclin1-interacting), une protéine découverte récemment, va former un complexe avec UVRAG et Beclin1 et ainsi inhiber la maturation de l'autophagosome et inhiber l'autophagie (Kang et al, 2011).

d) Le récepteur Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3R)

La réduction des niveaux intracellulaires de 1,4,5-trisphosphate d'inositol (IP3) stimule l'autophagie, tandis que l'augmentation des niveaux d'IP3 inhibe l'autophagie induite par l'épuisement des nutriments. En effet, lors d'une carence en glucose, il y a sécrétion de 2 hormones : glucagon et adrénaline qui vont se fixer sur des récepteurs péri-membranaires. L'adrénaline va activer la phospholipase C qui va permettre la libération de 2 molécules : IP3 et le di-glycéride, appelé aussi diacyl-glycérol (DAG). A son tour, l'IP3 va libérer du calcium contenu dans le réticulum endoplasmique (RE). Le récepteur IP3R est connu pour résider dans les membranes du RE ainsi que dans les sites de contact du RE avec les mitochondries. L'inhibition du IP3R déclenche l'autophagie du RE et des mitochondries, selon le même processus observé dans l'autophagie induite par la carence en nutriments. Ce processus met en jeu les protéines Bcl-2 et Bcl-XL (Lam et al, 2008; Sarkar & Rubinsztein, 2006).

e) Rôle du cytosquelette

Le cytosquelette joue un rôle important dans la régulation du processus autophagique (Aplin et al, 1992). En effet, la formation des autophagosomes requiert les microtubules dynamiques. Dans des conditions de carence nutritionnelle, les microtubules dynamiques recrutent spécifiquement les marqueurs de la formation des autophagosomes. De plus dans ces conditions, la tubuline est hyperacétylée, ce qui permet le recrutement sur le microtubule de la kinésine-1 et de JIP-1. Ce recrutement permet l'activation de la voie de signalisation JNK (Jun N-terminal Kinase) qui provoque la libération de Beclin-1 et de l'initiation de la formation de l'autophagosome. La kinésine-1 participe à la formation des autophagosomes en carence nutritionnelle tandis qu'en conditions basales, elle participe uniquement à leur mobilité (Geeraert et al, 2010). Les microtubules jouent aussi un rôle essentiel dans la maturation des vésicules autophagiques (Webb et al, 2004). La dynamique microtubulaire et les modifications post-

traductionnelles de la tubuline jouent un rôle majeur dans la régulation de l'autophagie. Les microfilaments d'actine et de myosine VI jouent aussi un rôle important dans le processus autophagique. En effet, l'actine participe aux premières étapes de la formation de la membrane de l'autophagosome dépendantes du recrutement du Phosphatidylinositol 3-Phosphate (PtdIns3P) et sa fonction est étroitement régulée par les différents membres de la famille Rho (Aguilera et al, 2012). Contrairement à l'actine, la myosine VI intervient plus tardivement et elle est décrite comme étant impliquée dans la maturation de l'autophagosome et sa fusion avec le lysosome (Tumbarello et al, 2012).

f) Autres mécanismes cytoplasmiques

L'autophagie peut être régulée par de nombreux mécanismes cytosoliques. De récentes études ont montré que les concentrations d'Atg5 peuvent être contrôlées par les calpaïnes, cystéine protéases dépendantes du calcium: une réduction du Ca²⁺ cytosolique augmente la disponibilité d'Atg5 et la formation du complexe pro-autophagique Atg12/Atg5 (Xia et al, 2010).

3.2. Régulation de l'expression des gènes de l'autophagie :

La régulation de l'autophagie basale est régulée essentiellement *via* des modifications post-traductionnelles des protéines par phosphorylation globale, acétylation, ubiquitinylation, oxydation, lipidation, clivage protéolytique et interactions protéine-protéine, mais aussi par des régulations transcriptionnelles des gènes de l'autophagie afin de permettre le renouvellement des protéines autophagiques qui ont une demie vie limitée. Cette régulation transcriptionnelle joue aussi un rôle clé lors de divers stress cellulaire afin de permettre le maintien du processus autophagique et la survie cellulaire (Pietrocola et al, 2013).

a) JNK/c-Jun

La phosphorylation accrue de c-Jun suite à l'activation de JNK par les céramides sphingolipides a été mise en évidence dans des lignées de cellules cancéreuses. Ce mécanisme a été décrit comme régulateur de Beclin-1 en augmentant son expression ((Scarlati et al, 2004); (Li et al, 2009)), induisant ainsi la mort cellulaire autophagique en réponse aux céramides. L'activation de JNK aboutit à la régulation positive de l'expression de Beclin-1, ainsi que de l'expression de LC3 (Sun et al, 2011).

b) NF-κB

Le facteur de transcription NF-κB, qui joue un rôle dans les processus physiologiques (l'inflammation, l'immunité) et pathologiques (le cancer) (Napetschnig & Wu, 2013), a également été impliqué dans la régulation de l'autophagie. Un site de fixation de NF-κB a été récemment identifié au niveau de la séquence promotrice du gène codant pour la Beclin-1 et qui est bien conservé chez la souris et l'Homme (Copetti et al, 2009). Les auteurs ont montré que p65/RelA, un membre de la famille NF-κB, régule l'expression de Beclin 1 et stimule l'autophagie dans plusieurs systèmes cellulaires. NF-κB joue deux rôles antagonistes dans la régulation du processus autophagique. En effet, son activation est impliquée dans l'induction de l'autophagie lors de la réponse au choc thermique (Nivon et al, 2009). Cependant, son inhibition en réponse à une carence en nutriments favorise l'autophagie TNF-dépendante (Djavaheri-Mergny et al, 2006; Fabre et al, 2007). En outre, il a été aussi décrit que l'activation de NF-κB empêche l'autophagie dans les macrophages par régulation négative de l'expression de ATG5 et Beclin-1 (Baldwin, 2012; Schlottmann et al, 2008).

c) HIF-1

L'hypoxie entraîne la mise en place du processus autophagique via l'activation de HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) qui est un facteur de transcription qui régule la transcription de nombreux gènes en réponse à l'hypoxie dont les gènes codant pour l'expression des protéines BNIP3 et BNIP3L (hypoxia-inducible BH3-only proteins) (Mellor & Harris, 2007 ; Song et al, 2012). BNIP3 et BNIP3L jouent un rôle important dans l'induction de l'autophagie en perturbant l'interaction de Beclin-1 avec Bcl-2 via leur domaine BH3. HIF-1 pourrait également réguler l'expression de Beclin-1 et ATG5 et permettre la formation d'un complexe entre Beclin-1 et d'autres protéines, parmi lesquelles UVRAG et la PIP3 kinase Vps34, essentielle à l'activation de l'autophagie (Bellot et al, 2009).

d) FOXO

En réponse aux facteurs de croissance et à la stimulation par l'insuline, les protéines FOXO sont inhibées par phosphorylation par Akt. Lorsque Akt est réprimée, les protéines FOXO sont transloquées dans le noyau, se lient à l'ADN et transactivent leurs gènes cibles (Salih & Brunet, 2008). Plusieurs études sur la dégradation des protéines au cours de l'atrophie musculaire montrent que le facteur de transcription FOXO3 peut réguler l'autophagie en induisant l'expression de nombreux gènes de l'autophagie, y compris Map1lc3, Atg12, Becn1, Atg4b,

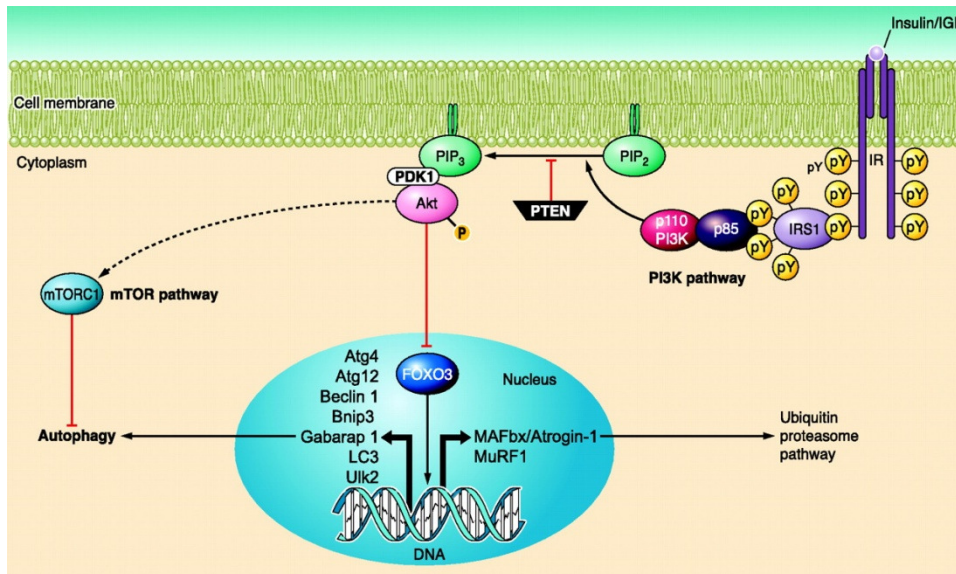


Figure 46: FOXO3 régule de manière coordonnée à la fois l'autophagie et le système ubiquitine-protéasome (UPS) au cours de l'atrophie musculaire. L'activation de la voie de signalisation IGF/Akt via PI3K durant l'atrophie induit la translocation de FOXO3 dans le noyau où il se lie directement aux régions promotrices et régule la transcription des différents gènes cibles tels que MuRF1 et MAFbx/atrogin1 et des gènes de l'autophagie. L'autophagie est également induite par la voie de signalisation IGF/Akt via l'inhibition de mTOR. (extrait de Ravikumar, B. *et al.* 2010).

Ulk1, hVps34, Bnip3/Bnip3l, et Gabarapl1 (Mammucari et al, 2007 ; Zhao et al, 2007) (**Figure 46**). FOXO3 peut se lier directement à la région du promoteur de certains de ces gènes tels que *Map1lc3*, *Atg12*, *Gabarapl1* et *Bnip3/Bnip3l*. L'expression d'une forme constitutive de FOXO3 induit l'autophagie dans le muscle squelettique de souris adulte (Mammucari et al, 2008). Récemment, il a été montré qu'un autre membre de la famille des protéines FOXO, FOXO1, régule l'expression de gènes clés de l'autophagie, hVps34, Atg12 et Gabarapl1 dans les hépatocytes de manière dépendante insulino- (Liu et al, 2009).

e) **p53**

p53 est un facteur de transcription clé impliqué dans la régulation de la mort cellulaire et de la survie, et du métabolisme (Beckerman & Prives, 2010). Lorsque p53 est activé par le stress cellulaire (principalement les dommages à l'ADN), p53 s'accumule dans le noyau de la cellule, où il transactive plusieurs gènes modulant l'autophagie, y compris *Dram* (damage-regulated autophagy modulator) et *Tigar* (TP53 induite par la glycolyse et le régulateur de l'apoptose) (Green & Kroemer, 2009). DRAM stimule l'accumulation des autophagosomes, en inhibant la fusion des autophagosomes avec les lysosomes et ainsi la formation des autophagolysosomes. (Crichton et al, 2006). Récemment, il a été montré que TIGAR peut moduler le niveau intracellulaire de ROS en réponse à la carence nutritionnelle ou au stress métabolique, et par conséquent inhiber l'autophagie et ceci indépendamment de mTOR (Bensaad et al, 2009). *Dram* et *Tigar* sont tous les deux transactivés par p53. Néanmoins, DRAM favorise l'autophagie alors que TIGAR l'inhibe (Tasdemir et al, 2008a). Récemment, il a été mis en évidence plusieurs isoformes de DRAM-1 (SV4 et SV5) qui régulent le processus autophagique suite à l'activation de p53 (Mah et al, 2012).

f) **Transcription Factor EB (TFEB)**

Ces dernières années, TFEB (transcription factor EB) a été décrit comme un facteur de transcription jouant un rôle important dans le contrôle de la biogenèse et de la fonction lysosomale. TFEB est un gène « Master » du réseau de coordination de la régulation de l'expression des gènes lysosomaux « CLEAR » (Coordinated Lysosomal Expression And Regulation) qui se lie à des sites cibles au niveau des séquences promotrices des gènes impliqués dans la biogenèse des lysosomes (Sardiello et al, 2009). Cependant, TFEB ne contrôle pas seulement l'expression de protéines lysosomales, il régule également le programme de transcription des gènes autophagiques au cours de la carence en nutriments (Settembre & Ballabio, 2011). La phosphorylation de TFEB est déterminante pour sa localisation cellulaire.

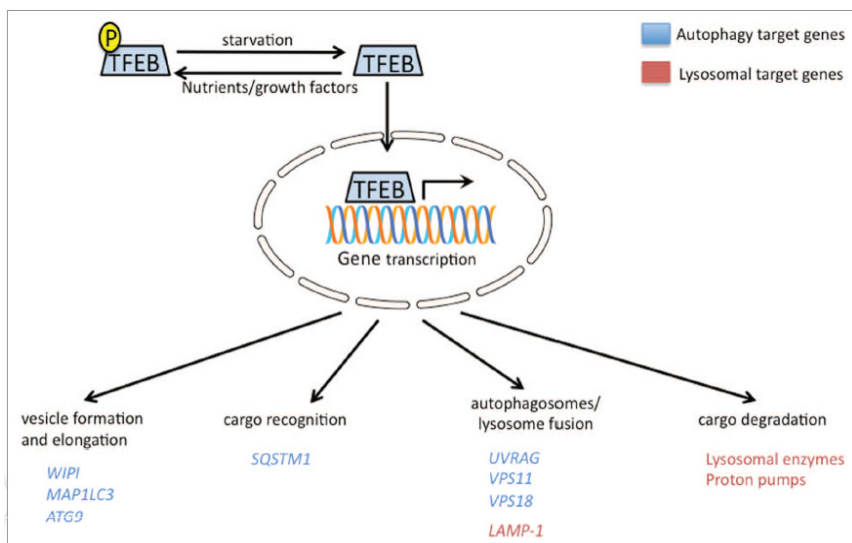


Figure 47: Modèle de régulation du réseau autophagique/lysosomal par le facteur TFEB. Dans des conditions riches en nutriments, TFEB est phosphorylé et retenu dans le cytoplasme. La carence en nutriments inhibe la phosphorylation de TFEB via les kinases ERK2, mTOR et PKC β et induit la translocation TFEB du cytoplasme vers le noyau. Dans le noyau, TFEB actif se fixe sur des séquences spécifiques et régule la transcription de gènes impliqués dans les différentes étapes du processus autophagique. (d'après Settembre C. *et al*, 2011).

Lorsqu'il est phosphorylé par la kinase ERK2 sur sa sérine 142 ou par mTORC1 sur ses sérines 142 et 211 ou par PKC β , TFEB est retenu dans le cytosol. La réduction de sa phosphorylation pendant une longue carence nutritionnelle déclenche sa translocation nucléaire où il va se fixer sur les séquences promotrices de gènes cibles activant ainsi leur transcription (**Figure 47**). Ce processus participe à l'activation de la biogénèse lysosomale et stimule l'autophagie. TFEB dispose d'un large éventail d'activités, car il contrôle l'activité des gènes impliqués dans différentes étapes de l'autophagie, y compris la formation autophagosome (*Map1lc3*, *WIPI*), la reconnaissance de la cible ubiquitinée destinée à la dégradation (*SQSTM1/p62*) et de la fusion autophagosome avec le compartiment lysosomal (*Uvrag*, *Vps11*, *VPS18*) (Settembre et al, 2013).

g) Les miRNA

Récemment, une régulation de l'autophagie par microARN a été décrite. Les microARNs, appelées aussi miRNA, sont de séquences d'ARN courtes qui jouent un rôle de régulateurs post-transcriptionnels capables d'extinction de l'expression d'un gène: leur appariement à une séquence complémentaire de l'ARN messager du gène cible conduit à la répression transcriptionnelle ou à la dégradation de cet ARNm. En effet, miR-30a cible l'ARNm de Beclin 1, régulant ainsi son expression (Zhu et al, 2009). Dans le cas de la maladie de Crohn, il a été montré grâce à l'utilisation des miRNA dirigés contre ATG16L1 et IRGM, qu'un défaut de l'autophagie est favorable à une persistance plus importante des bactéries AIEC dans les cellules épithéliales (Lapaquette et al, 2010). Depuis plusieurs miARN régulant l'autophagie en ciblant différents gènes de l'autophagie ont été mis en évidence (Comincini et al, 2013; Seca et al, 2013).

h) Autres régulateurs de l'expression des Atg

Dans les monocytes humains et les cellules de leucémie myéloïde, la vitamine D3 a été montrée comme étant capable d'induire l'autophagie par l'augmentation de la régulation de l'expression de Beclin-1 et ATG5 (Yuk et al, 2009).

Dans les hépatocytes infectés par le virus de l'hépatite B, la protéine du VHB x a été décrite pour augmenter l'autophagie par la régulation positive de l'expression de Beclin 1 (Tang et al, 2009).

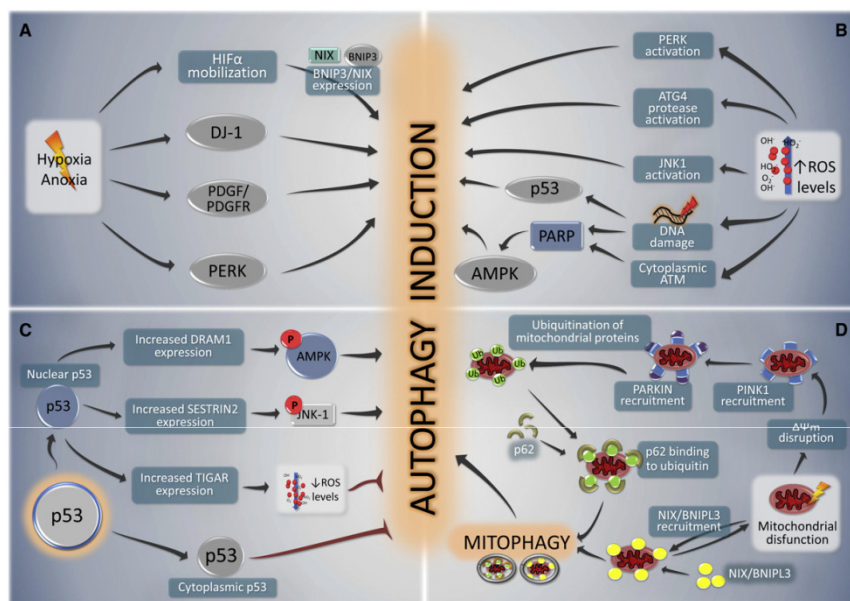


Figure 48: Vue d'ensemble des voies de stress qui induisent l'autophagie. Les mécanismes impliqués dans l'induction de l'autophagie par: (A) l'hypoxie ou anoxie, (B) l'augmentation des dommages oxydatifs (espèces réactives de l'oxygène, ROS), (C) Dommages à l'ADN ou stress métaboliques impliquant la protéine p53, et (D) dysfonctionnement mitochondrial. (d'après Levine B. *et al*, 2010).

4. Autophagie et adaptation aux différents stress cellulaires

4.1. Les stress cellulaires activateurs et signalisation

Une grande variété de stress cellulaires (carence en nutriments, absence de facteurs de croissance ou hypoxie) peut conduire à une activation de l'autophagie (**Figure 48**). L'intégration d'un grand nombre de ces signaux conduit généralement à l'inhibition de la kinase mTOR et donc à la levée de répression sur l'autophagie (Kroemer et al, 2010) mais aussi à l'activation de AMPK induisant ainsi la mise en place du processus autophagique (Levine & Ranganathan, 2010).

a) Carence en acides aminés

La carence en nutriments constitue un stress activateur majeur du processus autophagique afin de dégrader les constituants cytoplasmiques et fournir ainsi les nutriments manquants à la cellule lui permettant de faire face à la condition de stress. Dans des conditions de carence en acides aminés, en particulier ceux à chaînes ramifiées comme la leucine, afin de maintenir son homéostasie, l'organisme privilégie la protéolyse. Le foie, l'intestin et le rein sont alors les principaux donneurs d'acides aminés au cours des premières heures de jeûne chez les mammifères. Dans le foie le premier mécanisme de protéolyse mis en place est l'autophagie (Krustev, 1976). Il a été montré qu'un jeûne de 48 heures pouvait induire une perte de poids du foie pouvant atteindre 40% chez le rat ou la souris. Dans des conditions extrêmes de carence en acides aminés, la macroautophagie peut atteindre des valeurs de 4-5 % de matériel intracellulaire dégradé par heure (Mortimore & Poso, 1988). La mise en place de ce processus résulte de l'activation de certaines voies de signalisation régulées par les variations de concentration en acides aminés. La plus étudiée reste la voie impliquant la protéine kinase mTOR (Akers et al, 2012; Meijer, 2008), mais cela n'exclut pas l'importance d'autres voies de signalisation dans l'induction de l'autophagie suite à une carence en acides aminés telle que la voie eIF2 α /ATF4 (Ecker et al, 2010 ; Fougeray et al, 2012; Ye et al, 2010).

b) Carence en glucose

La carence en glucose est aussi un stress activateur de l'autophagie via l'inhibition de mTORC1. Elle induit un déséquilibre de la balance énergétique de la cellule, le rapport ATP/AMP est réduit, ce qui active la kinase senseur AMPK. Cette kinase phosphoryle alors la protéine TSC2 ce qui conduit à l'inhibition de mTORC1 (Meley et al, 2006; Shaw et al, 2004). La protéine AMPK peut aussi agir directement sur mTORC1 en phosphorylant la protéine

Raptor et participer ainsi à l'inhibition de mTORC1 indépendamment de TSC2 (Gwinn et al, 2008). En condition de concentration faible en glucose, l'enzyme Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), appartenant à la voie de la glycolyse, régule négativement la signalisation d'une autre protéine activatrice de mTORC1, la protéine Rheb (Lee et al, 2009a). Récemment des travaux ont montré une nouvelle voie de régulation de l'autophagie dépendante de la carence en glucose qui ne dépend pas du recrutement du Phosphatidylinositol 3-Phosphate (PtdIns3P) ou du WIPI2 (Mammalian Atg18) au niveau de l'omegasome ou l'autophagosome en formation mais qui nécessite la phosphorylation non seulement d'ULK1 mais également d'ULK2 (McAlpine et al, 2013).

c) **Autres stress activateurs**

L'autophagie peut être induite en présence de divers stress cellulaires tels qu'une hypoxie, un stress oxydant, un stress du RE, ou bien encore des dommages à l'ADN. Deux cas de figures sont possibles lors de ces stress : soit le processus autophagique va permettre à la cellule d'y faire face et de survivre, soit ce processus en coopération avec d'autres voies de mort cellulaire va engendrer la mort de la cellule. Parmi les protéines qui permettent de faire le lien entre stress et activation de l'autophagie, il y a la protéine REDD1 (Regulated in Development and DNA damage responses). Cette protéine est induite en réponse à une grande variété de stress (hypoxie, dommages à l'ADN, stress du RE ou bien encore la présence d'espèces oxygénées réactives), et active le complexe TSC1-TSC2, conduisant à l'inhibition de mTOR, et donc à l'activation du processus autophagique (Sofer et al, 2005 ; Whitney et al, 2009). La protéine REDD1 n'est pas la seule à intégrer ce type de signaux pour induire l'autophagie. Comme décrit précédemment, la protéine p53, dont le niveau augmente rapidement dans la cellule en réponse à de nombreux stress, en particulier les dommages à l'ADN, active la transcription de gènes cibles activant l'autophagie, tels que les gènes codant la protéine lysosomiale DRAM (Damage-Regulated Autophagy Modulator) ou la protéine Sestrin-2 (Crighton et al, 2006 ; Maiuri et al, 2009). Toutefois, la régulation de l'autophagie par p53 est à double sens tout comme celle régulée par STAT3 (Pietrocola et al, 2013). En effet, la forme cytoplasmique de la protéine p53 réprime l'autophagie en inhibant l'AMPK et en activant mTOR (Tasdemir et al, 2008b).

4.2. Stress cellulaire inhibiteur : les facteurs de croissance

Etant donné que les facteurs de croissance favorisent les processus cellulaires anaboliques, leur présence est principalement inhibitrice du flux autophagique. Cette régulation met en jeu principalement l'activation de PI3K de classe I, activées suite à la fixation de facteurs de

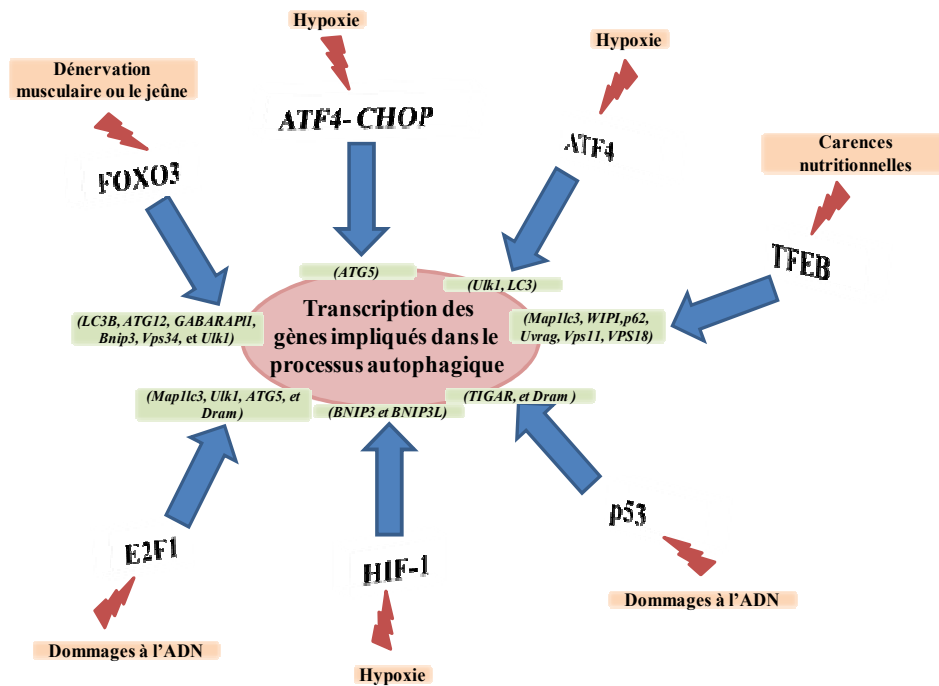


Figure 49: Facteurs de transcription connus dans la littérature pour réguler l'expression de gènes impliqués dans le processus autophagique en réponse aux différents stress cellulaires.

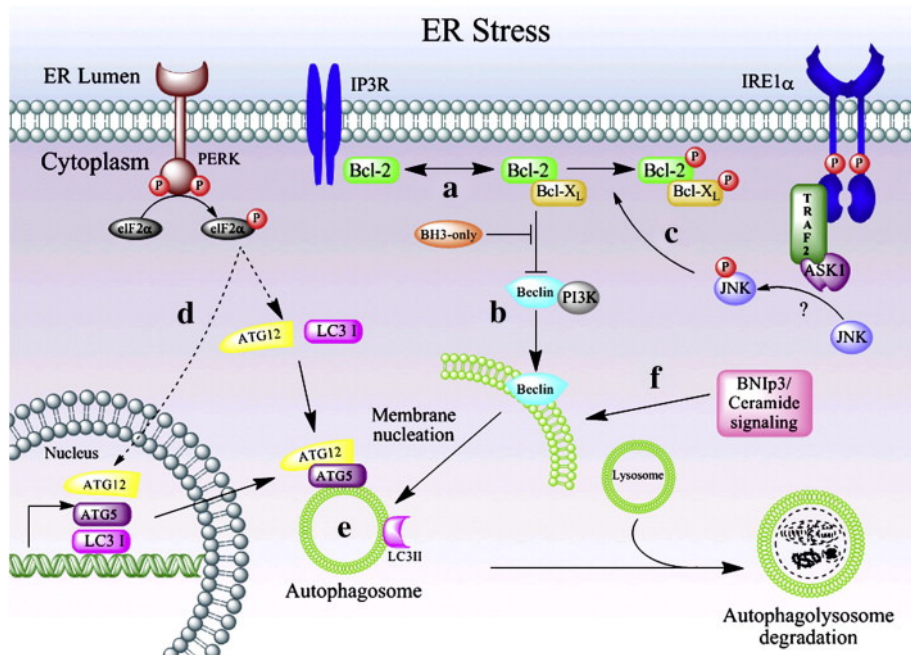


Figure 50: Régulation de l'autophagie et de ses gènes lors du stress du RE. (a) Au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, BCL-2 et BCL-XL sont associées à la modulation de l'autophagie IP3R BECLIN-dépendante. (b) Beclin-1 est régulée négativement par le biais d'une interaction avec BCL-2/BCL-XL à la membrane du RE. (c) Après le stress ER, IRE1 α et JNK sont activées, JNK peut alors phosphoryler BCL-2/BCL-XL, favorisant la formation d'autophagosomes en libérant le complexe Beclin-1/PI3K active. (d) L'activation de PERK active l'autophagie via la régulation positive de la transcription de ATG12, ATG5 et LC3. (e) Le complexe Beclin-1/PI3K initie la nucléation de la membrane par la régulation en aval du complexe ATG12-ATG5 et de la conversion de LC3-II pour former les autophagosomes. (f) régulation de l'autophagie par BNIP3 et la signalisation céramide (extrait de Rodriguez D. *et al.* 2011).

croissance sur leurs récepteurs transmembranaires. Pour exemple, suite à sa fixation sur son récepteur IGF-1R à activité tyrosine kinase, l'insuline active une PI3K de classe I, qui va produire du PIP3 à partir du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2). L'augmentation de la concentration à la membrane du PIP3 active la protéine kinase Akt, ce qui conduit à la phosphorylation et à l'inhibition de TSC2. La protéine TSC2 inhibée ne peut plus hydrolyser le GTP associé à la protéine Rheb en GDP. Or la protéine Rheb liée au GTP inhibe l'autophagie puisqu'elle active le complexe mTORC1 (Inoki et al, 2005 ; Scott et al, 1998 ; Wu et al, 2009).

4.3. Régulation transcriptionnelle de gènes de l'autophagie

Le maintien de l'autophagie lors d'un stress cellulaire implique l'exécution de programmes de transcription spécifiques qui induisent la régulation de l'expression des gènes de l'autophagie. Néanmoins, les études décrivant la régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans l'autophagie sont récentes et assez limitées (Pietrocola et al, 2013) (**Figure 49**).

a) Lors de l'activation de la voie eIF2 α /ATF4

En cas d'hypoxie qui caractérise les cellules tumorales, il a été montré que la voie PERK/eIF2 α est activée conduisant ainsi à l'augmentation de l'expression de certaines protéines pro-autophagiques, telles que LC3 et Atg5, à travers l'action des facteurs de transcription ATF4 et CHOP (Rouschop et al, 2010) (**Figure 50**). La même année, l'équipe de Harris a montré qu'une hypoxie sévère qui déclenche un stress du RE, induit la régulation de l'autophagie *via* l'augmentation de la transcription de *MAP1LC3B* (*LC3B*). Cette régulation de la transcription de *LC3* fait appel au facteur de transcription ATF4 qui se fixe sur sa séquence promotrice (Rzymiski et al, 2010).

ATF4 permet aussi la régulation de la transcription du gène codant pour la protéine ULK1 qui s'est avéré jouer un rôle important dans le processus autophagique lors d'une hypoxie sévère en permettant aux cellules cancéreuses de survivre. L'inhibition de l'expression de ULK1 induit la mort cellulaire dépendante des caspases 3 et 7 (Pike et al, 2013).

b) Lors de divers stress via différents facteurs de transcription

Comme décrit précédemment (partie 3-2, page 43), la transcription des gènes impliqués dans le processus autophagique est régulée par divers facteurs selon le stress auquel la cellule est exposée (Pietrocola et al, 2013). Par exemple, il a été montré que (1) le facteur FOXO3 régule l'expression d'*ATG4B*, *ATg12*, *ATG14*, *GABARAPL1*, *LC3B*, *Beclin-1* et *Bnip3* en réponse à un

stress oxydatif ou une carence nutritionnelle (Sengupta et al, 2009). (2) Le facteur p53 régule l'expression de *TIGAR* et *DRAM* lors d'un stress oxydatif, de dommages à l'ADN ou d'un choc osmotique (Crichton et al, 2006; Eby et al, 2010). (3) Le facteur TFEB active la transcription de plusieurs gènes impliqués dans différentes étapes de l'autophagie tels que *Map1lc3*, *WIPI*, *SQSTM1/p62*, *Uvrag*, *Vps11* et *VPS18* (Settembre et al, 2013). (4) Le facteur HIF-1 régule l'expression de BNIP3 et BNIP3L lors d'une hypoxie. (Zhang et al, 2008). (5) E2F1 régule la transcription des gènes *Map1lc3*, *Ulk1* et *Dram* en cas de dommages à l'ADN (Polager et al, 2008).

5. Autophagie et mort cellulaire

Dans la littérature, plusieurs formes de mort cellulaire programmée ont été décrites en fonction des caractéristiques morphologiques des cellules. En 1973, Schweichel et Merker ont proposé une classification distinguant trois types de mort cellulaire : le type I correspond aux cellules présentant une morphologie apoptotique dont les débris sont éliminés par les lysosomes des cellules phagocytaires, le type II correspond aux cellules nécessitant l'action des lysosomes propres à la cellule et le type III englobe tous les autres types de mort dits non-lysosomals (Schweichel & Merker, 1973). Depuis cette proposition, l'existence de deux formes principales de mort cellulaire programmée soit l'apoptose (type I de la classification de Schweichel et Merker) et l'autophagie (type II de la classification de Schweichel et Merker) est généralement admise par la communauté scientifique qui reconnaît aussi l'existence d'intermédiaires entre ces deux formes extrêmes.

5.1.L'apoptose

a) Généralité

L'apoptose ou mort cellulaire programmée, est le processus par lequel des cellules s'autodétruisent sous l'impulsion d'un signal. L'apoptose est une composante normale, génétiquement programmé qui permet le développement d'un organisme multicellulaire, et qui aboutit à la mort de cellules particulières, à certains endroits, à un moment précis ainsi qu'à l'élimination des cellules inutiles (Kerr et al, 1972). Il existe un équilibre étroit entre l'apoptose et la fabrication de nouvelles cellules ce qui permet d'éviter la prolifération cellulaire. Quand l'apoptose est altérée, d'une part les cellules qui présentent des dommages irréparables de l'ADN (télomères abimés) s'accumulent, et d'autre part, les cellules peuvent se multiplier de façon anarchique et être à l'origine de cancer (Sankari et al, 2012). L'apoptose est à différencier de la

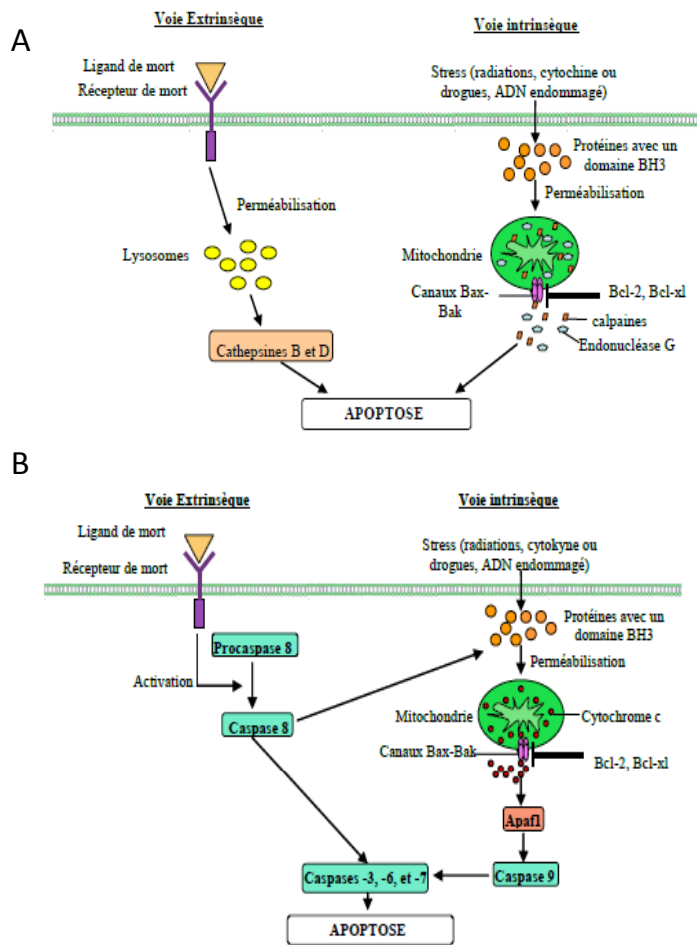


Figure 51: Voies de l'apoptose (A) extrinsèque indépendante des caspases et (B) intrinsèque dépendante des caspases.

nécrose, qui est une mort cellulaire non programmée accompagnée habituellement d'une réponse inflammatoire.

b) Mécanismes de l'apoptose

L'apoptose se caractérise au niveau cellulaire par une compaction de la chromatine et par l'invagination des membranes plasmiques. Des corps apoptotiques, qui correspondent à des fragmentations de la cellule, apparaissent et peuvent être phagocytés (Cohen, 1993; Fesus et al, 1991).

De nombreux facteurs interviennent dans l'induction de l'apoptose, mais tous aboutissent à une voie commune passant par la mitochondrie, la protéine Bcl-2 et la famille des caspases (Arends & Wyllie, 1991) (**Figure 51**). Les mécanismes génétiques et moléculaires de l'apoptose furent découverts à la fin des années 80 chez *C. elegans*. Il existe quatre étapes séquentielles dans l'apoptose : (1) l'engagement vers la mort cellulaire induit par des facteurs extra ou intracellulaires ; (2) la mort ou l'exécution de la cellule par activation de protéases intracellulaires appelées caspases (pour cystein-aspartic acid-specific proteases); (3) la phagocytose des corps apoptotiques par des macrophages; (4) la dégradation lysosomale des corps apoptotiques.

Le facteur Fas (encore appelé APO-1 ou CD95) est une protéine de la membrane cellulaire appartenant à la famille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (tumor necrosis factor, TNF). Un ligand, appelé ligand de Fas, initie la mort cellulaire programmée en se fixant sur le récepteur Fas et déclenche une cascade de signalisation cellulaire représentée par l'activation séquentielle de procaspases en caspases actives (Lavrik & Krammer, 2012). Les caspases clivent deux enzymes de réparation de l'ADN (la poly-ADP-ribose polymérase [PARP] et l'ADN-protéine kinase), et la fragmentation totale de la chromatine se produit. De plus, la protéine Bax induit la libération de cytochrome c mitochondrial dans le cytosol où il active des protéases apoptotiques supplémentaires. L'effet lésionnel de Bax sur la cellule est bloqué par la fixation de la protéine Bcl-2 sur Bax (Rupniewska & Bojarska-Junak, 2004).

L'apoptose est impliquée dans de nombreuses maladies. Un excès d'apoptose peut provoquer des maladies neuro-dégénératives telles que la maladie de Parkinson (Olanow, 2007) et la maladie d'Alzheimer (Dickson, 2004). Inversement un déficit d'apoptose peut induire des cancers (Tomek et al, 2012), des maladies auto immunes (Favaloro et al, 2012), et d'autres pathologies telles que des cardiopathies.

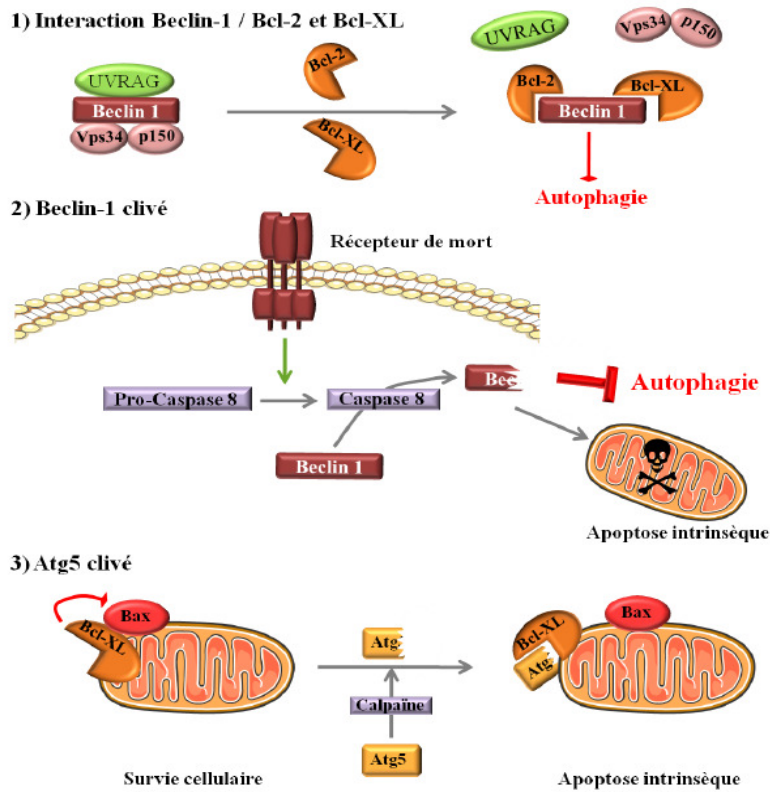


Figure 52: Exemples d'interactions entre l'autophagie et l'apoptose. (1) Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL peuvent s'associer à la protéine Beclin-1 ce qui la dissocie des protéines UVRAG, Vps34 et p150, au profit de son association en homodimère, conduisant à une inhibition de l'autophagie. **(2)** Suite à l'activation de récepteur de morts, la caspase 8 est activée et clive Beclin-1. Le produit de clivage de Beclin-1 ne peut plus activer l'autophagie et favorise l'apoptose d'origine mitochondriale. **(3)** La protéine anti-apoptotique Bcl-XL en s'hétérodimérisant avec la protéine pro-apoptotique Bax inhibe l'apoptose. Le clivage d'Atg5 par des calpaïnes génère une forme clivée d'Atg5 capable de se lier à Bcl-XL, déstabilisant ainsi les dimères Bcl-XL/Bax, et ce qui conduit donc à l'initiation du processus d'apoptose intrinsèque.

5.2. Interactions entre l'autophagie et l'apoptose

De plus en plus d'études ont permis de mettre en évidence le lien fort entre l'autophagie et l'apoptose. La découverte de l'interaction de la protéine Beclin-1 avec la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Liang et al, 1998) a été le premier déclencheur. Bcl-2 se lie à Beclin-1, conduit à une déstabilisation du complexe Beclin1-Vps34, favorise l'association de Beclin-1 en homodimère, ce qui le rend inactif et inhibe ainsi l'autophagie (Noble et al, 2008; Pattingre et al, 2005). La protéine Bcl-2, tout comme les protéines de la même famille telle que Bcl-B, en plus de son rôle inhibiteur sur l'apoptose, réduirait l'autophagie dans la cellule à un niveau compatible avec la survie de la cellule (Robert et al, 2012) (**Figure 52**). Par ailleurs, l'activation de la caspase 8 (suite à une activation de récepteurs de mort) induit le clivage de la protéine Beclin-1, qui ne peut alors plus jouer son rôle activateur de l'autophagie. De plus, le fragment C-terminal de Beclin-1 (Beclin-1 C) généré par ce clivage favorise l'apoptose par la voie mitochondriale (Djavaheri-Mergny et al, 2010).

On retrouve également au carrefour de la régulation entre apoptose et autophagie la protéine Atg5, qui est une protéine cruciale pour l'élongation du phagophore. En effet, un clivage d'Atg5 dépendant de protéases de la famille des calpaïnes produit une forme tronquée d'Atg5 (24 kDa contre 33 kDa pour la forme native) (Yousefi et al, 2006). Celle-ci est alors relocalisée du cytoplasme vers la membrane mitochondriale, s'associe à la protéine anti-apoptotique Bcl-XL, avec pour conséquence une déstabilisation des hétéro-dimères Bcl-XL / Bax. La protéine pro-apoptotique Bax libérée de Bcl-XL, pourrait s'associer en homo-dimère et activer la voie d'apoptose intrinsèque. La surexpression d'Atg5 rend plus sensibles des cellules tumorales à des molécules anticancéreuses (Leng et al, 2013).

D'autres études ont montré que l'activation de la caspase-3 clive et active Atg4D, une enzyme qui catalyse la délipidation de la GABARPL1. Cette augmentation de l'activation protéolytique d'Atg4D cible les mitochondries via un domaine putatif BH3 et renforce son activité cytotoxique (Betin & Lane, 2009a; Betin & Lane, 2009b).

Enfin, un autre point d'interaction entre l'autophagie et l'apoptose met en jeu la protéine DRAM, dont le gène est régulé par la protéine p53. Il a été montré que l'apoptose déclenchée par p53 dans des cellules d'ostéosarcomes Saos2 est dépendante d'une induction d'autophagie par DRAM, suggérant une interdépendance des deux voies dans certains contextes cellulaires (Crighton et al, 2006).

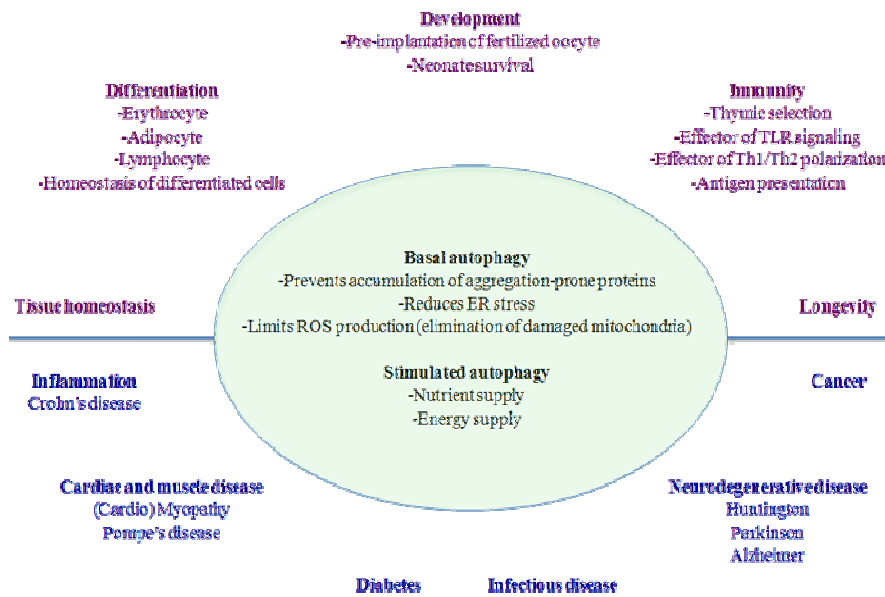


Figure 53: Implications physiologiques et pathologiques de l'autophagie. (D'après Mehrpour M. et al, 2012)

5.3.L'autophagie : mort cellulaire programmée de type II

Très tôt après la découverte de l'apoptose, il est apparu que la mort cellulaire pouvait mettre en jeu d'autres mécanismes. La mort autophagique, ou mort programmée de type II (par opposition à l'apoptose ou mort de type I), est caractérisée par une accumulation massive de vacuoles autophagiques, et dans ce cas précis, la mort cellulaire pourrait être la conséquence d'une destruction massive des constituants cellulaires due à un processus d'autophagie exacerbé. Cependant, l'autophagie peut aussi participer à l'activation ou à l'amplification des signaux de mort de type apoptotique ou nécrotique (Schwartz et al, 1993). L'un des mécanismes proposés pour expliquer la mort autophagique est la séquestration et la dégradation spécifique de facteurs vitaux de la cellule, comme cela a été montré pour la catalase, une enzyme anti-oxydante et par conséquent cytoprotectrice (Yu et al, 2006).

Il existe à l'heure actuelle peu de données permettant de mettre en évidence le rôle de l'autophagie dans la mort cellulaire *in vivo*, et ce n'est que récemment, grâce à l'invalidation de gènes *atg* chez le nématode *C. elegans*, que ce rôle a pu être démontré. Dans cette étude, les auteurs ont montré qu'un niveau d'autophagie physiologique permet la survie optimale des individus carencés en nutriments, alors qu'un niveau insuffisant ou très élevé d'autophagie contribuerait à leur mort (Kourtis & Tavernarakis, 2009 ; Melendez & Levine, 2009). L'autophagie est également nécessaire pour la dégradation des composants appelés P-granules (granules germinales chez *C. elegans*) dans les cellules somatiques des embryons précoces et pour la distribution spécifique de P-granules de cellules germinales (Sato & Sato, 2013). La mort par macroautophagie joue un rôle crucial dans certains processus physiologiques, notamment lors de la morphogenèse des membres des vertébrés et leur embryogénèse (Yang et al, 2013). La mort par autophagie peut également être induite en réponse à divers stimuli inducteurs de la mort dans des contextes cellulaires variés et dans le cas de pathologies différentes (neurones, cellules cancéreuses, etc) (Shen & Codogno, 2011).

6. Dérégulation de l'autophagie et pathologies

L'équilibre du processus autophagique dans les cellules est fondamental (Choi et al, 2013). En effet, l'inhibition de l'autophagie basale permettant un « contrôle qualité » intracellulaire, mais aussi l'activation excessive de l'autophagie sont délétères et entraînent le développement notamment de pathologies neurodégénératives, cancéreuses ou inflammatoires (Jing & Lim, 2012) (**Figure 53**). L'autophagie pourrait donc constituer une cible thérapeutique intéressante.

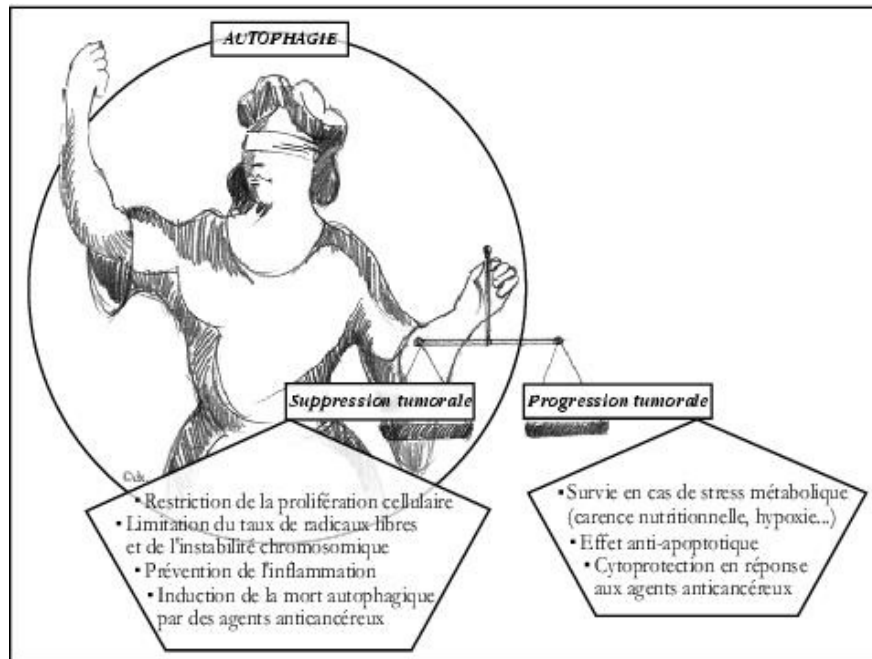


Figure 54: Rôle de l'autophagie dans la suppression et la progression tumorale. (d'après Lorin S. *et al*, 2008).

6.1. Le cancer

L'autophagie joue deux rôles antagonistes dans la régulation et la mise en place du processus tumoral. En effet, le dysfonctionnement de l'autophagie a été corrélé avec le développement du cancer. Par exemple, la délétion mono-allélique du gène *Beclin-1* a été observée dans 40-75% des cancers du sein, ovarien, et de la prostate (Mathew et al, 2007; Morselli et al, 2009). Même s'il semble paradoxal qu'un mécanisme impliqué dans la survie cellulaire soit anti-tumoral (**Figure 54**), certaines fonctions «anti-tumorales» de l'autophagie ont été proposées, notamment la capacité de limiter l'instabilité génomique, la diminution du stress oxydant, de la nécrose intra-tumorale et de l'inflammation locale (Mathew & White, 2007; Morselli et al, 2009).

a) Rôle anti-tumoral

La tumorigenèse et l'autophagie sont deux phénomènes dont les voies de régulation sont très intriquées. La majorité des données montrent qu'il y a une forte corrélation entre les molécules impliquées dans la régulation de l'autophagie et la suppression tumorale. En effet, plusieurs gènes suppresseurs de tumeur tels que PTEN, TSC1, TSC2 et p53, interviennent dans l'inhibition de la voie mTOR et stimulent l'autophagie. Inversement, des oncogènes tels que les PI3K de classe I et Akt activant mTOR, et Bcl-2 inhibent l'autophagie (Levine & Kroemer, 2008). L'un des premiers travaux qui a mis en évidence l'implication des gènes de l'autophagie dans la suppression tumorale a été réalisée en 1999. Il a été montré que, dans un pourcentage élevé de cancers humains du sein, des ovaires et de la prostate, l'expression du gène *Beclin-1* est monoallélique et que l'expression de la protéine Beclin-1 est diminuée dans des tumeurs humaines du sein, des ovaires et du cerveau (Liang et al, 1999). De plus, l'haploinsuffisance du gène *Beclin-1* favorise la tumorigenèse dans divers tissus de souris transgéniques (Qu et al, 2003). La croissance tumorale peut être ainsi inhibée par une induction de l'autophagie (White, 2012).

b) Rôle pro-tumoral

L'autophagie peut avoir aussi une fonction de survie pour les cellules tumorales. C'est le cas notamment pendant le stade précoce de la croissance de certaines tumeurs solides, lorsque l'insuffisance de la vascularisation des cellules tumorales limite l'apport en nutriments et en oxygène (Levine, 2007). Le mécanisme qui induit l'autophagie dans ces conditions n'est pas

connu mais pourrait faire intervenir l'activation de l'AMPK et de HIF-1 (Meijer & Codogno, 2009).

Certaines protéines impliquées dans l'autophagie semblent jouer également un rôle dans la tumorigénèse telles que la protéine p62. En effet, le niveau d'expression de l'ARNm de p62 et l'expression protéique de p62 sont augmentés dans des tumeurs pulmonaires et dans des cellules murines transformées avec une oncoprotéine (Moscat & Diaz-Meco, 2012). Néanmoins, p62 pourrait également agir comme un suppresseur de tumeur en contrôlant la mort cellulaire et le cycle cellulaire (Nezis & Stenmark, 2012).

L'autophagie pourrait donc, à la fois, inhiber l'initiation du processus cancéreux en éliminant les substrats protéiques oncogènes, les protéines mal conformées toxiques et les organites endommagés comme certaines mitochondries, et aussi favoriser la croissance d'un cancer déjà établi en recyclant les composants intracellulaires afin de fournir des substrats pour le métabolisme et le maintien des fonctions cellulaires, et ainsi améliorer la survie cellulaire (White, 2012). La mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques antitumorales ciblant l'autophagie est donc délicate car l'induction de ce processus peut stimuler la prolifération des cellules cancéreuses.

6.2. Les maladies neurodégénératives

L'autophagie a été décrite comme jouant une fonction protectrice au cours des neuropathies dégénératives (Son et al, 2012). En effet, des souris invalidées pour l'expression des gènes *Atg5* ou *Atg7* spécifiquement dans les cellules neuronales, montrent une dégénérescence neuronale sévère, un déficit de la fonction motrice et accumulent des agrégats protéiques polyubiquitinés dans le cytoplasme ((Komatsu et al, 2006); (Hara et al, 2006)). Il a aussi été montré que l'autophagie intervient dans la protection des cellules neuronales, en complément du système ubiquitine-protéasome, en dégradant les agrégats protéiques cytosoliques constitués de protéines mutées retrouvées dans plusieurs maladies neurodégénératives, notamment la huntingtine mutée due à une expansion de polyglutamine dans la maladie de Huntington (Ravikumar & Rubinsztein, 2004), la protéine tau mutée dans la maladie d'Alzheimer (Kruger et al, 2012), et l' α -synucléine mutée dans la maladie de Parkinson (Lynch-Day et al, 2012). Dans certains cas, le processus d'autophagie peut être submergé à cause d'une accumulation trop importante de ces protéines mutées. Dans la maladie d'Alzheimer, des autophagosomes s'accumulent dans les neurones atteints suggérant que la fusion autophagosomes-lysosomes ne se fait plus et que l'autophagie n'est plus efficace (Meijer & Codogno, 2009).

L'autophagie peut donc être une cible thérapeutique très intéressante dans le traitement des maladies neurodégénératives. La stimulation de ce processus protecteur dans les neurones défectueux pourrait favoriser l'élimination des agrégats protéiques qui s'accumulent dans le cytoplasme. L'utilisation de la rapamycine, un inhibiteur de mTOR et donc un activateur de l'autophagie, et d'un analogue de la rapamycine, dans un modèle murin ou cellulaire de maladie de Huntington ou de maladie de Hutchinson-Gilford a permis de réduire l'accumulation d'agrégats protéiques insolubles et donc d'améliorer la survie des neurones en réduisant la dégénérescence de ces cellules (Wyttenbach et al, 2008). Toutes ces études montrent qu'une meilleure compréhension des mécanismes autophagiques afin de les moduler semble être une bonne cible thérapeutique des maladies neurodégénératives (Johnson et al, 2012).

6.3. Les maladies infectieuses et/ou inflammatoires et l'immunité

a) Autophagie et infections

La sur-expression ou l'inhibition de l'expression de gènes ATG ont montré l'importance de l'autophagie dans le contrôle de l'élimination d'agents infectieux, dont les virus. L'autophagie joue un rôle de défense innée en favorisant la dégradation de composants viraux, la lutte contre les infections bactériennes, parasitaires et virales. En effet, l'autophagie entraîne la dégradation, via les lysosomes, des pathogènes intracellulaires séquestrés dans les autophagosomes (Dreux & Chisari, 2010). Ce phénomène, appelé xénophagie, a été observé dans des macrophages infectés par *Mycobacterium tuberculosis*, l'agent de la tuberculose (Gutierrez et al, 2004), dans des macrophages activés infectés par *Toxoplasma gondii* (Ling et al, 2006) ainsi que dans des fibroblastes embryonnaires murins ou les cellules neuronales infectées par l'Herpes Simplex Virus de type 1 ((Pei et al, 2011); (Yordy et al, 2012)). L'identification précise des mécanismes autophagiques dans la défense des cellules contre les agents infectieux est donc importante pour l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques au cours des maladies infectieuses. Cependant, certains pathogènes peuvent développer des mécanismes pour contourner l'autophagie, notamment, grâce à la production molécules qui vont masquer les sites d'adressage qui ne seront donc plus reconnus par l'ubiquitine et ne seront plus dirigés vers la voie de dégradation autophagique dépendante de p62 ou grâce à l'inhibition de l'étape d'initiation de l'autophagie (Joubert et al, 2011).

Enfin, certains agents pathogènes peuvent mettre à profit l'autophagie en l'utilisant pour assurer leur prolifération. C'est le cas notamment du virus de l'hépatite C qui se sert des

protéines Beclin-1 et Atg7 pour initier sa réplication voire même pour assembler ses particules virales (Dreux & Chisari, 2011).

b) Autophagie et immunité

Le processus autophagique joue un rôle important dans la régulation de l'immunité innée et adaptative (Liu et al, 2013). Lors d'une infection, les cellules hôtes détectent des composants d'origine virale, bactérienne ou parasitaire appelés PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Pattern) par l'intermédiaire de récepteurs de l'immunité innée connus sous le nom de PRR (Pattern Recognition Receptor). L'activation des PRR stimule l'autophagie puis l'élimination des agents pathogènes par xénophagie (Sumpter & Levine, 2011).

L'autophagie joue un rôle important au cours de l'immunité adaptative. Elle induit la production de peptides antigéniques microbiens ou endogènes via les lysosomes et favorise leur prise en charge par les molécules du CMH de classe II (Romao et al, 2013). Il a été montré que l'inhibition, pharmacologique ou génétique, de l'autophagie réduit l'efficacité de la présentation antigénique par les molécules du CMH de classe II (Levine & Deretic, 2007). L'autophagie pourrait jouer un rôle clé dans les réponses immunes innée et acquise, dans le contrôle de l'infection mais aussi dans les maladies auto-immunes car elle régule la prise en charge de l'antigène et sa présentation. Ainsi, une inhibition ou une activité trop faible du processus autophagique pourrait diminuer la présentation antigénique ce qui limiterait l'activation de la réponse immune acquise et favoriserait l'apparition de maladies infectieuses (Zhou, 2012 #2323). En revanche, une activité trop élevée de l'autophagie pourrait entraîner la présentation non appropriée de molécules endogènes qui seraient reconnues comme étrangères par le système immunitaire et prédisposerait aux maladies auto-immunes (Bhattacharya & Eissa, 2013).

c) Autophagie et inflammation

La machinerie autophagique joue un rôle majeur dans le contrôle de l'inflammation. L'autophagie intervient dans la régulation des réponses transcriptionnelles inflammatoires notamment *via* l'activation du facteur de transcription pro-inflammatoire NF- κ B (Mathew et al, 2009). De plus, l'autophagie inhibe l'inflammasome NLRP3, un complexe multiprotéique qui active la caspase-1 qui peut être activé par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites par les mitochondries endommagées. L'autophagie dégrade ces organites endommagés réduisant l'activation de l'inflammasome et inhibant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et l'IL-18 (Zhou et al, 2011). Le processus autophagique peut aussi contrôler la

sécrétion de l'IL-1 β en ciblant la pro-IL-1 β et en la dégradant via les lysosomes (Harris, 2011). Ce processus permet également d'éviter le développement d'une réponse inflammatoire en éliminant les corps apoptotiques au cours de la mort cellulaire afin d'empêcher la nécrose et la production de signaux de danger (DAMPs) qui stimulent l'inflammation (Levine et al, 2011).

Plusieurs études ont décrit un rôle double de l'autophagie dans l'établissement de l'inflammation dans le contexte de l'obésité. D'un côté, un défaut d'autophagie augmente et entretient le stress RE causé par l'excès d'alimentation, ce qui contribue au développement d'une insulino-résistance (Codogno & Meijer, 2010; Yang et al, 2010). De l'autre côté, il a été montré que, dans les adipocytes, l'induction d'un stress RE est suffisante à induire une dégradation de l'adiponectine, adipokine anti-inflammatoire, dépendante de l'autophagie (Zhou & Liu, 2010).

Enfin, plusieurs gènes de susceptibilité aux maladies inflammatoires chroniques telle que la maladie de Crohn, ont été décrits comme étant en lien direct avec la voie de l'autophagie comme *ATG16L1*, *IRGM* (*Immunity Related GTPase M*) et *NOD2* (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2*) (Xavier et al, 2008). Les récentes études d'analyse du génome ont permis d'associer 2 gènes, *ATG16L1* et *IRGM*, codant pour des protéines directement impliquées dans l'autophagie comme gènes de susceptibilité à la maladie de Crohn (Nguyen et al, 2013).

CONCLUSION

Chez les mammifères, l'autophagie est à la fois un processus basal qui permet le renouvellement des constituants cytosoliques afin d'éviter le vieillissement cellulaire, mais c'est aussi un mécanisme de survie qui permet à la cellule de faire face à divers situations de stress de courtes durées qui perturbent son homéostasie telles que l'hypoxie, les dommages à l'ADN et les carences nutritionnelles. Lorsque ces stress persistent et la cellule ne peut plus s'adapter, des processus de mort cellulaires tel que l'apoptose sont déclenchés.

Lors d'une carence en acides aminés, l'un des mécanismes d'adaptation mis en route par l'organisme consiste à déclencher une protéolyse, notamment par autophagie afin de libérer des acides aminés à partir des protéines et permettre à la cellule de survivre lors de ces conditions. Plusieurs gènes sont impliqués dans le processus autophagique, appelés ATG (Autophagy Related Genes). Les mécanismes impliqués dans la régulation transcriptionnelle de ces gènes sont encore très mal connus et avaient fait l'objet de quelques études qui traitaient de la régulation du processus autophagique lors d'une hypoxie ou de dommages à l'ADN. Cependant les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation transcriptionnelle des gènes de l'autophagie lors d'une carence en acides aminés restent encore à élucider.

Au niveau cellulaire, une carence en un acide aminé indispensable active en particulier la voie GCN2/eIF2 α /ATF4, qui conduit à la fois à une inhibition de la synthèse protéique globale et à l'induction de la transcription de gènes cibles spécifiques. De ce fait, il apparait important d'étudier le rôle de la voie eIF2 α /ATF4 dans la régulation des gènes impliqués dans le processus autophagique lors d'une carence de courte durée en acides aminés.

Lors d'un stress cellulaire prolongé, la voie eIF2 α /ATF4/CHOP est décrite comme étant impliquée dans la régulation de la mort cellulaire par apoptose et CHOP comme un acteur proapoptotique. D'autre part, quelques études ont mis en évidence l'interaction entre les processus autophagique et apoptotique. De ce fait, il semble important d'étudier le rôle séquentiel de la voie eIF2 α /ATF4/CHOP dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans l'autophagie et l'apoptose lors d'une carence prolongée en acides aminés.



Résultats expérimentaux



Publication 1

B'chir W, Maurin AC, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, Parry L, Stepien G, Fafournoux P and Bruhat A. (2013)

“The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression”

Nucleic Acids Res. 2013 Sep 1;41(16):7683-99.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Publication 1

Rôle clé de la voie eIF2 α /ATF4 dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans l'autophagie en réponse à un stress cellulaire

1. Introduction

Le projet dans lequel s'inscrit mon travail de thèse vise à mieux comprendre, chez les mammifères, le rôle de la voie eIF2 α /ATF4 dans la régulation de la transcription des gènes de l'autophagie lors d'un stress cellulaire ; principalement une carence en acides aminés. Comme décrit dans la partie bibliographie, l'autophagie fait partie des processus physiologiques qui participent à l'homéostasie cellulaire et permet à la cellule de survivre dans des conditions de stress environnementaux (une carence en acides aminés, des conditions d'hypoxie ou bien encore des dommages à l'ADN). Afin d'intégrer cette grande variété de stress et ajuster finement l'intensité de la réponse autophagique, de nombreux senseurs et intermédiaires moléculaires vont participer à la régulation de la réponse autophagique. Néanmoins, l'étude de la régulation transcriptionnelle des gènes de l'autophagie lors des stress cellulaires reste assez limitée, et celle lors d'une carence en acides aminés quasi inexistante. Etant donné que la voie eIF2 α /ATF4 est parmi les voies majeures activées lors d'une carence en acides aminés, il semblait intéressant d'étudier le rôle qu'elle pourrait jouer dans la régulation de la transcription des gènes de l'autophagie lors d'une carence en acides aminés et plus généralement lors d'un autre stress activateur de cette même voie, tel que le stress du réticulum endoplasmique.

2. Stratégie expérimentale

Toutes les expériences ont été effectuées sur des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs). D'autres types cellulaires ont été testés (HepG2 et Hela) dans les quelles les mêmes résultats ont pu être observés. Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé le modèle de carence en un acide aminé indispensable, la leucine comme modèle d'étude. D'autres acides aminés indispensables (Méthionine et Lysine) ont été testés afin de confirmer les résultats observés lors

de cette carence, ainsi que d'autres stress cellulaires activant la même voie de signalisation tel que le stress du réticulum endoplasmique. Le gène *p62* qui code pour une protéine qui joue un rôle clé dans le processus autophagique a été choisi comme gène modèle d'étude. Les résultats observés ont été confirmés dans la régulation de l'expression des différents gènes de l'autophagie au cours d'une carence en leucine.

2.1. Les cellules en culture

Afin de réaliser nos expériences, nous avons utilisé des cellules en culture. Des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) obtenus à partir de souris invalidées pour certains gènes spécifiques (*GCN2*, *ATF4*, *CHOP*, *PERK*), ce qui nous a permis de caractériser le rôle de chacun de ces gènes dans notre modèle d'étude. Ces lignées cellulaires restent un modèle de choix pour caractériser le rôle de ces protéines dans notre étude.

2.2. La carence en leucine

La leucine a été choisie comme acide aminé carencé durant les expériences de culture cellulaire pour plusieurs raisons. Tout d'abord, condition primordiale, la leucine est un acide aminé indispensable chez les mammifères. Ensuite, son transport à travers la membrane plasmique est rapide grâce à un système passif spécifique (système L), permettant d'obtenir un équilibre de concentration rapide entre les milieux intra- et extra-cellulaires. Enfin, la leucine n'est pas métabolisée par les cellules utilisées dans nos expériences et est essentiellement utilisée pour la synthèse protéique. De ce fait, même un long temps de carence partielle (par exemple 16 heures) ne va pas entraîner une diminution significative de la concentration en leucine dans le milieu contrôle de culture. De plus, les effets observés ne pourront être attribués à la modification d'une voie métabolique dans laquelle la leucine serait impliquée. D'autres acides aminés indispensables tels que la méthionine et la lysine ont été testés afin de confirmer les résultats observés lors d'une carence en leucine.

2.3. p62

p62 (Sequestosome 1, SQSTM1) est une protéine qui reconnaît et lie les protéines ubiquitinées, destinées à la dégradation. Elle est impliquée dans la signalisation cellulaire, le stress oxydatif et l'autophagie (Bjorkoy et al, 2006; Kirkin et al, 2009; Komatsu et al, 2010; Seibenhener et al, 2007). Elle a d'abord été identifiée comme une protéine qui se lie au domaine SH2 de p56lck (Joung et al, 1996), puis comme protéine interagissant avec PKC ζ (Sanchez et al, 1998). Les agrégats de protéines liées par p62 peuvent être dégradés par l'autophagosome

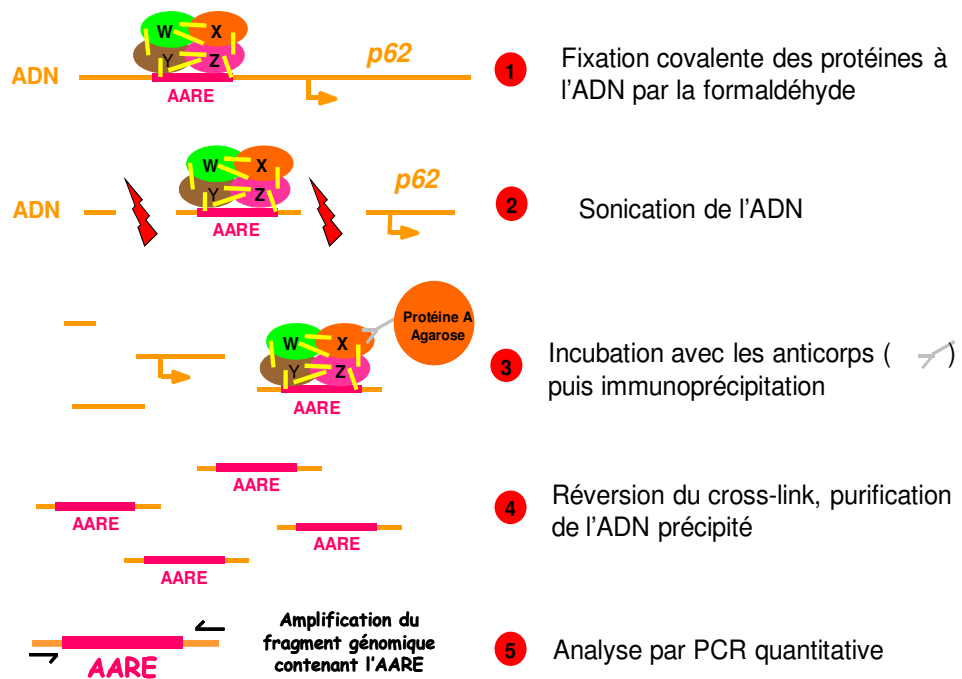


Figure 55: Technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Après avoir fixé les protéines liées à l'ADN (1), celui-ci est soniqué en fragment d'environ 500pb (2). Les fragments sont ensuite incubés en présence d'un anticorps spécifique de la protéine à étudier (3) et les complexes immuns sont précipités. Enfin, après réversion du cross-link, l'ADN est purifié (4) et analysé par PCR quantitative.

((Bjorkoy et al, 2005); (Komatsu et al, 2007)). p62 se lie à la protéine de membrane autophagosomale LC3/Atg8, permettant ainsi l'internalisation du complexe p62-protéine ubiquitinée dans la lumière de l'autophagosome (Pankiv et al, 2007). La dégradation de l'autophagolysosome conduit à une diminution du niveau protéique de p62 au cours de l'autophagie, et à l'inverse, les inhibiteurs de l'autophagie stabilisent son niveau. La protéine p62 et LC3 demeurent les marqueurs les plus utilisés pour étudier le processus autophagique dans la littérature.

3. Principale technique utilisée: la ChIP (Immuno-Précipitation de la Chromatine)

Une partie des résultats obtenus dans cet article l'ont été en utilisant la technique de ChIP (**Figure 55**). Au cours de cette technique, les complexes multiprotéiques au niveau de l'ADN sont fixés de façon covalente par l'utilisation de formaldéhyde, puis l'ADN est extrait et soniqué en fragments d'environ 500 paires de bases. Ces fragments d'ADN sont alors incubés en présence d'anticorps dirigés contre les protéines que l'on veut étudier (ATF4, CHOP, CEBP/β) (Collas & Dahl, 2008). Les complexes immuns ainsi formés et après réversion du crosslink sont ensuite précipités. Les fragments d'ADN obtenus sont par la suite purifiés. Enfin, l'analyse des fragments précipités se fait par PCR quantitative, dans notre cas avec un appareil CFX96 de Bio-Rad. La quantité d'ADN précipité sera ainsi le reflet du taux de fixation de la protéine étudiée sur le fragment d'ADN analysé. Pour réaliser ces expériences, des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) ont été mises en culture dans un milieu complet ou carencé en leucine pendant 6 heures.

4. Publication

B'chir W, Maurin AC, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, Parry L, Stepien G, Fafournoux P and Bruhat A.

“The eIF2α/ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression”.
Nucleic Acids Res. 2013 Sep 1;41(16):7683-99.

+ Supplementary data

The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression

Wafa B'chir^{1,2}, Anne-Catherine Maurin^{1,2}, Valérie Carraro^{1,2}, Julien Averous^{1,2}, Céline Jousse^{1,2}, Yuki Muranishi^{1,2}, Laurent Parry^{1,2}, Georges Stepien^{1,2}, Pierre Fafournoux^{1,2} and Alain Bruhat^{1,2,*}

¹INRA, UMR 1019 Nutrition Humaine, Centre de Clermont-Ferrand-Theix, F-63122 Saint Genès Champanelle, France and ²Université Clermont 1, UFR Médecine, UMR 1019 Nutrition Humaine, Clermont-Ferrand, France

Received March 2, 2013; Revised May 27, 2013; Accepted June 4, 2013

ABSTRACT

In response to different environmental stresses, eIF2 α phosphorylation represses global translation coincident with preferential translation of ATF4, a master regulator controlling the transcription of key genes essential for adaptative functions. Here, we establish that the eIF2 α /ATF4 pathway directs an autophagy gene transcriptional program in response to amino acid starvation or endoplasmic reticulum stress. The eIF2 α -kinases GCN2 and PERK and the transcription factors ATF4 and CHOP are also required to increase the transcription of a set of genes implicated in the formation, elongation and function of the autophagosome. We also identify three classes of autophagy genes according to their dependence on ATF4 and CHOP and the binding of these factors to specific promoter *cis* elements. Furthermore, different combinations of CHOP and ATF4 bindings to target promoters allow the trigger of a differential transcriptional response according to the stress intensity. Overall, this study reveals a novel regulatory role of the eIF2 α -ATF4 pathway in the fine-tuning of the autophagy gene transcription program in response to stresses.

INTRODUCTION

Mammalian cells have evolved complex signaling pathways that mediate the cellular response to stresses including UV irradiation, hypoxia, endoplasmic reticulum (ER) stress and deprivation of nutrients. These pathways initiate a wide array of adaptative mechanisms and ultimately, if necessary, programmed cell death (1,2). Reversible phosphorylation on serine 51 of the α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α) is a highly conserved regulatory event activated in response to diverse stresses (3). In mammals, four protein kinases

are known to couple distinct upstream stress signals to eIF2 α phosphorylation. Of these, PERK (PKR-like eukaryotic initiation factor 2 α kinase) is activated by misfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER stress) (4) while GCN2 (general control nonderepressible 2) is activated by uncharged tRNAs (5–7) and allows cells to adapt to amino acid starvation. The phosphorylation of eIF2 α decreases translation of most mRNAs by inhibiting delivery of the initiator Met-tRNA_i to the initiation complex. However, it also favors increased translation of a selected number of mRNAs containing short upstream open reading frames (8). One of the proteins for which translation is increased is activating transcription factor 4 (ATF4), a member of the ATF subfamily of the basic leucine zipper (bZIP) transcription factor superfamily (9). ATF4 is a master regulator that plays a crucial role in the adaptation to stresses by regulating the transcription of many genes (3,10–12).

ATF4 triggers increased transcription by binding to C/EBP-ATF Response Element (CARE) sequences of a subset of specific target genes (13–15). In the context of amino acid starvation, the CAREs called Amino Acid Response Elements (AARE) have a 9 bp core element, but the sequences can differ by one or two nucleotides between genes (16,17). Besides ATF4, several other bZIP transcription factors are bound to the AARE sequences, including CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β), activating transcription factor 2 (ATF2), activating transcription factor 3 (ATF3) and C/EBP-homologous protein (CHOP) (18). In particular, all of the known AARE sites bind ATF4 whereas the binding activity and the role of the other bZIP proteins appear to vary according to the AARE sequence and chromatin structure. Therefore, a highly coordinated time-dependent program of interaction between ATF4 and a precise set of bZIP family members and coactivators lead to transcriptional activation of amino acid-regulated genes (19–21). One major role of ATF4 is to mediate the induction of a gene expression program referred to as the Integrate Stress Response

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 4 73 62 41 50; Fax: +33 4 73 62 47 55; Email: alain.bruhat@clermont.inra.fr

(ISR), involved in amino acid metabolism, differentiation, metastasis, angiogenesis, resistance to oxidative stress (2) and drug resistance (22). In addition, several ATF4 target genes, such as *Chop*, are themselves transcription factors that regulate the expression of a set of stress-induced target genes and amplify the signal initiated by the original stress (1,23,24).

Autophagy is a highly evolutionary conserved cellular process of lysosomal degradation of proteins and organelles (25,26). It is involved in the renewal of cellular organelles and in the maintenance of energy levels, protein synthesis and essential metabolic processes through the recycling of amino acids and nutrients (27). This cellular process has been shown to be an important player in response to multiple stresses such as nutrient starvation, damaged organelles and unfolded protein aggregation and has therefore been implicated in numerous diseases including cancer and neurodegenerative pathologies (28,29). In addition, several studies have shown that autophagy is activated to act as a survival mechanism in cells exposed to ER stress and that the survival response is specifically induced to trigger the initiation of autophagosome formation (30–32). Several lines of evidence suggest that the eIF2 α /ATF4 pathway could play a key role in autophagy regulation. It has been recently reported that ER stress and severe hypoxia induce the transcription of the essential autophagy gene *Map1lc3b* through the activity of ATF4 (22,33,34). This upregulation was shown to be crucial for maintaining high levels of autophagic flux in persistent hypoxia and thus promotes cell survival. In the context of amino acid starvation, it was reported that GCN2 kinase activation and eIF2 α phosphorylation are required to induce autophagy in yeast and in mammals (35,36). The precise mechanisms by which the eIF2 α /ATF4 pathway contributes to the regulation of autophagy are not yet well known and ATF4-target genes involved in this cellular process remain to be identified (32).

In mammals, a large number of genes involved in autophagy processes have recently been identified. These autophagy genes include autophagy-related (Atg) genes previously described in yeast (37) and genes encoding autophagic adapters (38). However, the mechanisms involved in the regulation of their expression are still poorly understood. Our goal was to investigate the role of the eIF2 α /ATF4 pathway in the stress-regulated transcription of autophagy genes in mammalian cells. In a preliminary experiment of amino acid-regulated gene screening, we reported that the expression of *p62*, an important marker of autophagy, was dramatically induced in response to amino acid starvation in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) (39). *p62* also known as sequestosome1/SQSTM1, is an autophagic adapter that acts as a cargo receptor for degradation of ubiquitinated substrates (38,40). *p62* possesses a short LC3-interacting region that facilitates direct interaction with MAP1LC3B- and GABARAP-family members and causes *p62* to be continuously and specifically degraded by autophagy (41–43). Up to now, the molecular mechanisms involved in the transcriptional activation through the eIF2 α /ATF4

pathway of autophagy genes like *p62* remained poorly understood.

In the present study, we demonstrate that the eIF2 α /ATF4 pathway directs an autophagy gene transcriptional program in response to amino acid starvation or ER stress. We show that the eIF2 α kinases GCN2 and PERK and the transcription factors ATF4 and CHOP are also required to increase the transcription of a set of genes implicated in the formation, elongation and function of the autophagosome. We identify three classes into which these genes could be divided according to their dependence on ATF4 and CHOP expression and binding of these factors to specific promoter *cis* elements. Our data therefore reveal the eIF2 α -ATF4 pathway as a major regulatory pathway that elicits the transcriptional activation of a large number of autophagy genes in response to stresses.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and treatment conditions

Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were cultured at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium F12 (DMEM/F12) (Sigma) containing 10% fetal bovine serum. For amino acid starvation experiments, cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and refed with a medium containing different concentrations of amino acids supplemented with 10% dialysed calf serum. A DMEM/F12 medium devoid of leucine, glutamine, lysine and methionine (Sigma, cat no D9785) was used to make media lacking leucine, lysine or methionine. MEFs deficient in GCN2 (10), ATF4 (2) and in CHOP (1) were kindly given by Dr. D. Ron (Institute of Metabolic Science, Cambridge, UK). Tunicamycin was purchased from Sigma.

Analysis of gene expression using real time RT-PCR

Total RNA was prepared using a RNeasy mini kit (Qiagen) and treated with DNase I, Amp Grade (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) prior to cDNA synthesis. RNA integrity was electrophoretically verified by ethidium bromide staining. RNA (0.5 μ g) was reverse transcribed with 100 U of Superscript II plus RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen) using 100 μ M random hexamer primers (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), according to the manufacturer's instructions. Real-time quantitative PCR was carried out on a Bio-Rad CFX-96 detection system with quantitative qPCR SYBR Green reagents (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and with a primer concentration of 0.5 μ M. PCR conditions were standardized to 40 cycles of 95°C for 10 s and 59°C for 30 s with the primers for specific mouse mRNA sequences (For a list of primer sequences, see Supplementary Table S1). To control for RNA quality and cDNA synthesis, β -actin mRNA was also amplified with forward (5'-TAC AGCTTCACCACCACAGC-3') and reverse primers (5'-AAGGAAGGCTGGAAAAGAGC-3'). To measure the transcriptional activity from the *p62* gene, oligonucleotides derived from *p62* exon 1 and intron 1 were used to measure the short-lived unspliced transcript (hnRNA,

heterogeneous nuclear RNA). This procedure for measuring transcriptional activity is based on that described by Lipson and Baserga (44). The *p62* primers for amplification were—forward primer, 5'-GCTTCCAG GCGCACTACC-3'; reverse primer, 5'-GAACCGCTGG ATGTTAGATGT-3'. The abundance of each RNA was normalized to the β -actin signal. Each experiment was repeated three times to confirm the reproducibility of the results.

Plasmid constructions

The *p62* promoter fragment (−1935 to +32) was obtained from genomic mice DNA by PCR, using primers containing MluI or XhoI restriction sites at their 5' end. Forward primer: 5'-GCGACGCGTACTGTCCATTGCTGAGTT TTCCTAAAA-3'; Reverse primer: 5'-GCGCTCGAGC GGTCTAGGTACGGACGAAACAGCTG-3'.

Amplified fragments were then cloned into the MluI and XhoI restriction sites of the promoter-less pGL3 vector containing Firefly luciferase coding sequence (Promega, Madison, WI, USA). All constructs containing deletions in the *p62* promoter (*p62*-LUC series of Figure 2E) were generated by PCR from previous cloned genomic DNA, using *Pfu* polymerase (Fermentas), primers and antisense primers containing MluI or XhoI restriction sites at their 5' end. Amplified fragments were then cloned into the pGL3-basic reporter luciferase construct (Promega) using the corresponding restriction sites. The luciferase construct containing a 250-bp *p62* promoter fragment (−1485 to −1235) with wild-type AARE (WT-AARE *p62*) was generated by using SacI-ended primers and XhoI-ended antisense primers. Site-directed mutagenesis of this AARE sequence (5'-TGATGACAC-3' was mutated to 5'-CTAGTACAC-3') was performed by PCR to obtain Mut-AARE *p62*. Two PCR reactions were first performed to obtain the two halves of the final product using sense (5'-GGTTACAGATGTGTGACTAGTGC TAGCTAACA-3') or antisense (5'-TGTTAGCTAGCA CTAGTACACACATCTGTAACC-3') mutated primers. The two obtained fragments were then combined in a third reaction, using the SacI-ended primers and XhoI-ended antisense primers to generate the 250-bp mutated fragment. Wild-type and mutated amplified fragments were cloned into the SacI–XhoI sites of TATA-TK-LUC (45). All the luciferase plasmid constructs were sequenced before utilization.

A 5XAARE-*Asns*-TK-LUC plasmid was generated as previously described (16). The expression plasmids for CHOP and for a mutated version of CHOP (CHOP-LZ-) in which the leucine zipper-containing region had been replaced by unrelated plasmid encoded region were generously provided by Dr D. Ron (Institute of Metabolic Science, Cambridge, UK) (46). The plasmid used to express ATF4 was a gift from Dr F. Gachon (University of Lausanne, Switzerland) (47).

Transient transfection and luciferase assay

Cells were plated in 12-well plates and transfected by the calcium phosphate co-precipitation method as described previously (45). For each transfection experiment, 0.5 μ g

of luciferase plasmid was transfected into the cells along with 1 ng of pCMV- β Gal, a plasmid carrying the bacterial β -galactosidase gene fused to the human cytomegalovirus immediate-early enhancer/promoter region, as an internal control. When indicated, luciferase plasmid was used with the indicated amounts of the transcription factor expression plasmids. The total amount of transfected DNA was kept constant between experimental groups by the addition of empty pcDNA3.3 plasmids. Cells were then exposed to the precipitate for 16 h, washed twice in phosphate buffered saline (PBS), and then incubated with DMEM F12 containing 10% fetal bovine serum. Two days after transfection, cells were harvested in 100 μ l of lysis buffer (Promega) and centrifuged at 13 000 *g* for 2 min. Twenty microlitres of the supernatant were assayed for luciferase activity (Promega). For all the transfection experiments presented, the pCMV- β GAL plasmid was used as an internal control. β -Galactosidase activity was measured as described previously (45). Relative luciferase activity was given as the ratio of relative luciferase unit / relative β -Gal unit. All values are the means \pm SEM calculated from the results of at least three independent experiments performed in triplicate.

Antibodies

ATF4 (sc-200), CHOP (sc-575), β -actin (sc-7210) and normal rabbit IgG (sc-2027) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA). The *p62* antibody was obtained from Abnova (cat. no. H00008878-M01) and the P-eIF2 α antibody (cat. no. 1090-1) was from Epitomics (Burlingame, CA). The CHOP antibody (catalog no. 5554) used in western blot analysis was from Cell Signaling Technology (Beverly, MA) and the MAP1LC3B antibody was from Sigma.

Immunoblot analysis

Proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto a Hybond-P PVDF membrane (Amersham Biosciences). Membranes were blocked for 1 h at room temperature with a solution of 5% nonfat milk powder in TN (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20). The blots were then incubated with antibody in blocking solution overnight at 4°C. Antibodies were diluted according to the manufacturer's instructions. The blots were washed three times in TN and incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-IgG (1:5000) (Santa Cruz, CA) in blocking buffer for 1 h at room temperature. After three washes, the blots were developed using the LuminataTM Western HRP substrate (Millipore Billerica, MA).

Chromatin immunoprecipitation analysis (ChIP)

ChIP analysis was performed according to the protocol of Upstate Biotechnology, Inc. (Charlottesville, VA) with minor modifications as previously described (48). For double ChIP analysis, chromatin immunoprecipitated using the CHOP antibody was incubated for 5 min at 65°C in elution buffer (50 mM NaHCO₃, 1% SDS). The supernatant was diluted 10-fold with ChIP dilution buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl,

1% Triton X-100) and then subjected to the second immunoprecipitation using ATF4 antibody or normal rabbit IgG antibody. Purified immunoprecipitated DNA was analyzed by Real-time quantitative PCR as described (for a list of primer sequences, see Supplementary Table S2). The results are expressed as the percentage of antibody binding versus the amount of PCR product obtained using a standardized aliquot of input chromatin (% of Input). Samples from at least three independent immunoprecipitations were analyzed in duplicate PCR assays and results are reported as the means \pm S.E.M.

Process of bioinformatics study

Our study was performed in two steps: (i) the nucleotide sequences of the autophagy genes—*Atg5*, *Becn1*, *Atg7*, *Atg10*, *Atg12*, *Atg16l1*, *Gabarap*, *Gabarapl2*, *Map1lc3b*, *Nbr1*, *p62* (*Sqstm1*)—were imported from various mammalian species (Ensembl database, <http://www.ensembl.org/>) using the Ensembl Compara Perl API (<http://www.ensembl.org/info/docs/api/compara/index.html>). Sequences including up to 4000 nucleotides (nt) upstream from the transcription start site (TSS) were curated: all positions containing gaps and missing data were eliminated. Evolutionary analyses were conducted with MEGA5 software (<http://www.megasoftware.net/>). This step enabled us to check database annotations and eliminate sequences that were impossible to align with the other homologous mammalian genes; (ii) the full or partial consensus AARE (5'-TGATGMMAH-3') and CHOP-RE (5'-MRVHTGCAAYCYBY-3') Transcription Factor binding IUPAC sequences were searched in all retained mammalian promoter sequences (up to 4000 nt upstream from the TSS) using the 'Scan sequence with IUPAC-patterns' tool (Genomatix Software GmbH, Munich, Germany, <http://www.genomatix.de/>).

RESULTS

Amino acid starvation elicits upregulation of a large number of autophagy genes

It is well established that autophagy is induced following amino acid starvation in mammalian cells (36,49,50). To check that leucine starvation induced autophagy in MEFs, we monitored the processing of MAP1LC3-B, an important marker for autophagy (51). Conversion of MAP1LC3B from its cytosolic form (LC3-I) to its lipidated membrane-bound form (LC3II) was followed by immunoblotting. Figure 1A shows an increase in LC3II/LC3I ratio following 2–8 h of leucine starvation. Furthermore, treatment with chloroquine, a drug that has been shown to block autophagy flux by impairing lysosomal acidification (51), confirmed that autophagy was induced in leucine-starved cells. To determine whether genes involved in the autophagic process can be upregulated in response to amino acid starvation, the mRNA level of several genes encoding proteins involved in the formation, elongation and function of the autophagosome was measured. Kinetic analysis revealed that for most of the 15 mRNAs tested, levels increased, reached a maximum after 4–6 h of leucine starvation and

then decreased (Figure 1B). Only three autophagy gene mRNAs (*Alfy*, *Atg9* and *Atg2*) were not induced by leucine starvation. Thus, the increased autophagic flux resulting from amino acid starvation was followed by the induction of a large number of autophagy genes.

The GCN2/eIF2 α /ATF4/AARE pathway is required for the transcriptional activation of *p62* in amino acid-starved cells

Our aim was to decipher further the molecular mechanisms involved in amino acid-regulated transcription of autophagy genes. Since *p62*, an important marker of autophagy, was one of the mRNAs most induced by leucine starvation, we decided to use this gene as working model for dissecting the mechanisms involved in the regulation of its expression in amino acid-starved cells. To investigate whether transcription contributed to the increase in *p62* mRNA, the synthesis of heterogeneous nuclear RNA (44) was measured. Figure 2A provided evidence that the transcription activity of *p62* was increased and contributed to a corresponding increase in mRNA following leucine starvation. This *p62* mRNA induction was not restricted to leucine, as it was observed after withdrawal of other essential amino acids such as lysine and methionine (Supplementary Figure S1). Furthermore, amino acid-regulated expression of *p62* was also observed in other mammalian cell lines (Supplementary Figure S2).

The GCN2/eIF2 α /ATF4 pathway has been shown to be involved in the up-regulation of a set of specific genes in response to amino acid starvation (39). To examine the role of GCN2 and ATF4 in the amino acid-regulation of *p62* transcription, the effect of leucine starvation was measured on *p62* mRNA content in GCN2- and ATF4-deficient MEFs and in the wild-type cells (Figure 2B). Lack of GCN2 or ATF4 abolished the response of *p62* transcription to leucine depletion. As *p62* was shown to be itself a selective autophagy substrate continuously degraded by autophagy (41,42) with a 2-h half-life under amino acid starvation (52), we would expect the *p62* protein level to be decreased during leucine starvation. Protein analysis showed that in wild-type cells, the amount of *p62* remained unchanged by 6 h of leucine starvation, while ATF4 level and phosphorylation of eIF2 α were markedly increased (Figure 2C). By contrast, *p62* protein level decreased significantly in ATF4 $^{-/-}$ cells following leucine starvation demonstrating that ATF4 plays a critical role to maintain the *p62* protein content in amino acid-starved cells.

Close inspection of the promoter and the 3'-untranslated region (3'UTR) of *p62* revealed three sequences (referred to as sequences 1 to 3) similar to the AARE core sequence identified earlier in other amino acid-regulated gene promoters (Figure 2D). To investigate the contribution of these three putative AARE sequences to the amino acid-dependent increase in *p62* transcription, a series of deletions in the 5' and 3' regulatory regions was created and fused to the Firefly luciferase reporter gene. Figure 2E shows that combination of the 5'-promoter (−1935 to +32) with part of the 3'UTR (+9820 to

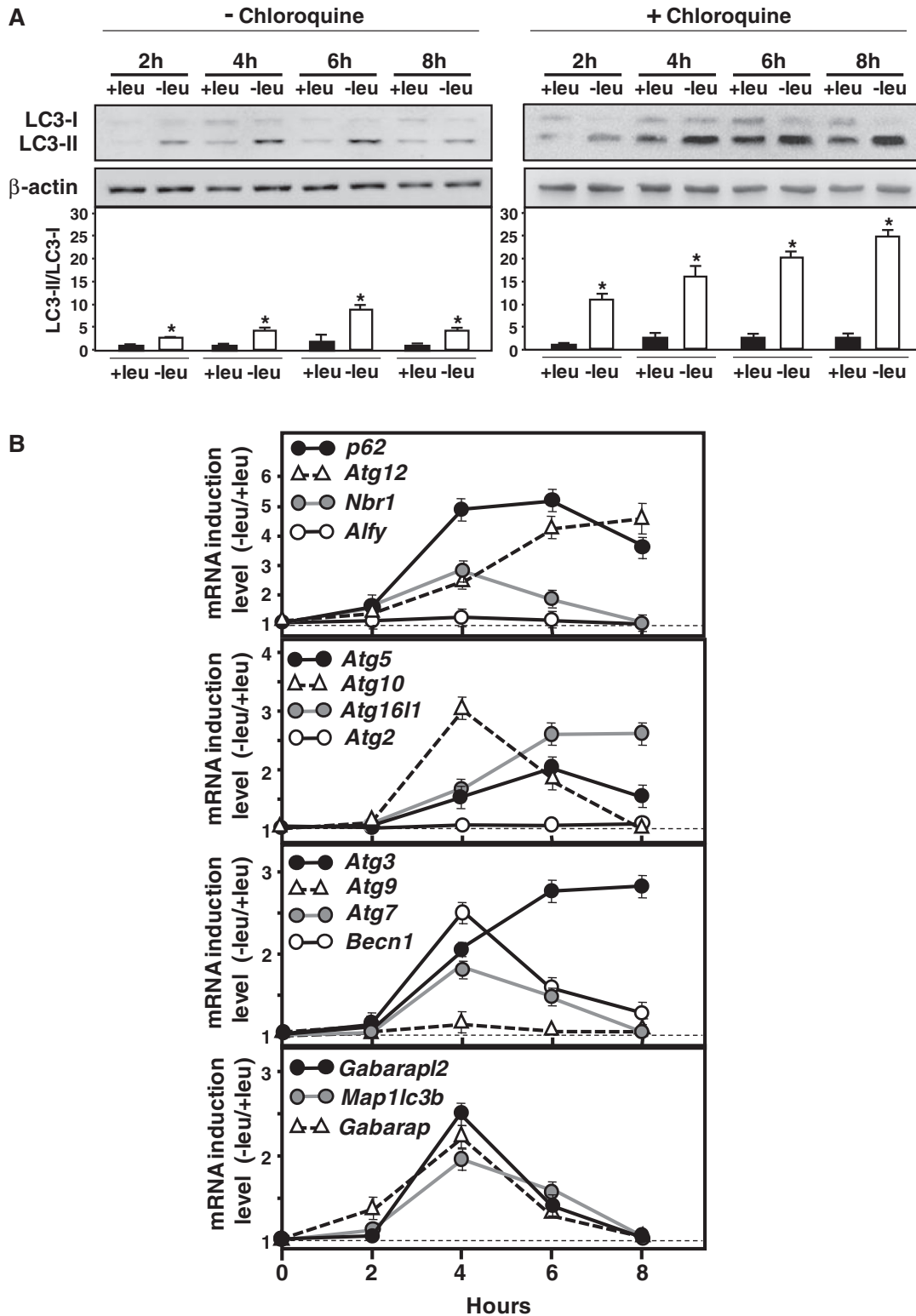


Figure 1. Upregulation of a set of autophagy genes in response to leucine starvation. (A) Immunoblot analysis of MAP1LC3B (LC3B) processing from MEFs incubated for 2–8 h either in control (+leu) or leucine-free medium (–leu). β -actin was used as a loading control. When indicated chloroquine (20 μ M) was added. The LC3-II/LC3-I ratio was calculated based on densitometry analysis of both bands using Image J software. (B) Effect of leucine starvation on the mRNA level of a large number of autophagy genes. Total RNA from MEFs incubated for 2–8 h either in control (+leu) or leucine-free medium (–leu) was analyzed by RT-qPCR. The graphs show means \pm S.E.M. of three independent experiments. *t* tests have been performed to compare the means. The asterisks indicate a *P* value of ≤ 0.05 relative to the +leu medium value.

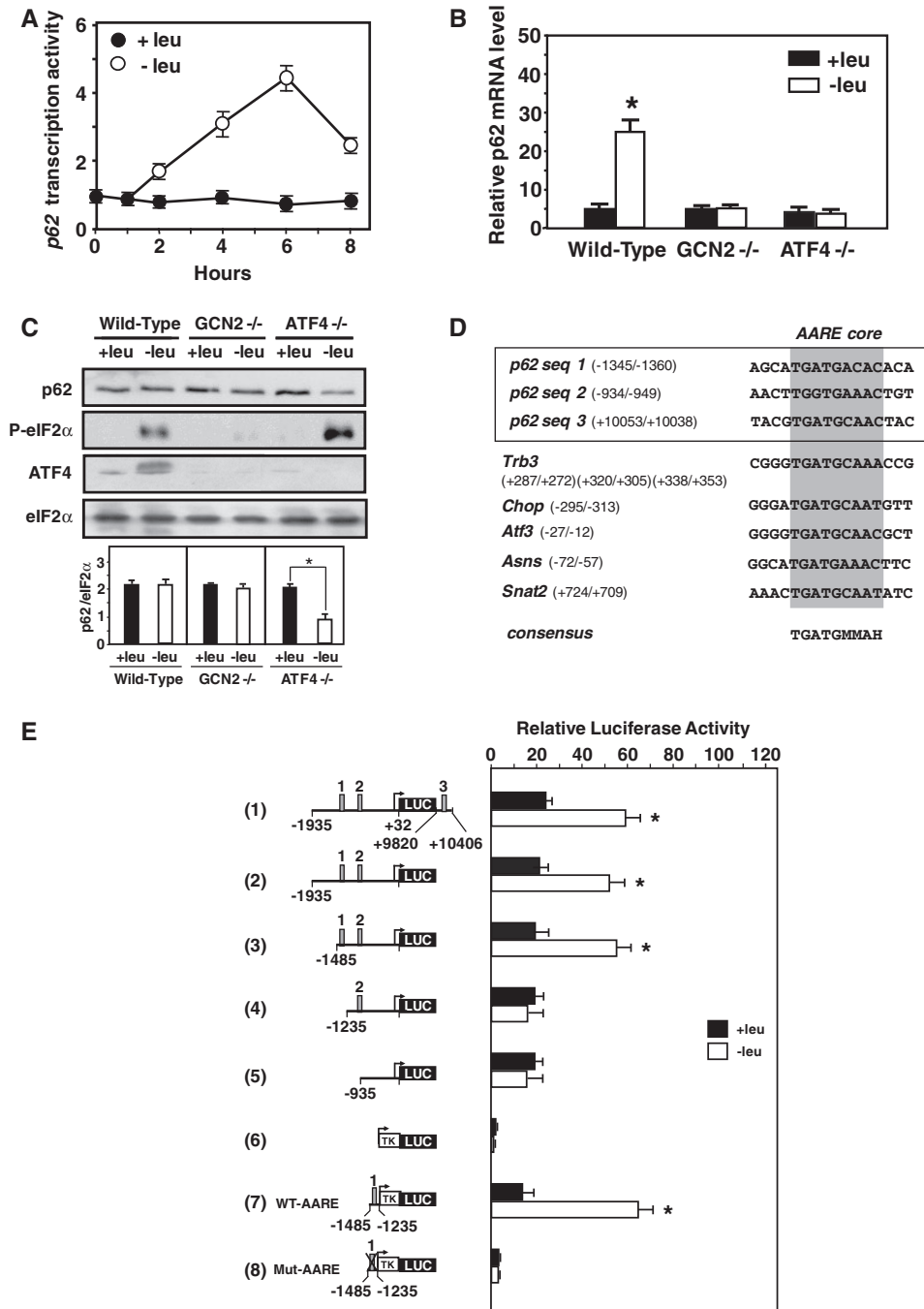


Figure 2. Role of GCN2 and ATF4 in the AARE-regulated *p62* transcription in response to amino acid starvation. (A) Effect of leucine limitation on *p62* transcription activity. The measurement of *p62* heterogeneous nuclear RNA was determined using primers spanning the intron1 as described in Materials and Methods. The graphs show means \pm S.E.M. of three independent experiments. (B) Role of GCN2 and ATF4 in the amino acid regulation of *p62* transcription. Wild-type, GCN2 $-/-$ and ATF4 $-/-$ MEFs were incubated either in control (+leu) or leucine-free medium ($-$ leu) and harvested after 6 h, and total RNA was analyzed for *p62* mRNA content. The graphs show means \pm S.E.M. of three independent experiments. *t* tests have been performed to compare the means. The asterisks indicate a *P* value of ≤ 0.05 relative to the +leu medium value. (C) Role of GCN2 and ATF4 in maintaining the *p62* protein content in amino acid-starved cells. Immunoblot analysis of *p62*, phosphorylation of eIF2 α , ATF4 and eIF2 α protein content were performed from MEFs incubated for 6 h either in control (+leu) or leucine-free medium ($-$ leu). Signal intensities of *p62* (three experiments per group) were quantified using Image J software. The asterisks indicate a *P* value of ≤ 0.05 relative to the +leu medium value. (D) Comparison of the three *p62* sequences (seq1: $-1345/-1360$, seq2: $-934/-949$, seq3: $+10053/+10038$) with the *Trb3* AARE ($+287/+272$, $+320/+305$, $+338/+353$), the *Chop* AARE ($-295/-313$), the *Atf3* AARE ($-27/-12$), the *Asns* AARE ($-72/-57$) and the *Snat2* AARE ($+724/+709$). The position of the minimum AARE core sequence is indicated by the gray box. The resulting minimum consensus sequence is shown at the bottom (M = A or C; H = A or C or T). (E) Identification of an AARE in the *p62* promoter. MEFs were transiently transfected with LUC constructs containing deletions of the mouse *p62* promoter or containing a *p62* genomic fragment (-1485 to -1235) with wild-type (WT-AARE: 5'-TGATGACAC-3') or mutated (Mut-AARE: 5'-CTAGTACAC-3') AARE (-1360 to -1345) inserted 5' to the TK promoter. Twenty-four hours after transfection, cells were incubated for 16 h in control DMEM F12 (+leu) or in DMEM F12 lacking leucine ($-$ leu) and assayed for LUC activity. The three putative AARE sequences are indicated by the gray box. The graphs show means \pm S.E.M. of three independent experiments. *t* tests have been performed to compare the means. The asterisks indicate a *P* value of ≤ 0.05 relative to the +leu medium value.

+10406) region (row 1) was able to mediate a level of induced response to amino acid deprivation. Further *p62* promoter and 3'UTR deletions (row 2 to row 5) demonstrated that only the putative AARE sequence 1 (*p62* seq1) located from -1485 to -1235 was essential for amino acid regulation. This 250-bp *p62* promoter sequence was able to regulate a minimal thymidine kinase (TK) promoter in response to leucine starvation (row 7) whereas specific mutations in the 9-bp AARE core sequence completely abolished the amino acid inducibility (row 8). Altogether, these results demonstrated that this sequence can be considered as an AARE and plays a key role in the amino acid control of *p62* transcription.

ATF4 and CHOP transcription factors bind to the *p62* AARE and cooperate to activate transcription

Our goal was then to identify the transcription factors that cooperated with ATF4 for the induction of the AARE-dependent transcription. Previous studies have identified CHOP as an interacting partner of ATF4 and demonstrated that this factor is an important member of the transcription factor network that controls the stress-induced regulation of specific CARE-containing gene transcription (18,23,24,53). *Chop* itself is as an amino acid-inducible gene that is transcriptionally induced by ATF4 (14,45,54). Figure 3A showed that CHOP mRNA induction was detectable 30 min after starvation and preceded *p62* transcription induction. To determine whether CHOP was required to mediate the *p62* mRNA induction following leucine starvation, we used CHOP knockout MEFs. Lack of CHOP abolished the *p62* mRNA inducibility in cells deprived of leucine (Figure 3B). To confirm the role of CHOP in the *p62* AARE-dependent transcription, CHOP-deficient MEFs were transfected with three amino acid-responsive luciferase constructs [see rows 1 and rows 7 of Figure 2E, and row 3 of Figure 3B in (16)]. The absence of CHOP abolished *p62* AARE-dependent transcription (Figure 3C). It was previously reported that CHOP negatively regulates ATF4-dependent transcription of the *Asparagine synthetase (Asns)* gene (18). As it was described, the ASNS mRNA induction and the *Asns* AARE activity were still induced in the absence of CHOP expression. Protein analysis showed that in CHOP knockout MEFs, *p62* protein level decreased dramatically in the absence of leucine while ATF4 level was still increased (Figure 3D). These experiments highlighted that CHOP plays a critical role in the activation of *p62* promoter to thereafter maintain the *p62* protein content in amino acid-starved cells.

To examine whether CHOP and ATF4 bind the AARE sequence within the *p62* promoter, ChIP assays were performed with primer sets covering either the 5' distal promoter region (amplicon A) or the AARE (amplicon B) of *p62* (Figure 4A). The ChIP results obtained with wild-type MEFs showed an increase in ATF4 and CHOP binding to the AARE following 6 h of leucine starvation (Figure 4B). Furthermore, binding of ATF4 and CHOP was not detected in the 5' distal promoter region

of *p62*, confirming that these factors bind specifically to the AARE. In ATF4-deficient cells, CHOP did not bind to the *p62* AARE. Similarly, in the absence of CHOP, ATF4 binding was lost as well. These results suggested that the binding of CHOP and ATF4 to the *p62* AARE required the presence of these two factors simultaneously. To confirm that CHOP and ATF4 belonged to the same protein complex that was bound to the AARE, a double ChIP was performed. Formaldehyde-crosslinked chromatin was first immunoprecipitated with CHOP antibody and then subjected to a second immunoprecipitation with ATF4 or normal rabbit IgG antibody. Following amino acid starvation, a significant enrichment of CHOP/ATF4 on the *p62* AARE region (amplicon B) was observed (Figure 4C). As a negative control, the association of CHOP/ATF4 with the 5' distal promoter region of *p62* (amplicon A) was minimum.

To assess whether ATF4 and CHOP cooperated to regulate AARE-dependent transcription, cotransfection experiments were carried out in MEFs using a LUC reporter driven by 250-bp of the *p62* promoter including the AARE (see Figure 2E, row 7) and the expression plasmids for CHOP and ATF4. This assay revealed that coexpression of CHOP with ATF4 dramatically increased *p62*-AARE activity compared with the expression of ATF4 or CHOP alone (Figure 4D). This cooperative activation was dramatically reduced by the coexpression with ATF4 of a mutated version of CHOP (CHOP LZ-) (46). When the 9-bp core sequence of the *p62* AARE was mutated (see Figure 2E, row 8), the activation by CHOP and ATF4 was completely abolished. Collectively, these results demonstrated that CHOP and ATF4 bind to the *p62* AARE and cooperate for amino acid-regulated transcription.

ATF4 and CHOP are essential for transcriptional induction of a set of autophagy genes in response to amino acid starvation

Until now, only a small number of autophagy genes other than *p62* have been reported to have their transcription regulated by ATF4 (33,34,55). We have shown above that (i) the expression of a set of autophagy genes was upregulated in response to leucine starvation; (ii) the GCN2/eIF2 α /ATF4/CHOP pathway was required to increase *p62* transcription in amino acid-starved cells. Then, to address the role of GCN2, ATF4 and CHOP in amino acid-regulated transcription of autophagy genes, the effect of leucine deprivation was measured on the amino acid-inducible mRNAs described in Figure 1. We first observed that all the amino acid-regulated autophagy genes were dependent on GCN2 (Figure 5A–C). These genes can be divided into three classes according to their dependence to ATF4 and CHOP. In the first class, *Atg16l1*, *Map1lc3b*, *Atg12*, *Atg3*, *Becn1* and *Gabarapl2* were ATF4-dependent but CHOP-independent for amino acid-regulated transcription (Figure 5A). Scanning of the promoter sequences with IUPAC patterns (Genomatix Software GmbH, Munich, Germany) revealed that the 5' flanking region of these genes contains a putative AARE sequence (5'-TGATG

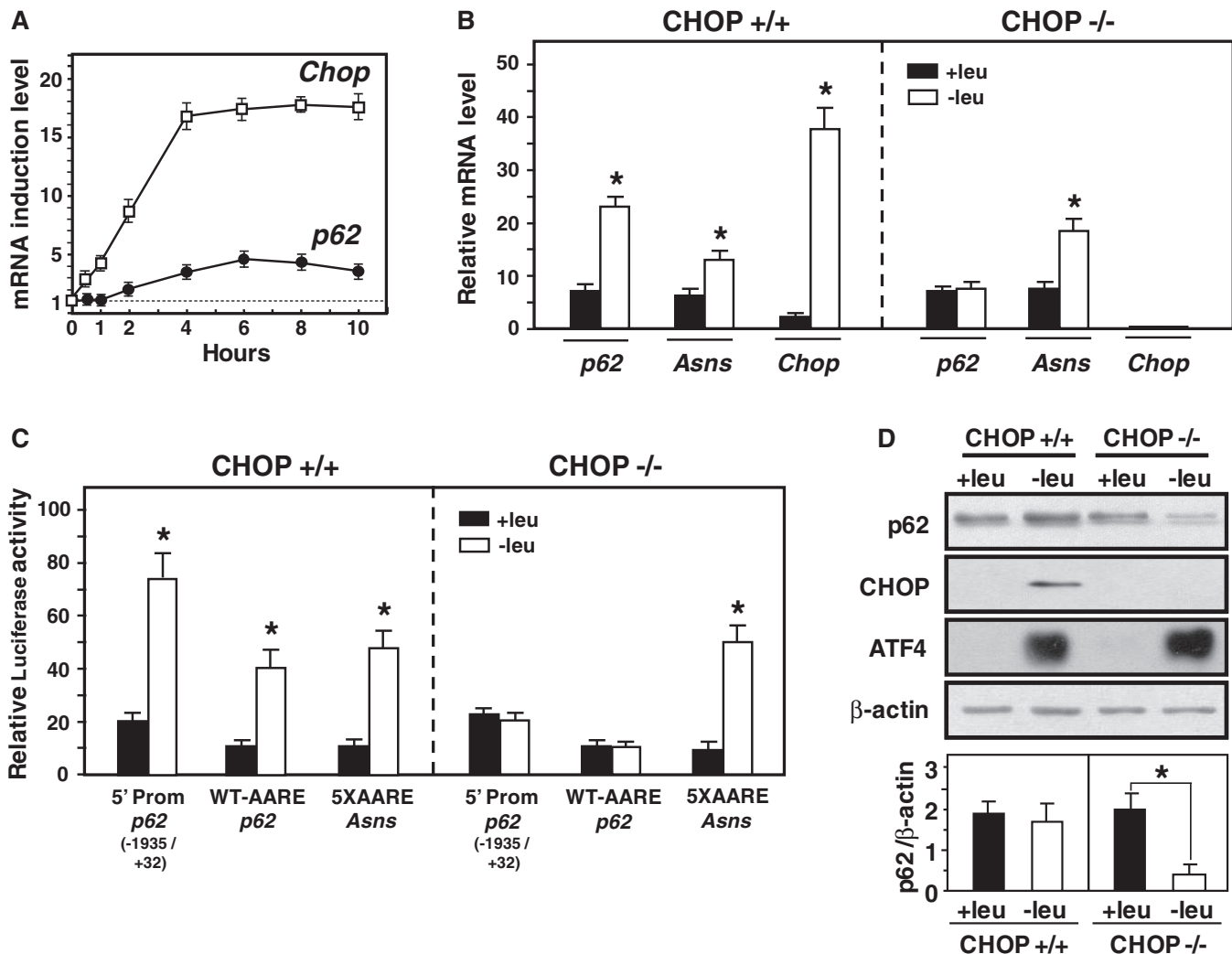


Figure 3. Role of CHOP in the transcriptional activation of *p62* following amino acid starvation. (A) Kinetics of CHOP and *p62* mRNA expression in response to amino acid starvation. MEFs were incubated for 0–10 h either in control (+leu) or leucine-free medium (–leu) and harvested after the indicated incubation times, and total RNA was analyzed for *p62* and CHOP mRNA contents. The graphs show means \pm S.E.M. of three independent experiments. (B) Role of CHOP in the amino acid-regulation of *p62* mRNA expression. CHOP +/+ and CHOP –/– MEFs were incubated either in control (+leu) or leucine-free medium (–leu) and harvested after 6 h, and total RNA was analyzed for *p62*, *ASNS* and CHOP mRNA contents. The graphs show means \pm S.E.M. of three independent experiments. The asterisks indicate a *P* value of ≤ 0.05 relative to the +leu medium value. (C) Role of CHOP in the *p62* AARE-dependent transcription. CHOP +/+ or CHOP –/– MEFs were transiently transfected with three amino acid-responsive luciferase constructs [see rows 1 and rows 7 of Figure 2E, and row 3 of Figure 3B in (16)]. Twenty-four hours after transfection, cells were incubated for 16 h in control (+leu) or leucine-free medium (–leu) and assayed for LUC activity. The graphs show means \pm S.E.M. of three independent experiments. *t* tests have been performed to compare the means. The asterisks indicate a *P* value of ≤ 0.05 relative to the +leu medium value. (D) Role of CHOP in maintaining the *p62* protein content in amino acid-starved cells. Immunoblot analysis of *p62*, CHOP, ATF4 and β -actin protein contents was performed. Signal intensities of *p62* (three experiments *per* group) were quantified using Image J software.

MMAH-3') (Supplementary Figure S3). ChIP assays performed with primer sets covering the AARE, anti-ATF4 and anti-CHOP antibodies confirmed that only ATF4 was bound to the promoter. In the second class, the induction of *Nbr1* and *Atg7* in response to leucine starvation was dependent on ATF4 and CHOP as described above for *p62* (Figure 5B). The promoter of these two genes also contains a putative AARE sequence (Supplementary Figure S3). The ChIP assay clearly showed that both ATF4 and CHOP were bound to the AARE, and double ChIP confirmed that these two factors belonged to the same protein complex. The third class included

Atg10, *Gabarap* and *Atg5*, which were upregulated by amino acid starvation through ATF4 and CHOP (Figure 5C). It has been shown earlier that several CHOP-inducible genes were induced in response to stress via a specific CHOP-binding sequence called CHOP Responsive Element (CHOP-RE) (23,56). This CHOP-RE consensus sequence (5'-HTGCAAYC-3) is completely different from those of the AARE and allows the binding of a CHOP-C/EBP β heterodimer (23). Promoter analysis of *Atg10*, *Gabarap* and *Atg5* coupled with ChIP assays clearly showed that CHOP and C/EBP β were bound to a CHOP-RE, and double ChIP

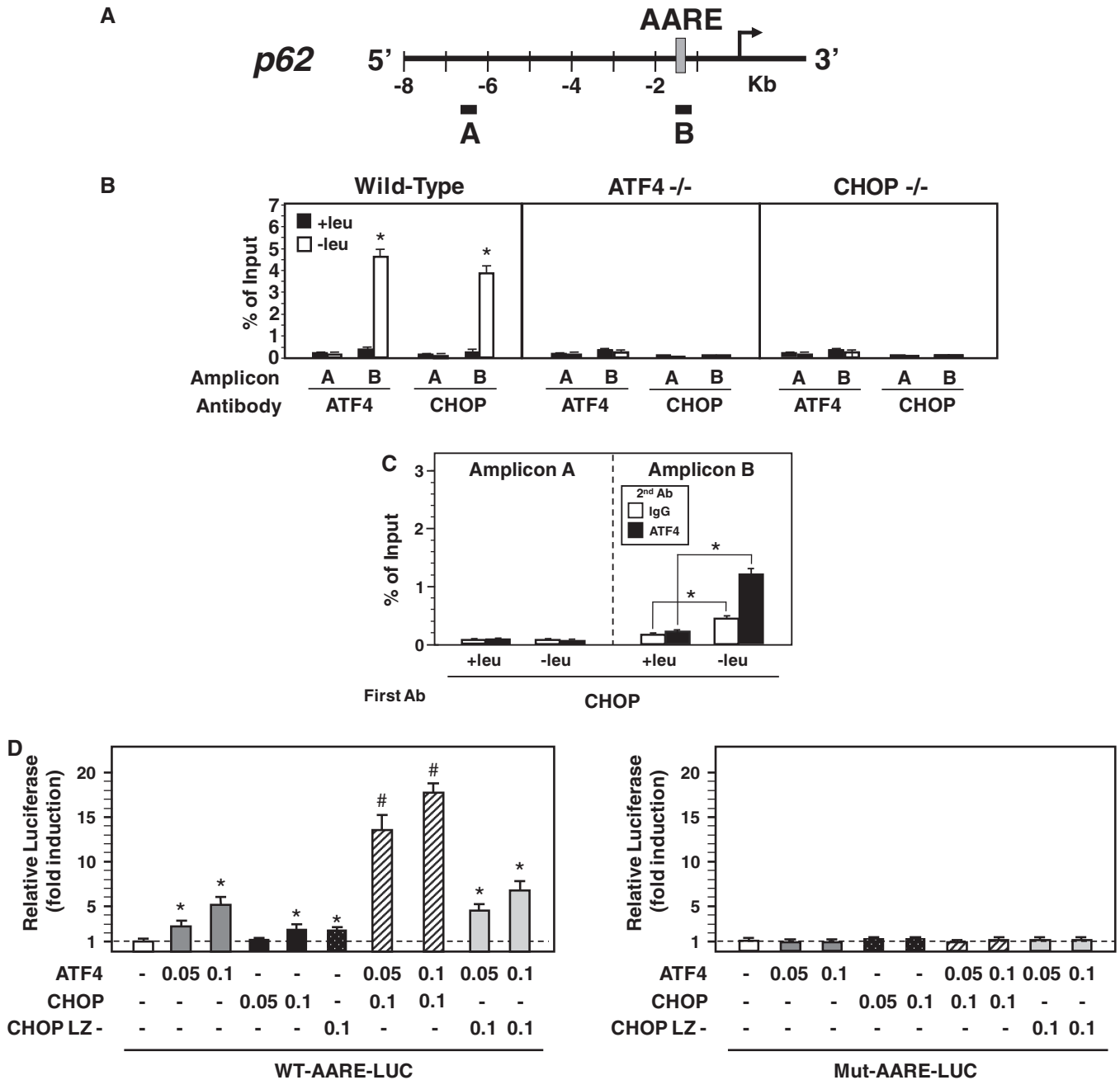


Figure 4. CHOP and ATF4 bind to the *p62* AARE and cooperate to activate the promoter in response to leucine starvation. (A) Scheme of the mouse *p62* gene indicating the two amplicons produced for the ChIP analysis: A (−6590 to −6474) and B (−1306 to −1150). The AARE sequence is indicated by the gray box. (B) CHOP and ATF4 bind to the *p62* AARE. ChIP analysis was performed from wild-type, ATF4- or CHOP-deficient MEFs incubated 6 h either in control (+leu) or leucine-free medium (−leu) using antibodies specific for ATF4 and CHOP and different sets of primers to produce amplicons A or B. Data were plotted as the percentage of antibody binding versus the amount of PCR product obtained using a standardized aliquot of input chromatin (% of Input). The graphs show means ± S.E.M. of three independent experiments. *t* tests have been performed to compare the means. The asterisks indicate a *P* value of ≤0.05 relative to the +leu medium value. (C) CHOP and ATF4 belong to the same protein complex that was bound to the *p62* AARE. Double-ChIP assays were performed from MEFs incubated 6 h either in control (+leu) or leucine-free medium (−leu). DNA fragments were first immunoprecipitated with CHOP antibody, eluted, and then subjected to the second immunoprecipitation with ATF4 antibody or normal rabbit IgG antibody. The enrichment of CHOP/ATF4 protein was analyzed by qPCR using primer sets specific for *p62* AARE (amplicon B) or for the 5′ distal promoter region of *p62* (Amplicon A). Data were plotted as the percentage of antibody binding versus the amount of PCR product obtained using a standardized aliquot of input chromatin (% of Input). The graphs show means ± S.E.M. of three independent experiments. The asterisks indicate a *P* value of ≤0.05 relative to the +leu medium value. (D) CHOP and ATF4 cooperate to activate the *p62* promoter. MEFs were transiently transfected with LUC constructs containing a *p62* genomic fragment (−1485 to −1235) with wild-type (WT-AARE) or mutated (Mut-AARE) AARE inserted 5′ into the *TK* promoter and the indicated expression vectors for ATF4, CHOP or a mutated version of CHOP (CHOP LZ-) in which the leucine zipper-containing region had been replaced by unrelated plasmid encoded region. Twenty-four hours after transfection, cells were incubated for 24 h in control (+leu) medium and assayed for LUC activity. The graphs show means ± S.E.M. of three independent experiments. One asterik indicates a *P* value of ≤0.05 relative to the control value. # indicate a *P* value of ≤0.05 relative to the ATF4-transfected value.

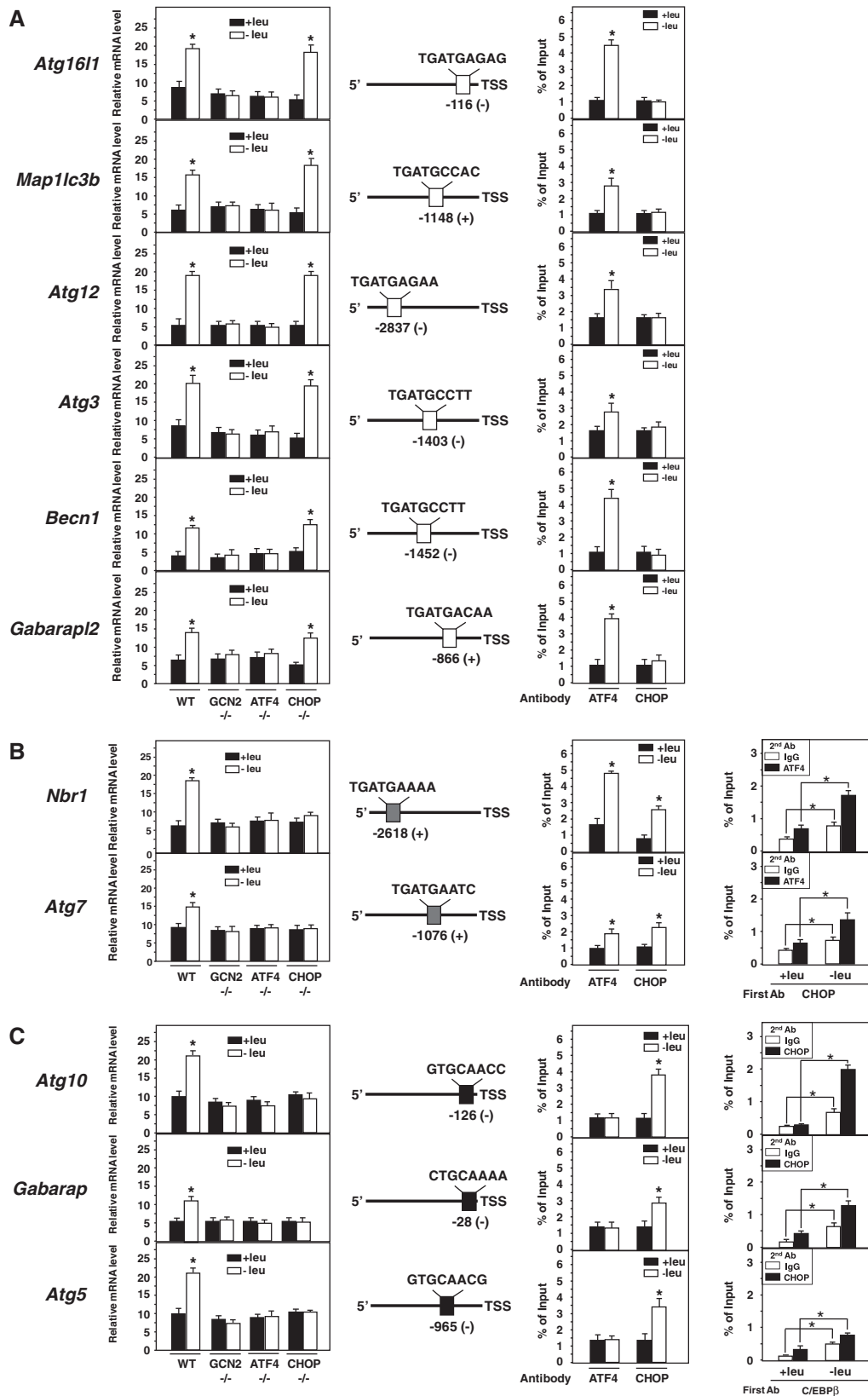


Figure 5. Role of GCN2, ATF4 and CHOP in the transcriptional activation of a set of autophagy genes in response to leucine starvation. Wild-type, GCN2^{-/-}, ATF4^{-/-} and CHOP^{-/-} MEFs were incubated either in control (+leu) or leucine-free medium (-leu). MEFs were harvested after 6h, and total RNA was analyzed for autophagy gene mRNA contents. (A) In the first class of autophagy genes, *Atg16l1*, *Map1lc3b*, *Atg12*, *Atg3*, *Becn1* and *Gabarapl2* were ATF4-dependent but CHOP-independent for amino acid-regulated transcription. (B) In the second class, the induction of *Nbr1* and *Atg7* in response to leucine starvation was dependent on ATF4 and CHOP. (C) The third class included *Atg10*, *Gabarap* and *Atg5*, which

(continued)

confirmed that these two factors belonged to the same protein complex. Collectively, these results showed that both ATF4 and CHOP play a key role in the amino acid-regulated transcription of a large number of autophagy genes.

Next, we assessed the effect of leucine concentration on the transcriptional activation of the members of the three classes of autophagy genes. Protein analysis showed that leucine concentration from 30 to 100 μ M resulted in an increase in CHOP and ATF4 protein levels and in the lipidated MAP1LC3-B-II form, confirming the induction of both the eIF2 α /ATF4 pathway and autophagic process in this concentration range (Figure 6A). Interestingly, 100 μ M of leucine elicited the transcription of *CHOP* and *Atf4* (Figure 6B) and *p62*, *Nbr1* and *Atg7* where both ATF4 and CHOP were bound to AARE (Figure 6C). By contrast, transcription of *Atg10*, *Gabarap* and *Atg5* where CHOP was bound without interacting with ATF4 (Figure 6D) and all CHOP-independent genes where ATF4 was bound to AARE without interacting with CHOP (Figure 6E) remained uninduced. Therefore, AARE sequences that allow binding of both CHOP and ATF4 are responsible for an increased sensitivity of transcriptional induction of autophagy genes according to leucine concentration.

The autophagic ATF4-dependent transcriptional program can also be activated by ER stress through PERK activation

The eIF2 α /ATF4 pathway can also be induced by ER stress through the PERK kinase activation (Figure 7A) (10). To investigate whether ER stress and subsequent PERK activation can also activate transcription of all the ATF4- and CHOP-dependent autophagy genes, the effect of tunicamycin, an agent that induces ER stress and autophagy (57), was measured. Figure 7B showed that tunicamycin treatment induced MAP1LC3-B conversion, confirming the induction of autophagy by ER stress in wild-type MEFs. All mRNAs from the three classes of autophagy genes exhibited a response to tunicamycin and to leucine starvation in PERK^{+/+} MEFs (Figure 7C). By contrast, lack of PERK resulted in a complete loss in the mRNA inducibility by ER stress but did not affect the induction of mRNA level by leucine starvation as expected. Thus, transcription of ATF4- and

CHOP-dependent autophagy genes can also be activated by ER stress through PERK activation.

DISCUSSION

Autophagy constitutes a major protective mechanism that allows stressed cells to survive by recycling macromolecules and restoring metabolic functions (49,58). The data reported in the present study yield several novel findings regarding the role of the eIF2 α /ATF4 pathway in the transcription of autophagy genes in response to stress. (i) We provide evidence that GCN2 and PERK eIF2 α -kinases, ATF4 and CHOP transcription factors are required to increase transcription of a set of autophagy genes involved in the formation, elongation and function of the autophagosome. (ii) We identify three classes of autophagy genes according to their dependence on ATF4 and CHOP and the binding of these factors to specific promoter *cis* elements.

The responses of mammalian cells to stress conditions are a robust and complex regulated array of cellular processes. The transcription factor ATF4 is translationally induced by many stress conditions and activates transcription by binding to CARE sequences (17). Consistent with the role of ATF4 as the primary activating transcription factor in the eIF2 α /ATF4 pathway, the ATF half-site of CARE is conserved, whereas the C/EBP half-site is divergent. It is now established that different ATF4 dimerization partners bind to the C/EBP half-site to provide transcriptional specificity to the ATF4 signal that is generated by a variety of different stresses. When the activating stimulus is amino acid starvation, the CAREs function as AAREs (16,17). Using *p62* as working model, we have provided evidence that the *p62* promoter contains an AARE that plays a key role in the amino acid control of its transcription. Close inspection of the sequence of several other ATF4-dependent autophagy gene promoters such as those of *Atg16l1*, *Map1lc3b*, *Atg12*, *Atg3*, *Atg7*, *Becn1*, *Gabarapl2* and *Nbr1* revealed sequences similar to the AARE consensus sequence, especially in the ATF half-site (5'-TGATG-3'). These sequences are well conserved in mammals (Supplementary Figure S3) suggesting that they could play a key role in amino acid and ER stress-regulated transcription. The present ChIP analysis demonstrated that in response to amino acid starvation,

Figure 5. Continued

were upregulated by amino acid starvation through ATF4 and CHOP. The graphs show means \pm S.E.M. of three independent experiments. The asterisks indicate a *P* value of ≤ 0.05 relative to the control medium value. The promoter region of the different autophagy genes and the position of the putative AARE or CHOP-RE are represented. The promoter sequences were scanned with IUPAC patterns (Genomatix Software GmbH, Munich, Germany) (Supplementary Figure S3). Numbers indicate the distance of the regulatory elements from the transcription start site (TSS). The symbols in brackets indicate the localization of regulatory elements in coding (+) or noncoding (-) strands. ChIP analysis was performed using antibodies specific for ATF4, and CHOP and primers to amplify a part of the corresponding promoter (see supplementary Table S2 for sequences) containing ATF4 or CHOP binding sites. Data were plotted as the percentage of antibody binding versus the amount of PCR product obtained using a standardized aliquot of input chromatin (% of Input). In CHOP-ATF4 double-ChIP assays, DNA fragments were first immunoprecipitated with CHOP antibody, eluted, and then subjected to the second immunoprecipitation with ATF4 antibody or normal rabbit IgG antibody. The enrichment of CHOP/ATF4 proteins was analyzed by qPCR using primer sets specific for *Nbr1* and *Atg7* promoters. In C/EBP β -CHOP double-ChIP assays, DNA fragments were first immunoprecipitated with C/EBP β antibody, eluted and then subjected to the second immunoprecipitation with CHOP antibody or normal rabbit IgG antibody. The enrichment of C/EBP β -CHOP proteins was analyzed by qPCR using primer sets specific for *Atg10*, *Gabarap* or *Atg5* promoters. Data were plotted as the percentage of antibody binding versus the amount of PCR product obtained using a standardized aliquot of input chromatin (% of Input). The graphs show means \pm S.E.M. of three independent experiments. *t* tests have been performed to compare the means. The asterisks indicate a *P* value of ≤ 0.05 relative to the +leu medium value.

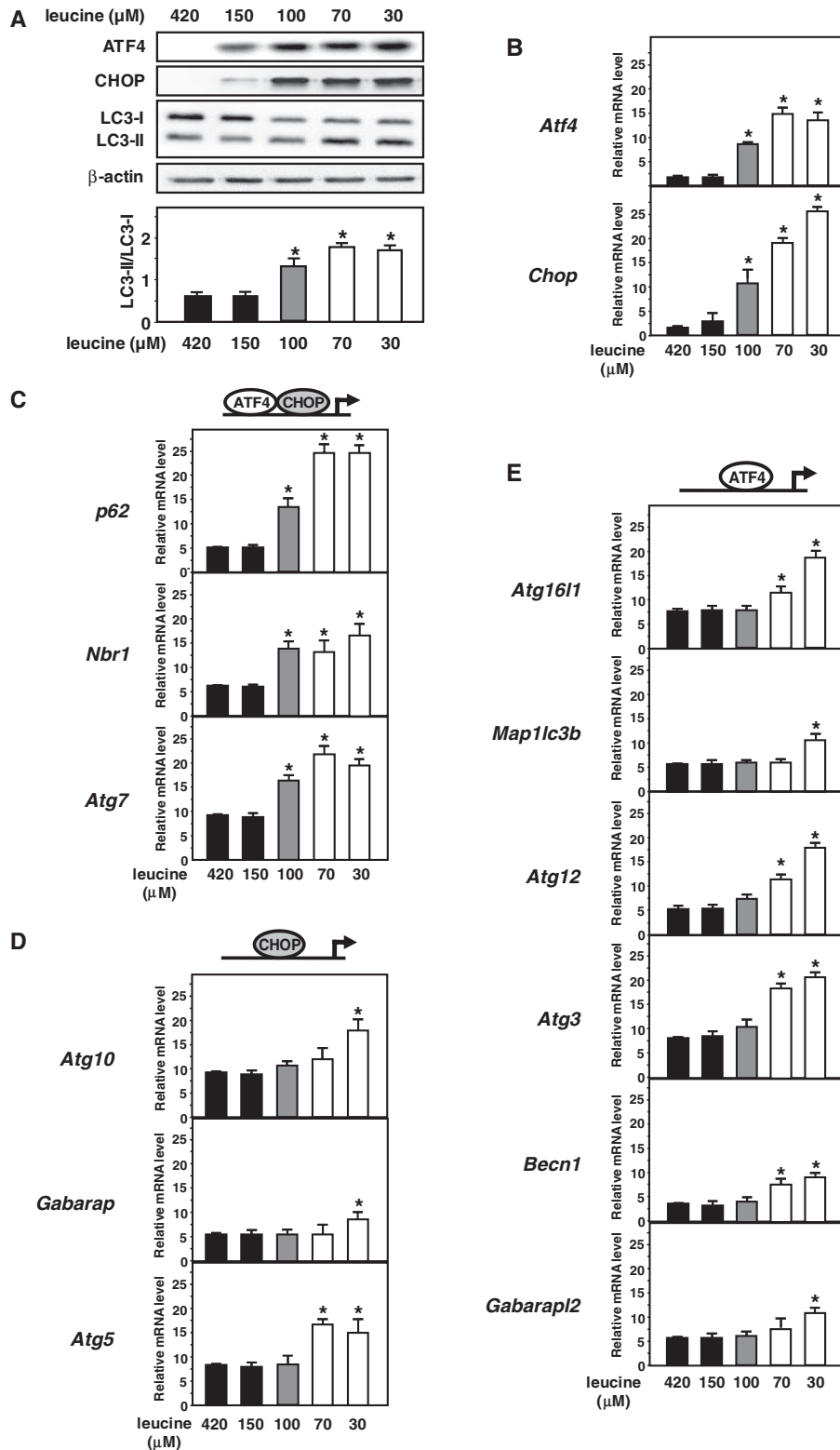


Figure 6. Effect of leucine concentration on the transcriptional activation of members of the three classes of ATF4-dependent autophagy genes. (A) Immunoblot analysis of ATF4, CHOP protein contents and MAP1LC3B processing, from MEFs incubated for 16 h in medium containing different leucine concentration. The control medium contained 420 μM leucine. The LC3-II/LC3-I ratio was calculated based on densitometry analysis of both bands using Image J software. Induction of expression of (B) *Chop* and *Atf4*, (C) *p62*, *Nbr1* and *Atg7* where both ATF4 and CHOP were bound to the AARE, (D) *Atg10*, *Gabarap* and *Atg5* where CHOP was bound to CHOP-RE without interacting with ATF4 and (E) CHOP-independent autophagy genes where ATF4 was bound to AARE without interacting with CHOP, in response to different leucine concentrations. MEFs were incubated for 16 h in media containing 420 or 150 (black), 100 (gray), 70 or 30 μM (white) and harvested for the mRNA content analysis. The graphs show means \pm S.E.M. of three independent experiments. *t* tests have been performed to compare the means. The asteriks indicate a *P* value of ≤ 0.05 relative to the 420 μM medium value.

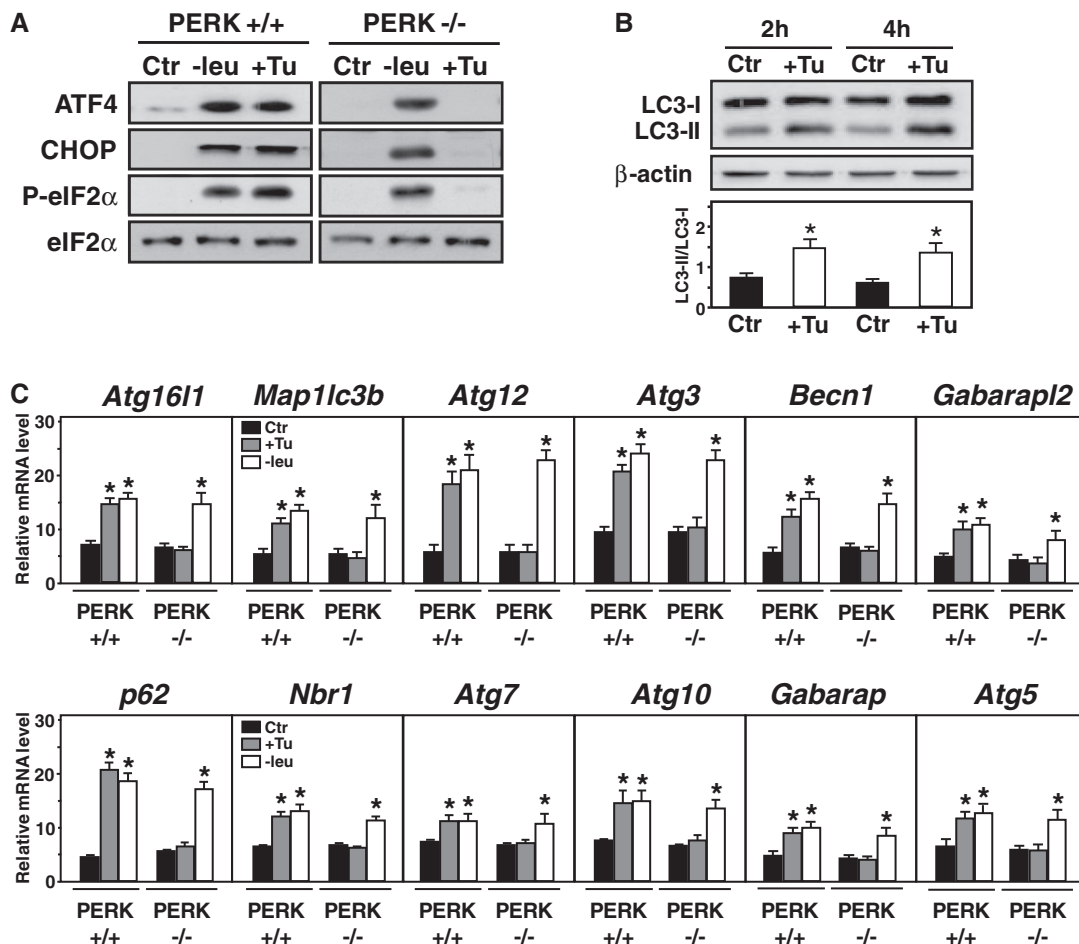


Figure 7. Transcriptional induction of the ATF4-dependent autophagy genes by ER stress through PERK. (A) Immunoblot analysis of ATF4, CHOP protein contents, phosphorylation of eIF2 α , eIF2 α from MEFs incubated for 4 h either in control (+leu), leucine-free medium (-leu) or in medium containing 4 μ g of tunicamycin (+Tu)/ml. (B) Immunoblot analysis of MAP1LC3B processing, from MEFs incubated for 2 or 4 h either in control (+leu) or in medium containing 4 μ g of tunicamycin (+Tu) /ml. β -actin was used as a loading control. The LC3-II/LC3-I ratio was calculated based on densitometry analysis of both bands using Image J software. (C) Induction of ATF4-dependent autophagy gene expression in response to ER stress. PERK +/+ or PERK -/- MEFs were incubated for 4 h either in control (+leu) or in medium containing 4 μ g of tunicamycin /ml (+Tu) or in leucine-free medium (-leu). Total RNA was analyzed for mRNA content as described in Materials and Methods. The graphs show means \pm S.E.M. of three independent experiments. *t* tests have been performed to compare the means. The asterisk indicates a *P* value of ≤ 0.05 relative to the control value.

ATF4 is bound to all of these autophagy gene AAREs (Figure 8). Furthermore, in the case of *p62*, *Nbr1* and *Atg7*, a double-ChIP approach documented that both CHOP and ATF4 are bound to the AARE. The binding of ATF4 and CHOP to the *p62* AARE required the presence of these two factors simultaneously, suggesting the formation of an ATF4-CHOP heterodimer. Thus, ATF4 and CHOP need to cooperate to regulate AARE-dependent transcription, but the nucleotides of the AARE involved in the binding of CHOP remain to be identified. It is likely that this mechanism also occurs for the transcriptional regulation of *Nbr1* and *Atg7*. In addition, we have established that early activation of *CHOP* transcription and thereafter binding of both CHOP and ATF4 to *p62*, *Nbr1* and *Atg7* AAREs are responsible for an increased sensitivity of transcriptional induction of these autophagy genes according to leucine concentration. Indeed, *p62*, *Nbr1* and *Atg7* transcription was upregulated

by a leucine concentration of 100 μ M whereas transcription of the other autophagy genes remained uninduced. We suggest that the interaction of ATF4 with CHOP could increase its binding affinity to AARE. Thus, in response to amino acid deficiency, induction of *CHOP* and subsequent binding of CHOP-ATF4 heterodimer to AARE appear to be an early event in the induction of the autophagy gene transcriptional program. The eIF2 α /ATF4/CHOP pathway should play a key role in the rapid renewal of *p62*, *NBR1* and *ATG7* proteins. We hypothesize that *p62* and *NBR1* could be strongly and rapidly consumed by autophagosome degradation in amino acid-starved cells. In the case of *ATG7*, beside its crucial role in the autophagic process, this protein could also be involved in other mechanisms including cell cycle regulation (59) and therefore have to be available with a protein content maintained in starved conditions.

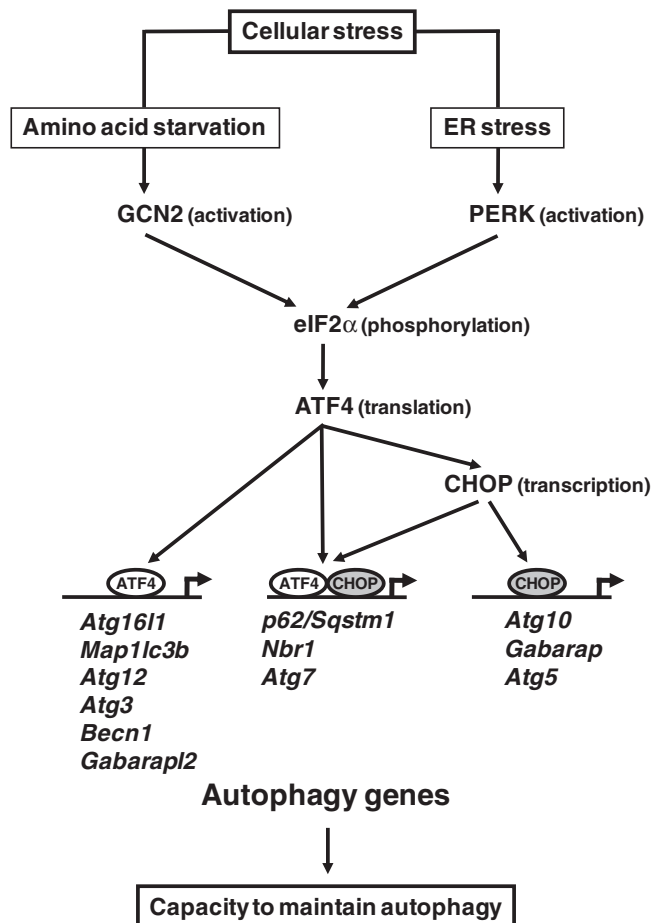


Figure 8. A model for the role of the eIF2 α /ATF4 signaling pathway in the transcriptional activation of autophagy genes. The mode by which each gene is regulated is indicated in parenthesis. Three classes of autophagy genes have been identified according to their dependence on ATF4 and CHOP and the binding of these factors to the promoter.

Previous studies have identified CHOP as an interacting partner of C/EBP and ATF4 and demonstrated that this factor is an important member of the transcription factor network that controls the stress-induced regulation of specific genes. CHOP can (i) heterodimerize with C/EBP and function as a negative or positive *trans*-activator (23,46,60); (ii) cooperate with ATF4 to activate *TRB3* transcription during ER stress (53); and (iii) negatively regulate ATF4-dependent transcription of the *ASNS* gene (18). Our data show that CHOP is essential for transcriptional activation of two classes of ATF4-dependent autophagy genes (Figure 8). In the first class, including *p62*, *Nbr1* and *Atg7*, both ATF4 and CHOP were bound to the promoter as discussed above. The second class of ATF4-CHOP-dependent autophagy genes included *Atg10*, *Gabarap* and *Atg5* to the promoter of which CHOP was bound without interacting with ATF4. In this situation, CHOP and C/EBP β were bound to a CHOP-RE rather than an AARE, suggesting that activation takes place by the binding of a CHOP-C/EBP heterodimer as described previously (23). Therefore, ATF4 can upregulate either directly or indirectly

through the induction of CHOP activity, the transcription of specific classes of autophagy genes in response to stress (Figure 8). Besides this role in autophagy gene transcription, CHOP was described to be also involved in the induction of cell cycle arrest and apoptosis in response to stress (1). According to duration and intensity of stress, the role of CHOP in the cell's fate appears to be different. At first, CHOP contributes to the regulation of autophagy and participates in cell survival. Thereafter, if the stress is prolonged, CHOP is involved in apoptosis. Studying the mechanisms by which CHOP can influence the balance between autophagy and apoptosis in response to cellular stress will provide additional insight into these important processes.

Our present results show that the eIF2 α /ATF4 pathway directs an autophagy gene transcriptional program involved in adaptation to stress. During conditions of stress and starvation, autophagy plays a key role in degrading cellular organelles and cytoplasmic content and thereby enabling the cells to recycle amino acids and nutrients to maintain protein synthesis and ATP generation (61). Several signal transduction pathways are known to regulate the induction of autophagy such as mTORC1 and AMPK, in response to nutrient availability (32,62,63). Recently, a large number of autophagy-related genes (Atg) (32,64) and genes encoding autophagic adapter proteins (38) have been identified in mammals. A number of these autophagy genes have been shown to be upregulated through FoxO3 transcription factor in atrophying muscle cells (65,66). Here, we show that stress-dependent transcription factors ATF4 and CHOP are essential in the transcriptional activation of genes involved in the formation, elongation and function of the autophagosome. These autophagy genes which are activated through the eIF2 α -ATF4 pathway can be divided into three functional groups: (i) the first includes *Becn1* which encodes a protein involved in the formation and maturation of autophagosome; (ii) the second consists of genes encoding proteins belonging to the ubiquitin-like protein (Ubl) system, which is essential for autophagosome formation and includes four Ubl proteins (*Map1lc3b*, *Gabarap*, *Gabarapl2* and *Atg12*), an activating enzyme (*Atg7*), the target of Atg12 attachment (*Atg5*) and *Atg16l1*; (iii) genes encoding cargo receptors that are involved in specific degradation of ubiquitinated substrates (*p62* and *Nbr1*) constitute the third group. Recently, *Map1lc3b* and *Atg5* have also been identified as targets of ATF4 and CHOP through the PERK/eIF2 α pathway (34,55). During activation of the autophagic process (67), autophagy proteins associated with the membrane of autophagosomes are continuously degraded upon fusion with lysosomes. Our results suggest that the eIF2 α /ATF4 pathway could play a key role in replenishing the autophagosome-associated protein pool to allow the cell to maintain autophagy (68,69) and therefore to survive during prolonged periods of stress.

In conclusion, our results reveal a novel regulatory role of the eIF2 α -ATF4 pathway in the fine-tuning of the autophagy gene transcription program in response to stresses. Overall, our data indicate that this pathway could be involved in increasing the capacity to maintain

autophagy in stressed cells. Because the eIF2 α -ATF4 pathway and autophagy are implicated in a variety of pathophysiological processes, a better understanding of ATF4 and CHOP regulatory role in autophagy in different cell systems will be important for the treatment of numerous diseases including cancer and neurodegenerative diseases.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online: Supplementary Tables 1 and 2 and Supplementary Figures 1–3.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Drs D. Ron and H. Harding (Institute of Metabolic Science, Cambridge, UK) for the gift of ATF4- and CHOP-deficient MEFs and CHOP expression plasmids. The authors thank Drs D. Béchet, A. Darfeuille-Michaud and J.C. Pointud for helpful discussions.

FUNDING

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA); Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer. Funding for open access charge: INRA.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Zinszner,H., Kuroda,M., Wang,X., Batchvarova,N., Lightfoot,R.T., Remotti,H., Stevens,J.L. and Ron,D. (1998) CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.*, **12**, 982–995.
- Harding,H.P., Zhang,Y., Zeng,H., Novoa,I., Lu,P.D., Calfon,M., Sadri,N., Yun,C., Popko,B., Paules,R. *et al.* (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell*, **11**, 619–633.
- Wek,R.C., Jiang,H.Y. and Anthony,T.G. (2006) Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem. Soc. Trans.*, **34**, 7–11.
- Harding,H.P., Zhang,Y. and Ron,D. (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase [published erratum appears in Nature 1999 Mar 4;398(6722):90]. *Nature*, **397**, 271–274.
- Hinnebusch,A.G. (2000) Mechanism and regulation of initiator methionyl-tRNA binding to ribosomes. In: Sonenberg,N., Hershey,J.W.B. and Mathews,M.B. (eds), *Translational Control of Gene Expression*. CSHL Pres, Cold Spring Harbor, NY, pp. 185–243.
- Sood,R., Porter,A.C., Olsen,D.A., Cavener,D.R. and Wek,R.C. (2000) A mammalian homologue of GCN2 protein kinase important for translational control by phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 α . *Genetics*, **154**, 787–801.
- Zhang,P., McGrath,B.C., Reinert,J., Olsen,D.S., Lei,L., Gill,S., Wek,S.A., Vattam,K.M., Wek,R.C., Kimball,S.R. *et al.* (2002) The GCN2 eIF2 α kinase is required for adaptation to amino acid deprivation in mice. *Mol. Cell Biol.*, **22**, 6681–6688.
- Wek,R.C. and Cavener,D.R. (2007) Translational control and the unfolded protein response. *Antioxid. Redox Signal.*, **9**, 2357–2371.
- Ameri,K. and Harris,A.L. (2008) Activating transcription factor 4. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **40**, 14–21.
- Harding,H.P., Novoa,I.I., Zhang,Y., Zeng,H., Wek,R., Schapira,M. and Ron,D. (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell*, **6**, 1099–1108.
- Lu,P.D., Harding,H.P. and Ron,D. (2004) Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J. Cell Biol.*, **167**, 27–33.
- Vattam,K.M. and Wek,R.C. (2004) Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 11269–11274.
- Siu,F., Bain,P.J., LeBlanc-Chaffin,R., Chen,H. and Kilberg,M.S. (2002) ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. *J. Biol. Chem.*, **277**, 24120–24127.
- Averous,J., Bruhat,A., Jousse,C., Carraro,V., Thiel,G. and Fafournoux,P. (2004) Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **279**, 5288–5297.
- Bruhat,A., Cherasse,Y., Chaveroux,C., Maurin,A.C., Jousse,C. and Fafournoux,P. (2009) Amino acids as regulators of gene expression in mammals: molecular mechanisms. *Biofactors*, **35**, 249–257.
- Bruhat,A., Averous,J., Carraro,V., Zhong,C., Reimold,A.M., Kilberg,M.S. and Fafournoux,P. (2002) Differences in the molecular mechanisms involved in the transcriptional activation of the CHOP and asparagine synthetase genes in response to amino acid deprivation or activation of the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.*, **277**, 48107–48114.
- Kilberg,M.S., Shan,J. and Su,N. (2009) ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends Endocrinol. Metab.*, **20**, 436–443.
- Su,N. and Kilberg,M.S. (2008) C/EBP homology protein (CHOP) interacts with activating transcription factor 4 (ATF4) and negatively regulates the stress-dependent induction of the asparagine synthetase gene. *J. Biol. Chem.*, **283**, 35106–35117.
- Chen,H., Pan,Y.X., Dudenhausen,E.E. and Kilberg,M.S. (2004) Amino acid deprivation induces the transcription rate of the human asparagine synthetase gene through a timed program of expression and promoter binding of nutrient-responsive basic region/leucine zipper transcription factors as well as localized histone acetylation. *J. Biol. Chem.*, **279**, 50829–50839.
- Bruhat,A., Cherasse,Y., Maurin,A.C., Breitwieser,W., Parry,L., Deval,C., Jones,N., Jousse,C. and Fafournoux,P. (2007) ATF2 is required for amino acid-regulated transcription by orchestrating specific histone acetylation. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 1312–1321.
- Chaveroux,C., Lambert-Langlais,S., Cherasse,Y., Averous,J., Parry,L., Carraro,V., Jousse,C., Maurin,A.C., Bruhat,A. and Fafournoux,P. (2010) Molecular mechanisms involved in the adaptation to amino acid limitation in mammals. *Biochimie*, **92**, 736–745.
- Rzymiski,T., Milani,M., Singleton,D.C. and Harris,A.L. (2009) Role of ATF4 in regulation of autophagy and resistance to drugs and hypoxia. *Cell Cycle*, **8**, 3838–3847.
- Wang,X.Z., Kuroda,M., Sok,J., Batchvarova,N., Kimmel,R., Chung,P., Zinszner,H. and Ron,D. (1998) Identification of novel stress-induced genes downstream of chop. *EMBO J.*, **17**, 3619–3630.
- Sok,J., Wang,X.Z., Batchvarova,N., Kuroda,M., Harding,H. and Ron,D. (1999) CHOP-Dependent stress-inducible expression of a novel form of carbonic anhydrase VI. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 495–504.
- Maiuri,M.C., Zalckvar,E., Kimchi,A. and Kroemer,G. (2007) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 741–752.
- Mizushima,N. (2007) Autophagy: process and function. *Genes Dev.*, **21**, 2861–2873.
- Mizushima,N. and Komatsu,M. (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, **147**, 728–741.
- Levine,B. and Kroemer,G. (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, **132**, 27–42.
- Mizushima,N., Levine,B., Cuervo,A.M. and Klionsky,D.J. (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, **451**, 1069–1075.

30. Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tani, I., Yoshinaga, K. *et al.* (2006) Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 9220–9231.
31. Schroder, M. (2008) Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell Mol. Life Sci.*, **65**, 862–894.
32. Kroemer, G., Marino, G. and Levine, B. (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell.*, **40**, 280–293.
33. Rzymiski, T., Milani, M., Pike, L., Buffa, F., Mellor, H.R., Winchester, L., Pires, I., Hammond, E., Ragoussis, I. and Harris, A.L. (2010) Regulation of autophagy by ATF4 in response to severe hypoxia. *Oncogene*, **29**, 4424–4435.
34. Rouschop, K.M., van den Beucken, T., Dubois, L., Niessen, H., Bussink, J., Savelkoul, K., Keulers, T., Mujcic, H., Landuyt, W., Voncken, J.W. *et al.* (2010) The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J. Clin. Invest.*, **120**, 127–141.
35. Taloczy, Z., Jiang, W., Virgin, H.W.T., Leib, D.A., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Eskelinen, E.L. and Levine, B. (2002) Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2 α kinase signaling pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 190–195.
36. Ye, J., Kumanova, M., Hart, L.S., Sloane, K., Zhang, H., De Panis, D.N., Bobrovnikova-Marjon, E., Diehl, J.A., Ron, D. and Koumenis, C. (2010) The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *EMBO J.*, **29**, 2082–2096.
37. Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A. Jr, Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M. *et al.* (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell*, **5**, 539–545.
38. Johansen, T. and Lamark, T. (2011) Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*, **7**, 279–296.
39. Deval, C., Chaveroux, C., Maurin, A.C., Cherasse, Y., Parry, L., Carraro, V., Milenkovic, D., Ferrara, M., Bruhat, A., Jousse, C. *et al.* (2009) Amino acid limitation regulates the expression of genes involved in several specific biological processes through GCN2-dependent and GCN2-independent pathways. *FEBS J.*, **276**, 707–718.
40. Seibenhener, M.L., Babu, J.R., Geetha, T., Wong, H.C., Krishna, N.R. and Wooten, M.W. (2004) Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 8055–8068.
41. Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H. and Johansen, T. (2005) p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell. Biol.*, **171**, 603–614.
42. Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.A., Outzen, H., Overvatn, A., Bjorkoy, G. and Johansen, T. (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.*, **282**, 24131–24145.
43. Klionsky, D.J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D.K., Aliev, G., Askew, D.S., Baba, M., Baehrecke, E.H., Bahr, B.A., Ballabio, A. *et al.* (2008) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, **4**, 151–175.
44. Lipson, K.E. and Baserga, R. (1989) Transcriptional activity of the human thymidine kinase gene determined by a method using the polymerase chain reaction and an intron-specific probe. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **86**, 9774–9777.
45. Bruhat, A., Jousse, C., Carraro, V., Reimold, A.M., Ferrara, M. and Fafournoux, P. (2000) Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the CHOP promoter. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 7192–7204.
46. Ron, D. and Habener, J.F. (1992) CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev.*, **6**, 439–453.
47. Gachon, F., Thebault, S., Peleraux, A., Devaux, C. and Mesnard, J.M. (2000) Molecular interactions involved in the transactivation of the human T-cell leukemia virus type 1 promoter mediated by Tax and CREB-2 (ATF-4). *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 3470–3481.
48. Carraro, V., Maurin, A.C., Lambert-Langlais, S., Averous, J., Chaveroux, C., Parry, L., Jousse, C., Örd, D., Örd, T., Fafournoux, P. *et al.* (2010) Amino acid availability controls TRB3 transcription in liver through the GCN2/eIF2 α /ATF4 pathway. *PLoS One*, **5** (12), e15716.
49. Mortimore, G.E. and Schworer, C.M. (1977) Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver. *Nature*, **270**, 174–176.
50. Kristensen, A.R., Schandorff, S., Hoyer-Hansen, M., Nielsen, M.O., Jaattela, M., Dengjel, J. and Andersen, J.S. (2008) Ordered organelle degradation during starvation-induced autophagy. *Mol. Cell. Proteomics*, **7**, 2419–2428.
51. Mizushima, N., Yoshimori, T. and Levine, B. (2010) Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, **140**, 313–326.
52. Bjorkoy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Overvatn, A., Brech, A. and Johansen, T. (2009) Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol.*, **452**, 181–197.
53. Ohoka, N., Yoshii, S., Hattori, T., Onozaki, K. and Hayashi, H. (2005) TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J.*, **24**, 1243–1255.
54. Bruhat, A., Jousse, C., Wang, X.Z., Ron, D., Ferrara, M. and Fafournoux, P. (1997) Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. *J. Biol. Chem.*, **272**, 17588–17593.
55. Avivar-Valderas, A., Salas, E., Bobrovnikova-Marjon, E., Diehl, J.A., Nagi, C., Debnath, J. and Aguirre-Ghiso, J.A. (2011) PERK integrates autophagy and oxidative stress responses to promote survival during extracellular matrix detachment. *Mol. Cell. Biol.*, **31**, 3616–3629.
56. Ubeda, M., Wang, X.Z., Zinsner, H., Wu, I., Habener, J.F. and Ron, D. (1996) Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 1479–1489.
57. Ke, P.Y. and Chen, S.S. (2011) Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro. *J. Clin. Invest.*, **121**, 37–56.
58. Kuma, A. and Mizushima, N. (2010) Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system: with an emphasis on nutrient metabolism. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, **21**, 683–690.
59. Lee, I.H., Kawai, Y., Fergusson, M.M., Rovira, II, Bishop, A.J., Motoyama, N., Cao, L. and Finkel, T. (2012) Atg7 modulates p53 activity to regulate cell cycle and survival during metabolic stress. *Science*, **336**, 225–228.
60. Chiribau, C.B., Gaccioli, F., Huang, C.C., Yuan, C.L. and Hatzoglou, M. (2010) Molecular symbiosis of CHOP and C/EBP beta isoform LIP contributes to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, **30**, 3722–3731.
61. Lum, J.J., DeBerardinis, R.J. and Thompson, C.B. (2005) Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 439–448.
62. Blommaert, E.F., Luiken, J.J., Blommaert, P.J., van Woerkom, G.M. and Meijer, A.J. (1995) Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, **270**, 2320–2326.
63. Jung, C.H., Ro, S.H., Cao, J., Otto, N.M. and Kim, D.H. (2010) mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.*, **584**, 1287–1295.
64. Kraft, C. and Martens, S. (2012) Mechanisms and regulation of autophagosome formation. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **24**, 496–501.
65. Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., Burden, S.J., Di Lisi, R., Sandri, C., Zhao, J. *et al.* (2007) FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab.*, **6**, 458–471.
66. Zhao, J., Brault, J.J., Schild, A., Cao, P., Sandri, M., Schiaffino, S., Lecker, S.H. and Goldberg, A.L. (2007) FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and

- proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab.*, **6**, 472–483.
67. Abastado, J.P., Miller, P.F. and Hinnebusch, A.G. (1991) A quantitative model for translational control of the GCN4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *New Biol.*, **3**, 511–524.
68. Ding, W.X., Ni, H.M., Gao, W., Yoshimori, T., Stolz, D.B., Ron, D. and Yin, X.M. (2007) Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am. J. Pathol.*, **171**, 513–524.
69. Weidberg, H., Shvets, E. and Elazar, Z. (2011) Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. *Annu. Rev. Biochem.*, **80**, 125–156.

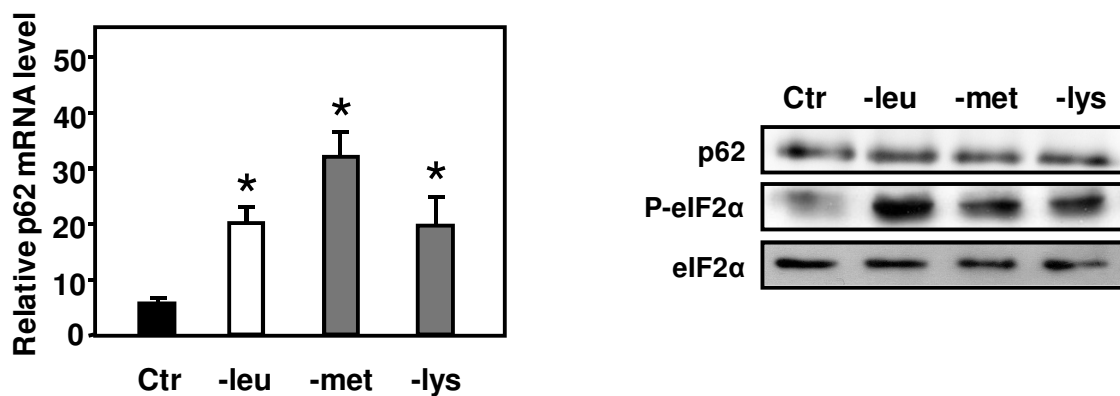


Figure S1: Effect of individual amino acid starvation on *p62* expression.

MEFs were incubated either in control medium (Ctr) or in a medium devoid of one individual amino acid [leucine (-leu), lysine (-lys), methionine (-met)] and harvested after 6 h. Left: total RNA was analyzed for p62 mRNA content. Right: western blot analysis of p62, phosphorylation of eIF2 α and eIF2 α was performed as described in the Materials and Methods section. The graphs show means \pm S.E.M. of three independent experiments. *t* tests have been performed to compare the means. The asterisks indicate a *p* value of ≤ 0.05 relative to the Ctr medium value.

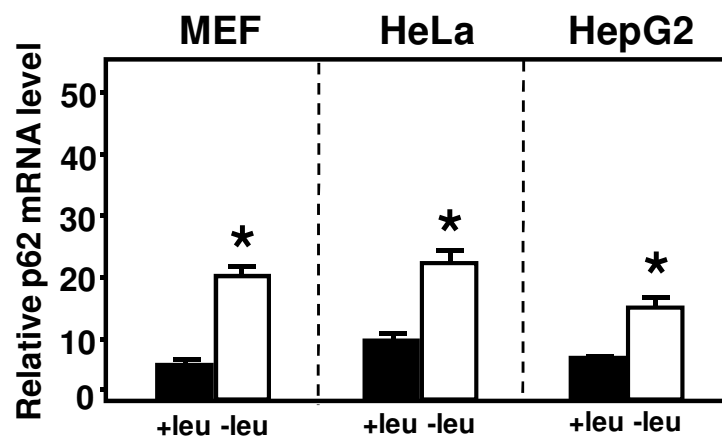


Figure S2: Amino acid-regulated expression of p62 mRNA in mammalian cell lines.

MEFs, HeLa and HepG2 cell lines were incubated for 8 h either in control (+leu) or leucine-free medium (-leu) and harvested after the indicated incubation times. Total RNA was analyzed for p62 mRNA content as described in Materials and Methods. The graphs show means \pm S.E.M. of three independent experiments. *t* tests have been performed to compare the means. The asterisks indicate a *p* value of ≤ 0.05 relative to the +leu medium value.

	<i>Gene</i>	Sequence in mouse : nt from TSS (gene strand)	Mammalian species (IUPAC sequence)	TF binding
AARE 5'-TGATGMMAH-3'	<i>Atg16l1</i>	TGATGAgAg : 107-116(-)	cow (TGATGACAT); dog (TGATGAAA); pig (TGATGCAA); Human (TGATGTA); chimpanzee (TGATGAA); horse (TGATGA); rat (TGATG)	ATF4
	<i>Map1lc3b</i>	TGATGCCAC : 1140-48(-)	rat (TGATGCCAT); horse (TGATGACAA); pig (TGATGA); Human, macaque, cow (TGATG)	ATF4
	<i>Atg12</i>	TGATGAgAA : 2837-29(-)	dog (TGATGCAAT); cow (TGATGCCAA); rat (TGATGTCA); Human, chimpanzee, macaque (TGATGTA); pig (TGATGAC)	ATF4
	<i>Atg3</i>	TGATGCCtT : 1397-403(-)	rat (TGATGCAAT); Human, dog (TGATGCC); pig (TGATGC)	ATF4
	<i>Becn1</i>	TGATGCCtT : 1446-52(-)	dog (TGATGAAA); Human, horse, cow (TGATGA); rabbit (TGATGC)	ATF4
	<i>Gabarapl2</i>	TGATGACAA : 858-66(+)	cow, pig, horse (TGATGACAA); Human, chimpanzee, macaque (TGATGAA); dog, rabbit, rat (TGATGAC)	ATF4
	<i>p62</i>	TGATGACAC : 1348-56(-)	rat (TGATGACAC); cow (TGATGACAA); Human, pig (TGATGTCA)	ATF4 CHOP
	<i>Nbr1</i>	TGATGAAAA : 2610-18(+)	rabbit (TGATGAAAA); horse (TGATGTCAA); cow (TGATGTCA); Human, macaque, dog (TGATGAA); pig (TGATGTC); rat (TGATGMM)	ATF4 CHOP
	<i>Atg7</i>	TGATGAAtC : 1070-76(+)	Human (TGATGACAT); dog (TGATGAAAA); cow (TGATGCCAT); macaque (TGATGCC); chimpanzee (TGATGC), horse, pig (TGATGA)	ATF4 CHOP
CHOP-RE 5'-HTGCAAYC-3'	<i>Atg10</i>	CCTGCAACCCG : 117-27(-)	rabbit (CATGCAATCCT); pig (CCTGCAACCTC); rat CTGCAACC); horse (ATGCAATC); Human, chimpanzee (TTGCAAT); dog (ATGCAAC)	CHOP C/EBPβ
	<i>Gabarap</i>	CTGCAAAa : 23-28(-)	dog (ATTGCAATCCC); rat (ATTGCAA); Human (AATGCAA); chimpanzee (ACTGCAA)	CHOP C/EBPβ
	<i>Atg5</i>	GTGCAACg : 959-65(-)	cow, rabbit (CTGCAACC); Human, chimpanzee (AATGCAA); horse (GATGCAA)	CHOP C/EBPβ

Figure S3: Identification of putative AARE and CHOP-RE in the autophagy gene promoters.

The IUPAC Amino Acid Response Elements (AARE) and CHOP regulatory elements (CHOP-RE) were searched for the sequence promoters (up to 4000 nt from the transcription start sequence TSS) from all the mammalian genome sequences included in Ensembl release 69. All the IUPAC sequences are searched with the “Scan sequence with IUPAC-patterns” tool, (Genomatix Software GmbH, Munich, Germany) as described in the Materials and Methods section. For mouse sequences, nucleotides in capital letters denote the core sequence of the element. The symbols in brackets indicate the localisation of regulatory elements in coding (+) or noncoding (-) strands. The binding of CHOP, ATF4 and C/EBPβ transcription factors (TF binding) to AARE or CHOP-RE is indicated.

Supplementary table 1. qPCR primers

Gene	Forward	Reverse
<i>Asns</i>	5'-TACAACCACAAGGCGCTACA-3'	5'-AAGGGCCTGACTCCATAGGT-3'
<i>p62/Sqstm1</i>	5'-TGGGCAAGGAGGAGGCGACC-3'	5'-CCTCATCGCGGTAGTGCGCC-3'
<i>Nbr1</i>	5'-TTCCAGGAAGACTACAATTC-3'	5'-ATGCAATTCTTCCTTCTTAG-3'
<i>Atg12</i>	5'-GGAGACACTCCTATAATGAAA-3'	5'-ATAAATAAACAACCTGTTCCGA-3'
<i>Atg2</i>	5'-TACTTGCTACAGCACTACTTG-3'	5'-AACTCGTTTACAGACCAG-3'
<i>Atg3</i>	5'-AGGAATCAAAATTTAAGGAAA-3'	5'-TTTGTCTGTCGGAAGATATG-3'
<i>Atg5</i>	5'-ATATCAGACCACGACGGAGC-3'	5'-TTGGCTCTATCCCGTGAATC-3'
<i>Atg7</i>	5'-TAATAGTGCCCTGGACG-3'	5'-GCAGAGTCACCATTGTAGTA-3'
<i>Atg10</i>	5'-CAAAACACAGTTTTCGAATAA-3'	5'-TCATGTTTAATCACTTCTGC-3'
<i>Atg16l1</i>	5'-AGATGAATGAAGCAAAGATT-3'	5'-AGTAAAAGTAATCTGCAGGG-3'
<i>Becn1</i>	5'-GAATGCTGTTTGATACTGTG-3'	5'-TTTTAAGGAAAAACATACAGG-3'
<i>Gabarap</i>	5'-GAGAAAATCCGAAAGAAATA-3'	5'-TGACCAACTGTAAGATCAGA-3'
<i>Gabarap2</i>	5'-ATGAAGTGGATGTTTAAGGA-3'	5'-TATGTCAACAATCTGAGAGC-3'
<i>Map1lc3b</i>	5'-CGTCCTGGACAAGACCAAGT-3'	5'-ACCATGTACAGGAAGCCGTC-3'
<i>Atf4</i>	5'-TCGATGCTCTGTTTTCGAATG-3'	5'-AGAATGTAAAGGGGGCAACC-3'
<i>chop</i>	5'-CCTAGCTTGGCTGACAGAGG-3'	5'-CTGCTCCTTCTCCTTCATGC-3'

Supplementary table 2. qPCR primers used to detect promoter-enrichment in ChIP			
Gene	Forward	Reverse	Amplicon location
<i>p62 AARE</i>	5'-CCTGGTTTTGGCGTTTGTAT-3'	5'-GGGATACAGGTCATGAGGATT-3'	-1306 to -1193
<i>p62 5' distal</i>	5'-GCTAAACACCCAGGCACTTC-3'	5'-AGTCCTGTGTCCCACACCTC-3'	-6590 to -6474
<i>Atg5</i>	5'-GACAGAGCAAAGTGTCGTGG-3'	5'-TGAGACAAGCTCTCGTGCAA-3'	-1097 to -947
<i>Map1lc3b</i>	5'-TCCCTTGACAAACAGCACT-3'	5'-TCTGGGCCTCAAGCTACTTC-3'	-1265 to -1042
<i>Atg12</i>	5'-AATTTCGAAGACAAGAATAGC-3'	5'-GGATATACAGATCCTTTTGC-3'	-3168 to -2932
<i>Atg10</i>	5'-TAACTTCTAAGCCCCTTTTA-3'	5'-TGTAAGTCCATATTGTTTCG-3'	-863 to -714
<i>Atg16l1</i>	5'-GATGGTTTGAGTCTAGGTGT-3'	5'-GTAATTTCTCTCTGCTGCAT-3'	-526 to -393
<i>Nbr1</i>	5'-GATAAATCCATTTCTCCAG-3'	5'-GGCAAGGTAAGCTACTGTAT-3'	-3065 to -2961
<i>Gabarapl2</i>	5'-ATTTAGTTTCTGTTCCCAAG-3'	5'-ATTGAGTGTTATGTTGCAGA-3'	-1504 to -1382
<i>Gabarap</i>	5'-CTTTGGCTTCTATCAGATT-3'	5'-TAACTGGTGTTGGTGAAATA-3'	-1310 to -1178
<i>Atg7</i>	5'-TGATCATCCTGGACTATAGAA-3'	5'-TGAACATAATGAAATGCTCT-3'	-969 to -865
<i>Beclin1</i>	5'-TGGATTACTAGAGGCAGAAT-3'	5'-TTGTCCTAGAACAGAACCTT-3'	-1427 to -1311
<i>Atg3</i>	5'-TAGGAGCCCAACTAGATAAC-3'	5'-ATTTAAGTGCAAGGTAAAGC-3'	-1657 to -1512

5. Résultats

Les résultats que nous avons obtenus montrent que : (1) Les kinases GCN2 et PERK activatrices de la voie eIF2 α /ATF4, ainsi que les facteurs de transcription ATF4 et CHOP sont importants dans la régulation positive de la transcription d'un grand nombre de gènes impliqués dans les différentes étapes du processus autophagique. (2) Nous avons pu mettre en évidence trois classes de gènes de l'autophagie selon leur dépendance à ATF4 et CHOP et la liaison de ces facteurs sur les éléments spécifiques de leurs promoteurs en fonction de l'intensité du stress.

5.1. Implication des kinases GCN2 et PERK et des facteurs de transcription ATF4 et CHOP dans la régulation de la transcription des gènes de l'autophagie

Afin de maintenir son homéostasie et survivre aux divers stress cellulaire, les cellules mettent en place certains processus physiologiques tel que le processus autophagique ainsi que l'activation de certaines voies de signalisation qui font intervenir de nombreux acteurs dont les facteurs de transcription. Lors de divers stress cellulaires, la traduction du facteur de transcription ATF4 est induite et par la suite ce dernier va réguler la transcription de gènes cibles en se fixant sur leurs séquences CARE au niveau de leurs promoteurs. En cas de carences en acides aminés, ces séquences CARE agissent comme des séquences AARE.

Lors d'une carence en un acide aminé essentiel (Leucine), la cellule met en place le processus autophagique afin de faire face à ce stress. Nous avons pu observer une augmentation de la régulation de l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans ce processus lors d'une cinétique de carence (**Figure 1**). Ensuite, en utilisant p62, une protéine qui joue un rôle très important dans le processus autophagique, comme modèle d'étude, nous avons pu mettre en évidence dans des cellules en culture (MEFs), que la voie GCN2/eIF2 α /ATF4 joue un rôle clé dans l'activation de la transcription de *p62* et contribue à maintenir le niveau de la protéine en réponse à une carence en leucine (**Figure 2**). De plus, nous avons pu identifier un AARE fonctionnel dans le promoteur de *p62* sur lequel se fixent les facteurs de transcription ATF4 et CHOP (**Figure 3**). Ces deux facteurs sont indispensables et coopèrent pour activer la transcription (**Figure 4**). Les mêmes résultats ont été obtenus dans le cas d'un autre stress activateur de la voie eIF2 α /ATF4 via la kinase PERK (**Figure 7**).

5.2. Classifications des gènes de l'autophagie selon leur dépendance à ATF4 et CHOP

Grâce à l'alignement des séquences promotrices des différents gènes impliqués dans le processus autophagique chez différentes espèces, nous avons réussi à mettre en évidence d'une part, la conservation de la séquence AARE qui fixe le facteur de transcription ATF4 étudiée chez p62 chez un ensemble de gènes autophagiques (*p62*, *Atg16l1*, *Map1lc3b*, *Atg12*, *Atg3*, *Becn1*, *Gabarapl2*, *Nbr1*, et *Atg7*), et d'autre part, l'existence d'une séquence CHOP-RE qui fixe le facteur de transcription CHOP, conservée sur les séquences promotrices des gènes *Atg5*, *Atg10* et *Gabarap* (**Figure S3**). La technique d'immuno-précipitation de la chromatine (CHIP et double-CHIP) nous a permis de déterminer différents groupes de gènes impliqués dans l'autophagie selon leur dépendance à ATF4 et CHOP (**Figure 5**).

Dans la première classe de gènes (*Atg16l1*, *Map1lc3b*, *Atg12*, *Atg3*, *Becn1*, et *Gabarapl2*), seul ATF4 se fixe sur la séquence AARE promotrice afin de réguler la transcription de ces gènes en réponse au stress cellulaire.

Dans la deuxième classe de gènes (*p62*, *Nbr1*, et *Atg7*), ATF4 et CHOP se fixent sur la séquence AARE promotrice et coopèrent afin de réguler la transcription de ces gènes lors d'un stress cellulaire.

Enfin, dans la troisième classe de gènes dépendants d'ATF4 et CHOP (*Atg10*, *Atg5* et *Gabarap*), CHOP se fixe sur la séquence CHOP-RE sans ATF4 et coopère avec CEBP/β afin d'activer la transcription de ces gènes lors d'un stress cellulaire.

Selon leur dépendance à ATF4 et CHOP, ces gènes présentent une sensibilité différente au stress cellulaire (**Figure 6**). En effet, les gènes qui fixent à la fois ATF4 et CHOP (2^{ème} classes de gènes) sur leurs séquences AARE promotrices présentent une régulation de leur transcription la plus sensible au stress cellulaire induit par une carence partielle en leucine (100μM). Les 2 autres classes de gènes présentent une sensibilité moindre à la carence en leucine. En effet, la régulation de la transcription de la plus part de ces gènes est induite à des concentrations très basses en leucine (entre 70μM et 0μM).

6. Conclusion

En réponse à un stress cellulaire telle que la carence en acides aminés ou les stress du réticulum endoplasmique, la cellule met en route des processus physiologiques de survie qui

vont lui permettre de faire face à ces divers stress. Parmi ces processus, l'autophagie est le processus de survie cellulaire le plus connu et le plus étudié. La voie de signalisation eIF2 α /ATF4 est activée via la kinase GCN2 en cas de carence en acides aminés ou via PERK en cas de stress ER régulant ainsi l'expression des gènes impliqués dans le processus autophagique. Les résultats que nous avons obtenus nous ont permis de mettre en évidence l'existence de différents groupes de gènes impliqués dans l'autophagie selon leur dépendance à ATF4 et CHOP. Cette découverte a révélé aussi une différence de leurs sensibilités vis-à-vis l'intensité du stress cellulaire. En effet les gènes (*p62*, *Nbr1*, et *Atg7*) qui sont régulés via la coopération entre ATF4 et CHOP qui se fixent sur leur séquence promotrice de type AARE présentent une sensibilité plus importante à la diminution de la concentration en leucine comparés à ceux qui fixent seulement ATF4 (*Atg16l1*, *Map1lc3b*, *Atg12*, *Atg3*, *Becn1*, et *Gabarapl2*) ou CHOP et CEBP/ β (*Atg10*, *Atg5* et *Gabarap*) sur leurs séquences promotrices. L'ensemble des résultats que nous avons obtenus, suggèrent le rôle clé que pourrait jouer la voie eIF2 α /ATF4 dans le maintien du processus autophagique dans les cellules soumises à un stress.



Publication 2

B'chir W, Carraro V, Jousse C, Chaveroux C, Maurin AC, Averous J, Muranishi Y, Parry L, Fafournoux P and Bruhat A. (2013)

“Dual role of CHOP in amino acid-regulated gene transcription of autophagy and Apoptosis”

En cours de soumission

Publication 2

Rôles de CHOP dans la régulation des processus autophagique et apoptotique en réponse à une carence en acides aminés

1. Introduction

La survie cellulaire dans des conditions de stress de courte durée (2h-8h) comme une carence en acides aminés ou un stress du RE met en jeu l'activation de certaines voies de signalisation telle que la voie eIF2 α /ATF4. L'activation de cette voie participe à la mise en place de processus physiologiques de survie, principalement le processus autophagique. Dans l'article précédent, nous avons pu mettre en évidence le rôle clé de cette voie dans la régulation de la transcription des gènes impliqués dans le processus autophagique notamment, grâce aux deux facteurs de transcription ATF4 et CHOP qui vont se fixer sur les séquences promotrices de type AARE (fixation de ATF4 avec ou sans CHOP) ou CHOP-RE (fixation de CHOP et CEBP/ β) afin de permettre le maintien de l'autophagie (B'Chir et al, 2013).

Le facteur de transcription CHOP est aussi connu pour son activité pro-apoptotique lors de condition d'un stress du RE *via* la régulation des protéines de la famille Bcl-2. D'une part, CHOP régule négativement l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (McCullough et al, 2001). D'autre part, ce facteur provoque la translocation de la protéine pro-apoptotique Bax du cytosol à la mitochondrie où elle induit le relargage du cytochrome c (Gotoh et al, 2004). CHOP induit la transcription de deux autres gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques: (1) PUMA, qui conduit à l'activation consécutive de Bax (Cazanave et al, 2010), et (2) Bim qui induit la mort cellulaire en perméabilisant la membrane mitochondriale externe (Puthalakath et al, 2007).

Etant donné le rôle connu de la voie eIF2 α /ATF4 et du facteur de transcription CHOP dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans l'autophagie et l'apoptose lors d'un stress cellulaire, il apparait intéressant d'étudier le rôle séquentiel de la voie eIF2 α /ATF4/CHOP dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans les processus autophagique et apoptotique lors d'une carence en un acide aminé indispensable.

2. Stratégie expérimentale

Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) obtenus à partir de souris invalidées pour l'expression du gène *CHOP* (CHOP^{-/-}) ou sauvages (CHOP^{+/+}). Ces cellules ont été carencées en un acide aminé indispensable, la leucine pendant une durée allant de 4 à 48 heures. Les MEFs nous ont été fournies par le laboratoire de D. Ron (University of Cambridge, Metabolic Research Laboratories, Cambridge, UK).

2.1. Etude de la survie cellulaire : Test XTT

Les tests de réduction du XTT (ou MTT) sont basés sur la capacité des cellules vivantes à réduire un sel soluble de tétrazolium jaune en un précipité de formazan insoluble de couleur violette grâce aux déshydrogénases mitochondriales. La suspension cellulaire est cultivée en microplaques de 96 puits en présence d'un milieu de culture carencé ou non, puis colorée par le XTT. L'intensité de coloration est alors lue par un spectrophotomètre. Elle dépend du nombre de cellules vivantes après culture, donc de leur état prolifératif et de leur viabilité. Cette méthode présente le grand avantage de pouvoir être automatisée au moyen de lecteurs ELISA permettant un grand nombre de tests simultanés sur de nombreuses conditions cellulaires et ainsi une mesure objective de la viabilité cellulaire (Koban et al, 2012).

2.2. Suivi cellulaire des autophagosomes par fluorescence directe: mCherry-EGFP-LC3B

La construction pBABE-puro mCherry-EGFP-LC3B (Addgene #22418) est un vecteur qui permet d'exprimer à la fois, la protéine de fusion EGFP-LC3B et la protéine mCherry. Des lignées stables CHOP^{+/+} et CHOP^{-/-} ont été obtenues grâce à une infection avec la construction mCherry-EGFP-LC3B par lentivirus et sélectionnées suite à leur résistance à la puromycine. Dans les cellules CHOP^{+/+} et CHOP^{-/-} carencées en leucine et observées par microscopie à fluorescence inversée, la colocalisation du marquage GFP (vert) et mCherry (rouge) permet de distinguer les autophagosomes (orange) des autolysosomes (marquage rouge seul). En effet, la GFP (Green Fluorescent Protein) est sensible au pH acide, elle s'exprime dans les endosomes et les phagosomes qui ont un pH entre 6.1 et 5.5 (vert). Par contre, la protéine fluorescente mCherry est résistante à l'acidité du pH cellulaire et s'exprime dans les lysosomes et les autolysosomes (pH acide autour de 4,7; rouge). Quand le phagosome fusionne avec le lysosome donnant ainsi l'autolysosome à pH acide, le comarquage mCherry-EGFP donne la couleur orange.

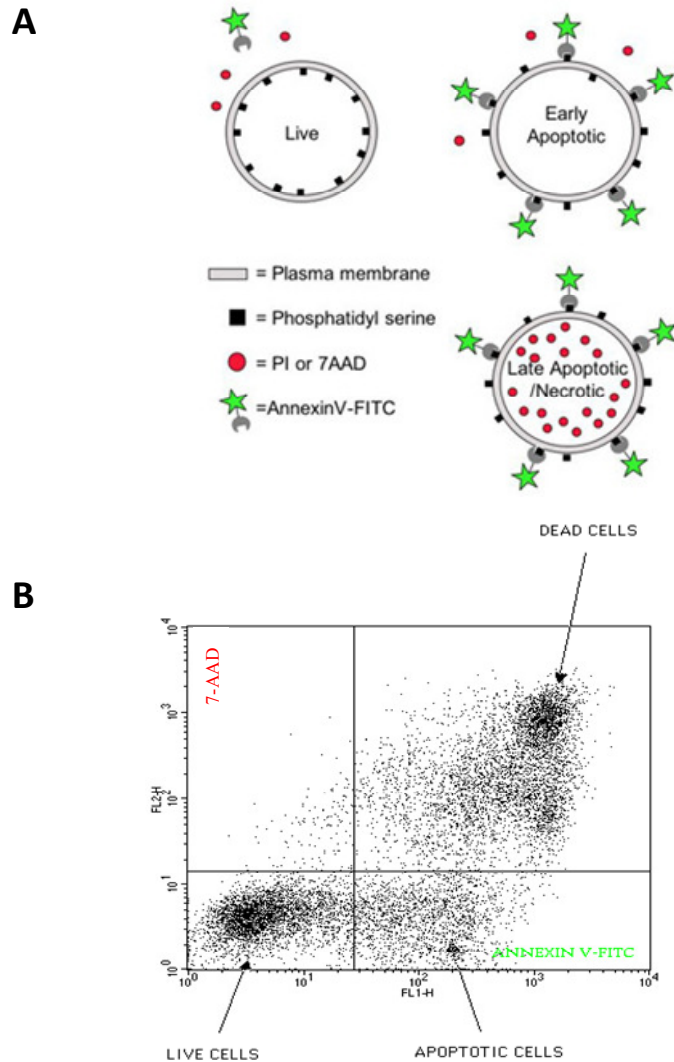


Figure 56: Etude de la mort cellulaire par cytométrie en flux (FACS) des cellules double marquées par le 7-AAD et l'Annexine V. L'annexine V fluorescente va se fixer au niveau des membranes cellulaires. Le marquage concomitant avec un colorant marquant les cellules mortes comme l'iodure de propidium (IP) ou le 7AAD permet de différencier les cellules: Annexine V+/7-AAD- ayant commencé l'apoptose; Annexine V+/7-AAD+ mortes par apoptose; Annexine V-/7-AAD+ mortes par nécrose.

2.3. Etude de la mort cellulaire

a) Analyse du double marquage Annexin-V/7-AAD par FACS

❖ *Principe de la cytométrie en flux (FACS)*

La cytométrie en flux est une technique permettant le défilement des cellules à grande vitesse dans le faisceau d'un laser. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide qui consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser ou d'une lampe à arc. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs :

- aux propriétés optiques intrinsèques des particules qui correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule ou à leur structure interne.
- aux propriétés optiques de fluorescence obtenues par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires. Ces signaux séparés par des filtres optiques sont collectés par des photomultiplicateurs (PMT), amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur par l'intermédiaire d'une composante informatique et optique (miroir dichroïque et filtre optique). Ce procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représente sous la forme d'histogrammes (un paramètre) ou de cytogrammes (deux paramètres) sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées.

b) Double marquage Annexin-V et 7-amino-actinomycine D (7-AAD)

L'annexin-V permet de marquer les phosphatidylsérines qui sont exposées à la surface des cellules suite à l'entrée en apoptose des cellules. Le 7-AAD est un intercalant de l'ADN qui ne pénètre dans la cellule que si la membrane est perméabilisée. L'exposition des phosphatidylsérines étant un des premiers événements intervenant lors de l'apoptose, nous pouvons identifier l'état de la mort cellulaire (cellules en nécrose, cellules en apoptose, cellules déjà mortes) selon le double marquage en annexin-V et en 7-AAD. L'utilisation de la technique du cytométrie en flux (FACS) permet l'identification de ces différentes populations cellulaires selon leur état apoptotique (**Figure 56**).

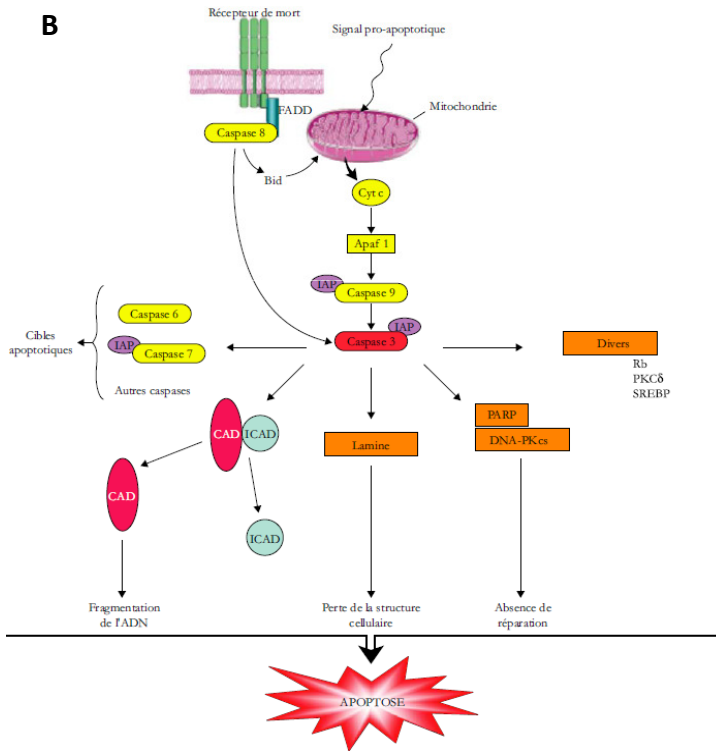
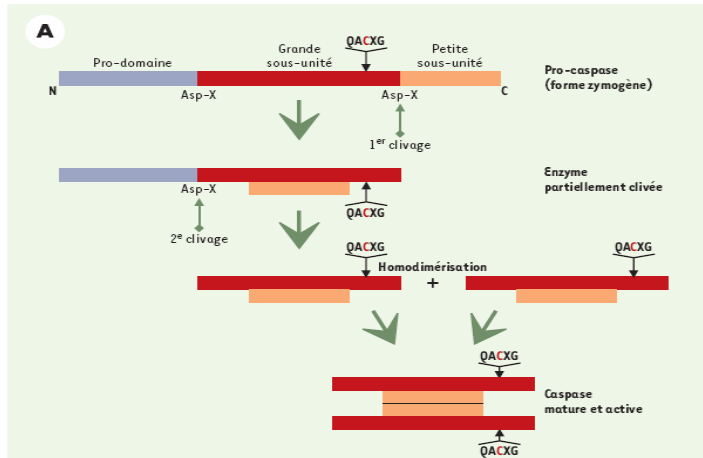


Figure 57: Activation des caspases et leur implication dans le processus apoptotique. (A) Dans leur forme inactive (zymogène), les caspases sont constituées d'un pro-domaine, d'une grande sous-unité portant le site catalytique et d'une petite sous-unité. Leur clivage en deux étapes successives, libérant d'abord la petite sous-unité puis la grande, conduit à la formation de la forme active de l'enzyme: deux hétérodimères composés de l'association des deux sous-unités, et comprenant donc deux sites catalytiques. **(B)** Les caspases 8 et 9 sont des caspases initiatrices; une fois activées (clivées), elles vont induire le clivage des caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7) qui vont par la suite activer une cascade de signalisation menant à la mort cellulaire par apoptose.

c) Clivage de la Caspase 3

Le signal de la mort cellulaire arrive au niveau des mitochondries soit par l'intermédiaire de voies métaboliques particulières, soit par l'activation de récepteurs de mort. Ces signaux conduisent à un relargage de cytochrome C des mitochondries et à une activation des caspases en cascade qui induit une dégradation de la poly ADP-ribose polymérase (PARP), une fragmentation intranucléase de l'ADN, ainsi que des dégradations de protéines de la membrane nucléaire (lamine) se traduisant par des modifications morphologiques (condensation et/ou fragmentation nucléaire). La caspase 3 est une caspase effectrice, active à l'état clivé (**Figure 57**). Elle est distribuée uniformément dans le cytosol mais des études immunohistochimiques ont montré qu'elle peut aussi se transloquer au niveau nucléaire. En effet, l'augmentation de la perméabilité pendant l'apoptose lui permet d'entrer dans le noyau par simple diffusion. Elle joue un rôle primordial dans l'apoptose et pendant le développement. De ce fait, l'étude du clivage de la caspase 3 notamment par la technique de Western-Blot, représente un bon marquage de la mise en place de l'activité apoptotique au niveau de la cellule.

3. Publication

B'chir W, Carraro V, Jousse C, Chaveroux C, Maurin AC, Averous J, Muranishi Y, Parry L, Fafournoux P and Bruhat A.

“Dual role of CHOP in amino acid-regulated gene transcription of autophagy and Apoptosis”

(En cours de soumission).

+ Supplementary data

Dual role for CHOP in the control of amino acid-induced autophagy and apoptosis.

Wafa B'chir^{1,2}, Valérie Carraro^{1,2}, Céline Jousse^{1,2}, Cédric Chaveroux^{1,2}, Anne-Catherine Maurin^{1,2}, Julien Averous^{1,2}, Yuki Muranishi^{1,2}, Laurent Parry^{1,2}, Pierre Fafournoux^{1,2} and Alain Bruhat^{1,2,*}

¹ INRA, UMR 1019 Nutrition Humaine, Centre de Clermont-Ferrand-Theix, F-63122 Saint Genès Champanelle, France ; ² Université Clermont 1, UFR Médecine, UMR 1019 Nutrition Humaine, Clermont-Ferrand, France

*Corresponding author: Tel : +33 4 73 62 41 50 ; Fax : +33 4 73 62 47 55 ;

Email: alain.bruhat@clermont.inra.fr

Key words: CHOP, autophagy, apoptosis, gene transcription.

Abstract

The transcription factor CHOP has been shown to directly regulate genes that are either central for apoptosis or involved in the autophagic process. In this report, we investigate the mechanisms by which CHOP can control cell survival in response to amino acid starvation. We show that during the first 6 h of starvation, CHOP upregulates a number of autophagy genes while cell viability is not affected. By contrast, when the amino acid starvation is prolonged, we demonstrated that CHOP has a dual role in both limiting autophagy and inducing apoptosis through the transcriptional activation of specific target genes.

List of abbreviations: AARE, amino acid response element; ATF, activating transcription factor; bZIP, basic leucine zipper; BIM, Bcl2 interacting mediator of cell death; ChIP, chromatin immunoprecipitation; CHOP, C/EBP homologous protein; LUC, luciferase; PUMA, p53 upregulated modulator of apoptosis;

1. Introduction

In mammalian cells, several pathways initiate a wide array of adaptive mechanisms that allow them to survive to many stressful environmental conditions such as nutrient deprivation. The signal transduction pathway that is triggered in response to amino acid starvation includes the activation of the GCN2 kinase which phosphorylates the α subunit of translation initiation factor eIF2 (eIF2 α) on serine 51 [1]. This phosphorylation provokes a suppression of global protein synthesis and a paradoxically increase in the translation of selected mRNAs including the activating transcription factor 4 (ATF4) [2]. Once induced, ATF4 functions as a master regulator for transcription of specific target genes playing a crucial role in stress adaptation [3].

In response to amino acid starvation, ATF4 initiates this transcription program by binding to Amino Acid Response Element (AARE) located in the promoters of target genes [4, 5]. Among the ATF4-target genes, CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) homology protein (*CHOP*) is one of the most induced [6]. *CHOP* encodes an ubiquitous transcription factor that heterodimerizes with the other members of the C/EBP and jun/fos family members and is one of the most important components in the network of stress-inducible transcription [7-11]. At the cellular level, CHOP is considered as a mediator of apoptosis [12, 13]. This transcription factor was shown to facilitate cell death through regulation of genes that are central for the control of apoptosis such as *Puma*, *Bim* or *Bcl2* [14-16]. On the other hand, recent studies have identified CHOP as a direct regulator of numerous genes involved in the autophagic process [17, 18]. Indeed, CHOP promotes the expression of autophagy genes through the cooperation with ATF4 and/or C/EBP β in order to maintain autophagy in response to amino acid deficiency [18]. Considering the two antagonized functions related to CHOP, we hypothesized that the connection between CHOP and apoptosis is related to the ability of CHOP to influence the balance between autophagy and apoptosis. However, the underlying mechanisms by which CHOP can control cell fate are not well understood.

The focus of this study is on the mechanisms by which the eIF2 α /ATF4/CHOP pathway can control cell survival in response to amino acid starvation. In this report we provide evidence that during the first 6 h of starvation, CHOP upregulates a number of autophagy genes while cell viability is not affected. By contrast, when the amino acid starvation is prolonged, CHOP appears to have a dual role in both limiting autophagy and inducing apoptosis through the transcriptional activation of specific target genes.

2. Materials and Methods

2.1 Cell culture and treatment conditions

Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were cultured at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium F12 (DMEM/F12) (Sigma) containing 10% fetal bovine serum. For amino acid starvation experiments, cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and refed with a medium containing different concentrations of amino acids supplemented with 10% dialysed calf serum. A DMEM/F12 medium devoid of leucine, glutamine, lysine and methionine (Sigma, cat no D9785) was used to make media lacking leucine. MEFs deficient in CHOP [13] were kindly given by Dr. D. Ron (Institute of Metabolic Science, Cambridge, UK).

2.2 Establishment of stable cell lines overexpressing mCherry-EGFP-LC3B.

The pBABE-puro mCherry-EGFP-LC3B construct was obtained from addgene (22418). The stable CHOP ^{+/+} and CHOP ^{-/-} cell lines were generated by infection with mCherry-EGFP-LC3B lentivirus.

2.3 Cell survival assay

Cells were seeded in 96-well cell culture plates and cultured either in control or leucine-free medium. The viability of the cells was measured using XTT Cell Viability Kit (Cell Signaling Technology (Beverly, MA ; cat no. 9095).

2.4 Apoptosis assays.

Apoptosis was evaluated by flow cytometry analysis using the ANXA5-PE/7-AAD apoptosis detection kit purchased from BD Biosciences (cat no. 559763) following the manufacturer's instruction. Caspase activation was detected by western blot.

2.5 Analysis of gene expression using real time RT-PCR

Real-time RT-PCR were performed as previously described [18]. The primer sequences for specific mouse mRNA sequences are listed on Supplementary Table 1. To control for RNA quality and cDNA synthesis, β -actin mRNA was also amplified with forward (5'-TACAGCTTCACCACCACAGC-3') and reverse primers (5'-AAGGAAGGCTGGAAAAGAGC-3'). The abundance of each RNA was normalized to the β -actin signal. Each experiment was repeated three times to confirm the reproducibility of the results.

2.6 Antibodies

ATF4 (sc-200), CHOP (sc-575), β -actin (sc-7210) and normal rabbit IgG (sc-2027) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA). The p62 antibody was obtained from Abnova (cat. no. H00008878-M01). The CHOP (cat no. 5554S), eIF2 α (cat no. 9722S), P-eIF2 α (cat no. 3398S), Caspase-3 antibody (cat no. 9662S) and cleaved caspase-3 antibodies (9661S) used in western blot analysis were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). The MAP1LC3B antibody was from Sigma (cat no. L7543) .

2.7 Immunoblot analysis

Western blots analysis were performed as previously described [18].

2.8 Chromatin immunoprecipitation analysis (ChIP)

ChIP analysis was performed as previously described [18]. Purified immunoprecipitated DNA was analyzed by Real-time quantitative PCR as described (for a list of primer sequences, see Supplementary Table 2). The results are expressed as the percentage of antibody binding versus the amount of PCR product obtained using a standardized aliquot of input chromatin (% of Input). Samples from at least three independent immunoprecipitations were analyzed in duplicate PCR assays and results are reported as the means \pm S.E.M.

3. Results and discussion

3.1 Role of CHOP in a decrease of cell survival in response to long-time leucine starvation.

To analyse the role of CHOP in the control of cell survival, we used CHOP knockout Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) and the corresponding wild-type cells. Protein analysis showed that in wild-type cells, phosphorylation of eIF2 α , ATF4 and CHOP protein levels were markedly increased by both a short (6h) or a long-time (16-48h) leucine starvation (Figure 1A). A similar induction of eIF2 α phosphorylation and ATF4 levels was also observed in CHOP^{-/-} cells as expected. Kinetic analysis revealed that CHOP mRNA levels was markedly induced in response to 4-48h of leucine starvation (Figure 1B). ChiP assays performed by using primer sets covering the *CHOP* AARE confirmed that both ATF4 and CHOP were bound to *CHOP* promoter following leucine deprivation.

We next sought to determine the role of CHOP in the control of cell survival in response to amino acid starvation. To this end, CHOP^{+/+} and CHOP^{-/-} MEFs were subjected to leucine-free medium for 4-48 h and cell viability was assessed. Viable numbers of cells were almost identical in both genotype following a short-time (4-6 h) of leucine starvation (Figure 1B). By contrast, CHOP^{-/-} MEFs showed an enhanced cell survival in response to a long-time (16-48h) leucine deprivation compared to wild-type cells. Collectively, these results showed that CHOP is involved in the control of cell viability following a prolonged leucine starvation.

3.2 Role of CHOP in regulation of apoptosis in response to a prolonged leucine starvation.

To address the role of CHOP in amino acid-induced apoptosis, we measured the levels of the cleaved form of the caspase 3 (CASP-3), an apoptotic marker, in CHOP^{+/+} and CHOP^{-/-} subjected to an amino acid deprivation. Cleaved CASP-3 increased from 16 h of leucine deprivation and reached a maximum within 24 h of treatment in wild-type MEF (Figure 2A). By contrast, CHOP^{-/-} cells cultured in leucine-free medium did not exhibit detectable levels of CASP-3 cleavage before 24 h with a maximum at 36 h. Flow cytometry analysis of apoptotic population by annexin V staining showed that the lack of CHOP reduced the percentage of apoptotic cells from 16 h or 24 h of leucine starvation (Figure 2B). These data confirm the important role of CHOP in amino acid-induced apoptosis.

Previous studies have described that CHOP is involved in the control of cell death through the regulation of key pro-apoptotic genes such as *Bim* and *Puma* [19-22]. We then addressed the role of CHOP in the amino acid regulated transcription of these genes involved in the control of cell death. Gene expression measurements showed that both PUMA and BIM mRNAs were markedly induced in response to 16-48 h of leucine starvation (Figure 2C). Lack of CHOP abolished the PUMA and BIM mRNA inducibility in cells deprived of leucine. CHIP assays clearly showed that CHOP and ATF4 were recruited to *Bim* promoter from 16 h of leucine starvation whereas only CHOP was bound to those of *Puma*. Altogether these results highlighted that CHOP through the direct regulation of specific genes related to the apoptotic process, plays a role in the control of cell death in response to a prolonged leucine starvation.

3.3 Role of CHOP in the control of autophagy in response to a long-time of leucine starvation.

We have shown above that in the absence of CHOP expression, cell survival was enhanced following a prolonged leucine starvation. To assess the role of CHOP in the regulation of autophagy in amino acid-starved cells, we monitored the processing of MAP1LC3-B, an

important marker for autophagy [23]. Conversion of MAP1LC3B from its cytosolic form (LC3-I) to its lipidated membrane-bound form (LC3II) in CHOP-null MEFs and their corresponding wild-type cells was followed by immunoblotting. The LC3II/LC3I ratio was increased in both genotype following 16-48 h of leucine starvation (Figure 3A). Interestingly, lack of CHOP resulted in a significant augmentation of the LC3II/LC3I ratio inducibility by 16-48 h of leucine starvation. In the same time, gene expression analysis showed higher *Map1lc3b* mRNA induction level in CHOP^{-/-} MEFs than in wild-type cells from a 16 h of leucine starvation (Figure 3B). To confirm the role of CHOP in the control of amino acid-induced autophagy, we expressed mCherry-EGFP-LC3B in both genotypes. Colocalization of both GFP and mCherry fluorescence allowed to distinguish between autophagosomes (orange) and amphisomes or autolysosomes (red only) [24]. Figure 3C showed that the number of autophagosome increased in CHOP-deficient and wild-type cells confirming the increased autophagic flux resulting from 16-48 h of leucine starvation. Interestingly, this increase was greater in CHOP^{-/-} than in wild-type MEFs which is in agreement with the elevated MAP1LC3-B processing described above.

We have recently provided evidence that CHOP can directly upregulate the transcription of two classes of autophagy genes involved in the formation, elongation and function of the autophagosome in response to a short time (4-8 h) of leucine starvation [18]. The first class includes *p62*, *Nbr1* and *Atg7* where both ATF4 and CHOP were bound to an AARE in response to leucine starvation whereas the second class contained *Atg5*, *Atg10* and *Gabarap* where CHOP was recruited to a CHOP-RE without interacting with ATF4. Kinetic analysis revealed that in wild-type cells, the mRNA levels of all these autophagy genes increased after 4 h, decreased at 8 h and then increased again from 16 h of leucine starvation (Figure 4). ChIP assays clearly showed that both CHOP and ATF4 were bound to *p62*, *Nbr1* and *Atg7* promoters following 6 and 16-48 h of leucine starvation whereas only CHOP was bound to those of *Atg10*, *Gabarap* and *Atg5*. By contrast, the levels of all these mRNAs did not increase after 4-8 h in CHOP knockout MEFs as previously described [18] but increased from 16 h to a greater extent than in CHOP^{+/+} cells. Collectively these data show that CHOP appears to play an important role in limiting autophagy in response to long-time starvation.

In conclusion, the data reported in the present study yield several novel findings regarding the pivotal role of CHOP in the control of amino acid-induced autophagy and apoptosis according to the duration of the leucine starvation. (1) We show that during the first 6 h of starvation, the induction of the eIF2 α /ATF4/CHOP pathway is implicated in the upregulation of a number of autophagy genes while cell viability is not affected. (2) We demonstrate that in case of a long-

time amino acid starvation, CHOP appears to both limit autophagy and induce apoptosis through the transcriptional control of specific target genes. We propose that CHOP could have a dual role in the cell fate according to the duration of amino acid deficiency (Figure 5). At first, CHOP contributes to increase the capacity to maintain autophagy by regulating transcription of specific classes of autophagy genes and thus participates in cell survival. Thereafter, if the stress is prolonged, CHOP is involved in both apoptosis induction and autophagic process restriction. Studying the mechanisms involved in the “molecular switch” of the CHOP’s function will provide additional insight into these important processes. It is also noteworthy that transcription of a number of autophagy genes are markedly up-regulated during the apoptotic phase. We hypothesize that the induction of these autophagy genes could contribute to the induction of the apoptotic process as previously described [25, 26].

Taken together, these results demonstrate that following amino acid starvation there is a highly coordinated time-dependent program of molecular mechanisms involving the eIF2 α /ATF4/CHOP pathway leading first to autophagy and then to apoptosis if starvation is prolonged.

Acknowledgements

We are grateful to Drs D. Ron and H. Harding (Institute of Metabolic Science, Cambridge, UK) for the gift of CHOP- deficient MEFs. We thank G. Froment, D. Nègre and C. Costa from the lentivectors production facility / SFR BioSciences Gerland – Lyon Sud (UMS3444/US8).

Figure legends

Figure 1: *Role of the eIF2 α /ATF4/CHOP pathway in the control of cell survival following leucine starvation.*

(A) Immunoblot analysis of phosphorylation of eIF2 α and eIF2 α , ATF4, CHOP, β -actin protein contents from MEFs incubated for 6-48 h either in control (+leu) or leucine-free medium (-leu). (B) For kinetic analysis of CHOP mRNA expression, total RNA from CHOP^{+/+} MEFs incubated for 4-48h either in control (+leu) or leucine-free medium (-leu) was examined by RT-qPCR. ChIP analysis was performed from wild-type MEFs incubated 6 or 24 h either in control (+leu) or leucine-free medium (-leu) using antibodies specific for ATF4 and CHOP and primers to amplify

Chop AARE. Data were plotted as the percentage of antibody binding versus the amount of PCR product obtained using a standardized aliquot of input chromatin (% of Input). The graphs show means \pm S.E.M. of three independent experiments. *t* tests have been performed to compare the means. (*) indicates a *p* value of ≤ 0.05 relative to the +leu medium value. (C) Cell viability was measured by the XTT assay. The percentage of cell survival is normalized to the control (time 0) for each cell type. Means and SDs from triplicate samples are shown.

Figure 2: Role of CHOP in apoptosis following long-time leucine starvation.

(A) Immunoblot analysis of caspase 3 (uncleaved and cleaved forms) and β -actin content from CHOP +/+ and CHOP -/- MEFs incubated for 8-48 h either in control (+leu) or leucine-free medium (-leu). The blot shown is representative of three independent experiments. (B) CHOP+/+ and CHOP-/- MEFs incubated either in control (+leu) or leucine-free medium (-leu) for 6, 24 and 36 h were stained for 7-AAD and Annexin V and detected by flow cytometry analysis. (C) For kinetic analysis of CHOP-dependent apoptotic gene expression in response to leucine starvation, total RNA from CHOP+/+ and CHOP-/- MEFs incubated for 4-48h either in control (+leu) or leucine-free medium (-leu) was examined by RT-qPCR (see supplementary Table 1 for sequences). ChIP analysis was performed from wild-type MEFs incubated 6, 24, 36 and 48 h either in control (+leu) or leucine-free medium (-leu) using antibodies specific for ATF4 and CHOP and primers to amplify a part of the corresponding promoters (see supplementary Table 2 for sequences) containing ATF4 or CHOP binding sites. Data were plotted as the percentage of antibody binding versus the amount of PCR product obtained using a standardized aliquot of input chromatin (% of Input). The graphs show means \pm S.E.M. of three independent experiments. *t* tests have been performed to compare the means. (*) indicates a *p* value of ≤ 0.05 relative to the +leu medium value.

Figure 3: Induction of autophagy in CHOP+/+ and CHOP -/- MEF in response to long-time leucine starvation.

(A) Immunoblot analysis of LC3B processing and p62 protein content from MEFs incubated for 16-48 h either in control (+leu) or leucine-free medium (-leu). β -actin was used as a loading control. The LC3-II/LC3-I ratio was calculated based on densitometry analysis of both bands using Image J software. The graphs show means \pm S.E.M. of three independent experiments. *t* tests have been performed to compare the means. (*) indicates a *p* value of ≤ 0.05 relative to the +leu medium value and (#) indicates a *p* value of ≤ 0.05 relative to the -leu medium value in wild-

type cells. (B) For kinetic analysis of MAP1-LC3B mRNA expression, total RNA from CHOP^{+/+} and CHOP^{-/-} MEFs incubated for 4-48h either in control (+leu) or leucine-free medium (-leu) was examined by RT-qPCR (see supplementary Table 1 for sequences). (C) Stably transfected CHOP^{+/+} and CHOP^{-/-} MEFs with mCherry-GFP-LC3B were incubated for 16-48h either in control (+leu) or leucine-free medium and autophagosomes and autolysosomes were visualized by green and red fluorescence microscopy. Scale bars are 10 μ M.

Figure 4: *Upregulation of a number of autophagy genes in CHOP^{+/+} and CHOP^{-/-} MEF in response to leucine starvation.*

CHOP^{+/+} and CHOP^{-/-} MEFs were incubated for 4-48h either in control (+leu) or leucine-free medium. For kinetic analysis of CHOP-dependent autophagy gene expression in response to leucine starvation, total RNA from CHOP^{+/+} and CHOP^{-/-} MEFs incubated for 4-48h either in control (+leu) or leucine-free medium (-leu) was examined by RT-qPCR (see supplementary Table 1 for sequences). ChIP analysis was performed from wild-type MEFs incubated 6, 24, 36 and 48 h either in control (+leu) or leucine-free medium (-leu) using antibodies specific for ATF4 and CHOP and primers to amplify a part of the corresponding promoter (see supplementary Table 2 for sequences) containing ATF4 or CHOP binding sites. Data were plotted as the percentage of antibody binding versus the amount of PCR product obtained using a standardized aliquot of input chromatin (% of Input). The graphs show means \pm S.E.M. of three independent experiments. *t* tests have been performed to compare the means. (*) indicates a *p* value of ≤ 0.05 relative to the +leu medium value.

Figure 5: *A model for the dual role of CHOP in the control of amino acid-induced autophagy and apoptosis.*

References

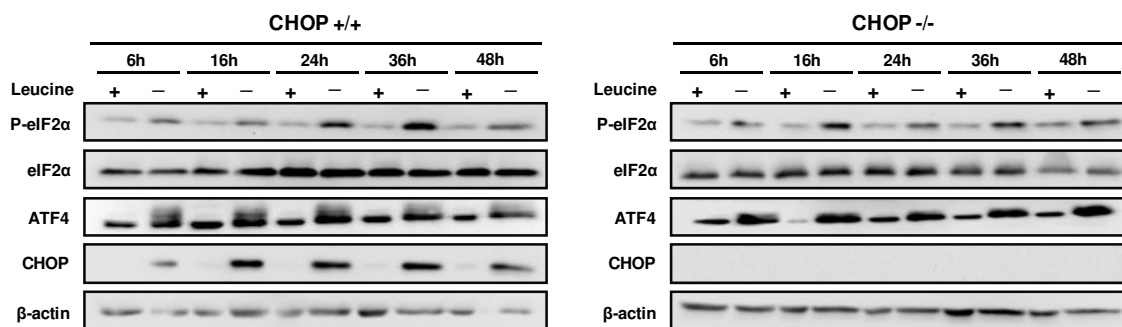
1. Sood, R., Porter, A. C., Olsen, D. A., Cavener, D. R. & Wek, R. C. (2000) A mammalian homologue of GCN2 protein kinase important for translational control by phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha, *Genetics*. 154, 787-801.
2. Vattem, K. M. & Wek, R. C. (2004) Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101, 11269-74.
3. Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D. F., Bell, J. C., Hettmann, T., Leiden, J. M. & Ron, D. (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress, *Mol Cell*. 11, 619-33.
4. Bruhat, A., Jousse, C., Carraro, V., Reimold, A. M., Ferrara, M. & Fafournoux, P. (2000) Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the CHOP promoter, *Molecular and cellular biology*. 20, 7192-204.
5. 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, *The Journal of biological chemistry*. 279, 5288-97.
6. Ron, D. & Habener, J. F. (1992) CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription, *Genes Dev*. 6, 439-53.
7. Bruhat, A., Jousse, C., Wang, X. Z., Ron, D., Ferrara, M. & Fafournoux, P. (1997) Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels, *The Journal of biological chemistry*. 272, 17588-93.
8. Ohoka, N., Yoshii, S., Hattori, T., Onozaki, K. & Hayashi, H. (2005) TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death, *Embo J*. 24, 1243-55.
9. Su, N. & Kilberg, M. S. (2008) C/EBP homology protein (CHOP) interacts with activating transcription factor 4 (ATF4) and negatively regulates the stress-dependent induction of the asparagine synthetase gene, *The Journal of biological chemistry*. 283, 35106-17.
10. Wang, X. Z., Kuroda, M., Sok, J., Batchvarova, N., Kimmel, R., Chung, P., Zinszner, H. & Ron, D. (1998) Identification of novel stress-induced genes downstream of chop, *Embo J*. 17, 3619-30.
11. Sok, J., Wang, X. Z., Batchvarova, N., Kuroda, M., Harding, H. & Ron, D. (1999) CHOP-Dependent stress-inducible expression of a novel form of carbonic anhydrase VI, *Molecular and cellular biology*. 19, 495-504.

12. Marciniak, S. J., Yun, C. Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H. P. & Ron, D. (2004) CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum, *Genes Dev.* 18, 3066-77.
13. Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R. T., Remotti, H., Stevens, J. L. & Ron, D. (1998) CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum, *Genes Dev.* 12, 982-95.
14. Ghosh, A. P., Klocke, B. J., Ballestas, M. E. & Roth, K. A. (2012) CHOP potentially co-operates with FOXO3a in neuronal cells to regulate PUMA and BIM expression in response to ER stress, *PLoS one.* 7, e39586.
15. Puthalakath, H., O'Reilly, L. A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P. N., Huntington, N. D., Hughes, P. D., Michalak, E. M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., Gotoh, T., Akira, S., Bouillet, P. & Strasser, A. (2007) ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim, *Cell.* 129, 1337-49.
16. McCullough, K. D., Martindale, J. L., Klotz, L. O., Aw, T. Y. & Holbrook, N. J. (2001) Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state, *Molecular and cellular biology.* 21, 1249-59.
17. Rouschop, K. M., van den Beucken, T., Dubois, L., Niessen, H., Bussink, J., Savelkoul, K., Keulers, T., Mujcic, H., Landuyt, W., Voncken, J. W., Lambin, P., van der Kogel, A. J., Koritzinsky, M. & Wouters, B. G. (2010) The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5, *J Clin Invest.* 120, 127-41.
18. B'chir, W., Maurin, A. C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Stepien, G., Fafournoux, P. & Bruhat, A. (2013) The eIF2alpha/ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression, *Nucleic acids research.*
19. Rutkowski, D. T., Arnold, S. M., Miller, C. N., Wu, J., Li, J., Gunnison, K. M., Mori, K., Sadighi Akha, A. A., Raden, D. & Kaufman, R. J. (2006) Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins, *PLoS biology.* 4, e374.
20. Tabas, I. & Ron, D. (2011) Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress, *Nature cell biology.* 13, 184-90.
21. Bouillet, P., Purton, J. F., Godfrey, D. I., Zhang, L. C., Coultas, L., Puthalakath, H., Pellegrini, M., Cory, S., Adams, J. M. & Strasser, A. (2002) BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes, *Nature.* 415, 922-6.
22. Reimertz, C., Kogel, D., Rami, A., Chittenden, T. & Prehn, J. H. (2003) Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway, *The Journal of cell biology.* 162, 587-97.
23. Mizushima, N., Yoshimori, T. & Levine, B. (2010) Methods in mammalian autophagy research, *Cell.* 140, 313-26.

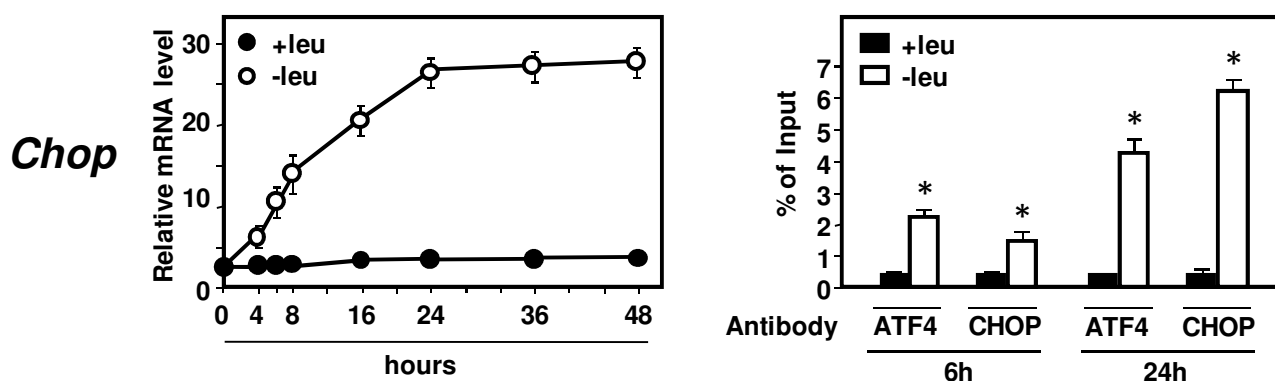
24. Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., Overvatn, A., Bjorkoy, G. & Johansen, T. (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy, *The Journal of biological chemistry*. 282, 24131-45.
25. Pyo, J. O., Jang, M. H., Kwon, Y. K., Lee, H. J., Jun, J. I., Woo, H. N., Cho, D. H., Choi, B., Lee, H., Kim, J. H., Mizushima, N., Oshumi, Y. & Jung, Y. K. (2005) Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death, *The Journal of biological chemistry*. 280, 20722-9.
26. Wirawan, E., Vanden Berghe, T., Lippens, S., Agostinis, P. & Vandenabeele, P. (2012) Autophagy: for better or for worse, *Cell research*. 22, 43-61.

Figure 1

A



B



C

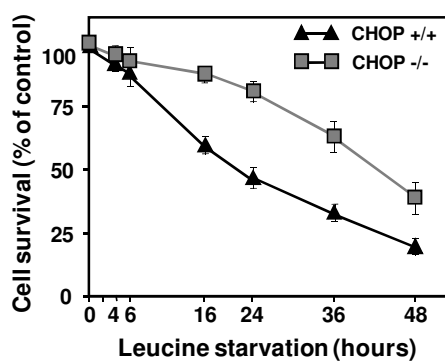
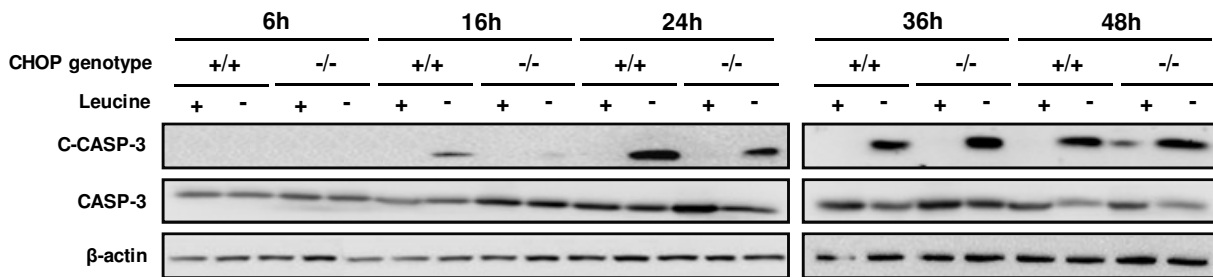
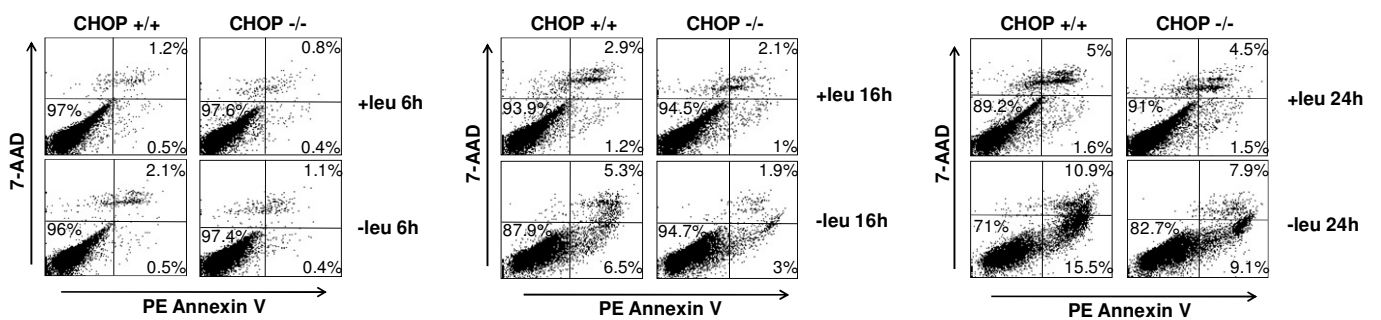


Figure 2

A



B



C

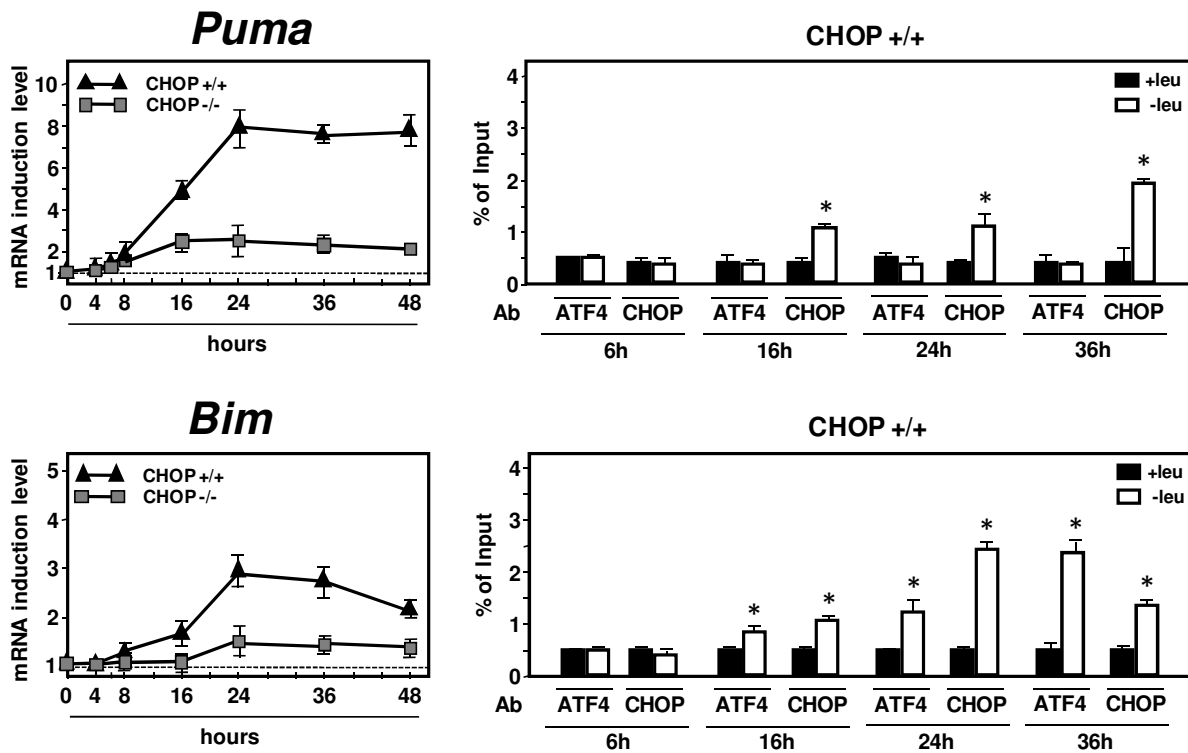


Figure 3

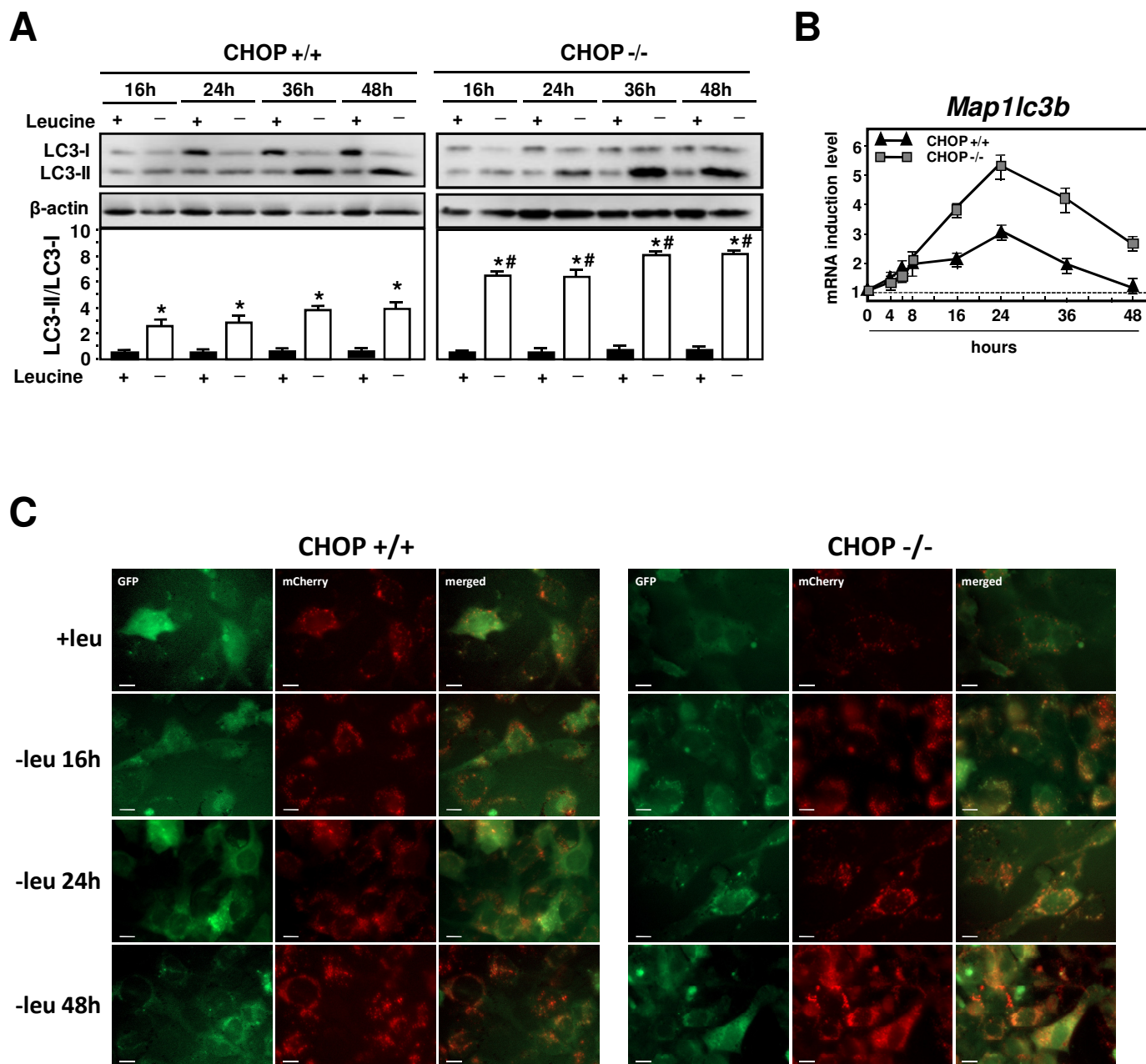


Figure 4

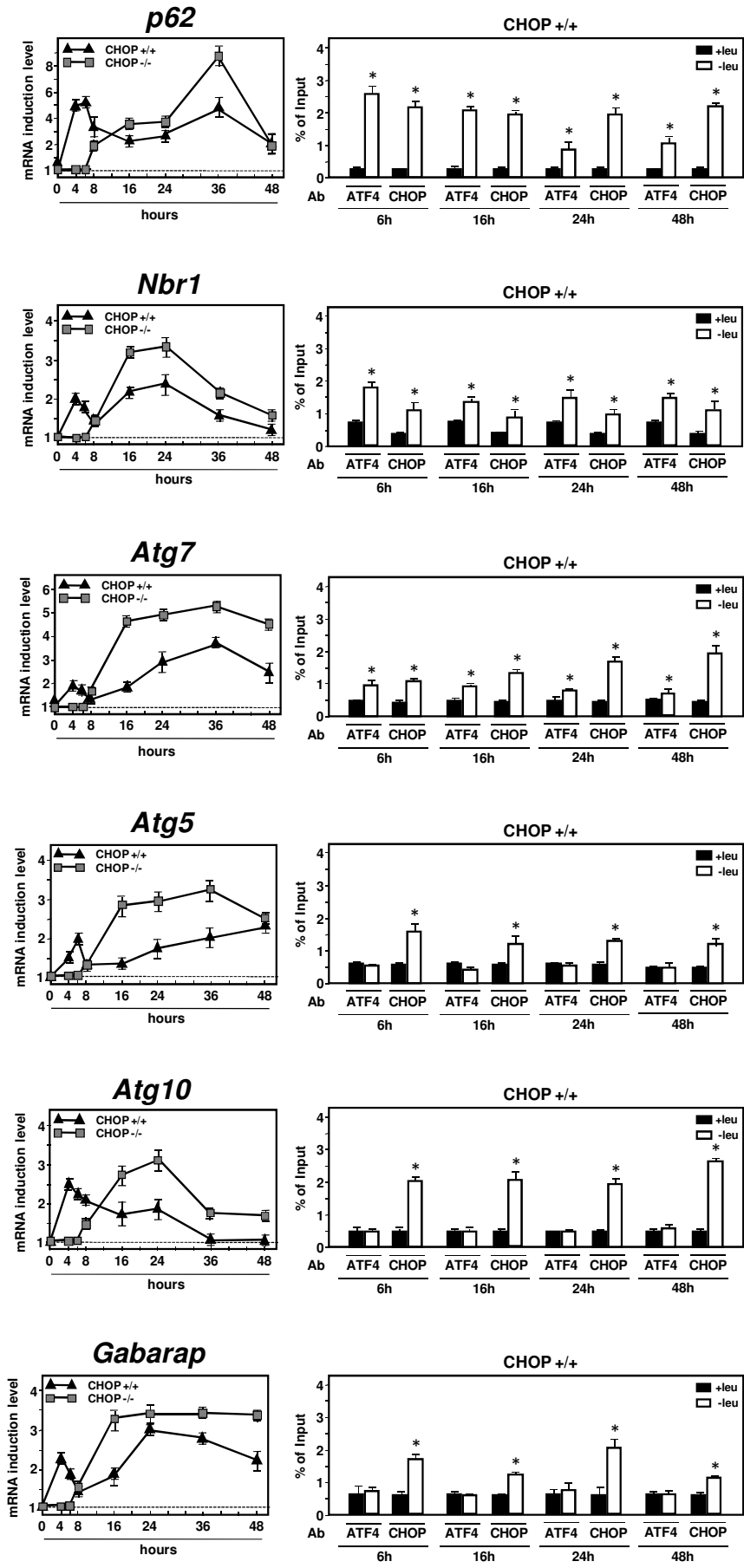
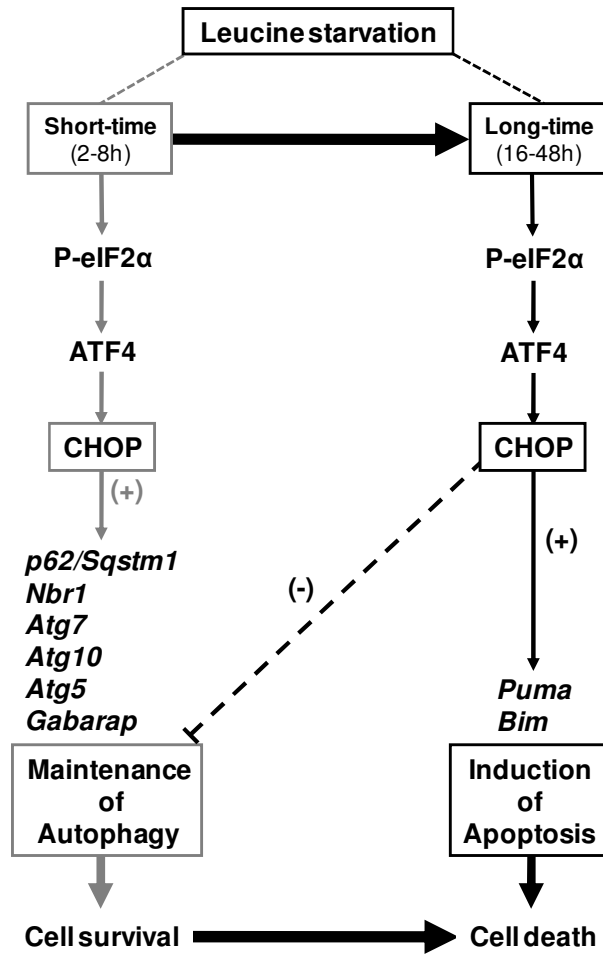


Figure 5



Supplementary table 1. qPCR primers

Gene	Forward	Reverse
<i>Chop</i>	5'-CCTAGCTTGGCTGACAGAGG-3'	5'-CTGCTCCTTCTCCTTCATGC-3'
<i>p62</i>	5'-TGGGCAAGGAGGAGGCGACC-3'	5'-CCTCATCGCGGTAGTGC GCC-3'
<i>Nbr1</i>	5'-TTCCAGGAAGACTACAATTC-3'	5'-ATGCAATTCTTCCTTCTTAG-3'
<i>Atg7</i>	5'-TAATAGTGCCCTGGACG-3'	5'-GCAGAGTCACCATTGTAGTA-3'
<i>Atg5</i>	5'-ATATCAGACCACGACGGAGC-3'	5'-TTGGCTCTATCCCGTGAATC-3'
<i>Atg10</i>	5'-CAAAACACAGTTTCGAATAA-3'	5'-TCATGTTTAATCACTTCTGC-3'
<i>Gabarap</i>	5'-GAGAAAATCCGAAAGAAATA-3'	5'-TGACCAACTGTAAGATCAGA-3'
<i>Map1lc3b</i>	5'-CGTCCTGGACAAGACCAAGT-3'	5'-ACCATGTACAGGAAGCCGTC-3'
<i>Puma</i>	5'-CGGAGACAAGAAGAGCAGCA-3'	5'-AGTTGGGCTCCATTTCTGGG-3'
<i>Bim</i>	5'-GCCAGGCCTTCAACCACTAT-3'	5'-CAGCTCCTGTGCAATCCGTA-3'

Supplementary table 2. qPCR primers used to detect promoter-enrichment in ChIP			
Gene	Forward	Reverse	Amplicon location
<i>Chop</i>	5'-GGGCAGACAAGTTCAGGAAG-3'	5'-ATGATGCAATGTTTGGCAAC-3'	-439 to -274
<i>p62</i>	5'-CCTGGTTTTGGCGTTTGTAT-3'	5'-GGGATACAGGTCATGAGGATTT-3'	-1306 to -1193
<i>Nbr1</i>	5'-GATAAATCCATTCTTCCAG-3'	5'-GGCAAGGTAAGCTACTGTAT-3'	-3065 to -2961
<i>Atg7</i>	5'-TGATCATCCTGGACTATAGAA-3'	5'-TGAACATAATGAAATGCTCT-3'	-969 to -865
<i>Atg5</i>	5'-GACAGAGCAAAGTGTCGTGG-3'	5'-TGAGACAAGCTCTCGTGCAA-3'	-1097 to -947
<i>Atg10</i>	5'-TAACTTCTAAGCCCCTTTTA-3'	5'-TGTAAGTCCATATTGTTTCG-3'	-863 to -714
<i>Gabarap</i>	5'-CTTTGGCTTCTATCAGATT-3'	5'-TAACTGGTGTTGGTGAAATA-3'	-1310 to -1178
<i>Puma</i>	5'-GTGTCTTATCTCACATGGCTGT-3'	5'-CTCACGGCACTTGACAGACT-3'	-1169 to -1038
<i>Bim</i>	5'-GTTCTTCCGACACAGCCAGA-3'	5'-GGGTTGGGCTATGTGCTCTT-3'	-1978 to -1807

4. Résultats

Tout d'abord, nous avons vérifié l'activation de la voie eIF2 α /ATF4 en présence ou en absence de CHOP en réponse à une cinétique de carence en leucine dans les deux génotypes cellulaires: (1) expression d'ATF4 et phosphorylation d'eIF2 α ; (2) induction de l'expression de CHOP, ainsi que (3) fixation de CHOP et/ou ATF4 au niveau de l'AARE précédemment décrit. Par la suite, l'étude la survie cellulaire par la technique du XTT a mis en évidence que l'inactivation de l'expression de CHOP (1) n'affecte pas la viabilité cellulaire lors d'une carence courte (4-6h), (2) augmente la survie cellulaire lors de longues carences en leucine (16h-48h).

Dans la deuxième partie de l'étude, nous avons mis en évidence le rôle clé joué par CHOP dans la mort cellulaire par apoptose en réponse à de longues carences en leucine et ceci en regardant le clivage de la caspase3 et le double marquage des cellules en Annexin-V et en 7-AAD. Les résultats obtenus montrent une apoptose plus importante en présence de CHOP. L'étude de l'induction des gènes cibles de CHOP et marqueurs de l'activité pro-apoptotique (*Puma et Bim*) a confirmé ce résultat.

Dans la troisième partie, afin de déterminer le rôle joué par CHOP dans la régulation du processus autophagique en réponse à de longues carences en leucine (16h-48h), nous avons étudié (1) la lipidation et l'induction de l'expression de LC3 en présence ou non de CHOP. Les résultats obtenus montrent que l'absence de CHOP favorise le maintien de l'autophagie en réponse. (2) Le marquage cellulaire par mCherry-EGFP-LC3B confirme ce résultat. (3) l'induction de l'expression des différents gènes impliqués dans l'autophagie et la fixation de CHOP et d'ATF4 sur leurs séquences promotrices (*p62, Nbr1, Atg7, Atg5, Atg10 et Gabarap*), décrits comme étant dépendant de CHOP. Les résultats obtenus montrent que d'une part, ces différents gènes restent induits en présence de CHOP en réponse à de longues carences en leucine avec un maintien de la fixation d'ATF4 et/ou de CHOP sur leurs séquences promotrices, d'autre part, l'absence de CHOP entraîne une augmentation de l'induction de la transcription de tous les gènes de l'autophagie étudiés.

5. Conclusion

Les résultats obtenus montrent que CHOP joue un rôle différent en fonction de la durée de la carence en un acide aminé indispensable. Pour des temps courts de carence (2-8h), (1) la viabilité cellulaire n'est pas affectée et (2) CHOP joue un rôle clé dans la régulation de la transcription des gènes de l'autophagie mais n'induit pas ceux impliqués dans le processus

apoptotique. Lors d'une carence longue (16-48h), le facteur CHOP est impliqué à la fois, dans le processus apoptotique en activant la transcription de gènes spécifiques et dans la répression du processus autophagique.

Le facteur de transcription CHOP joue donc un double rôle à la fois dans les processus autophagique et apoptotique en fonction de la durée de la carence en acides aminés. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans le changement de fonction de CHOP restent encore à élucider.



Discussion & perspectives

DISCUSSION & PERSPECTIVES

1. Introduction

Dans des conditions de stress cellulaire de courte durée, tel qu'une carence en acides aminés, la cellule met en place un des processus protéolytiques les plus importants, l'autophagie. Nos résultats obtenus dans des cellules en culture, mettent en évidence le rôle clé joué par la voie eIF2 α /ATF4 dans la régulation de la transcription d'un grand nombre de gènes impliqués dans le processus autophagique. Cette régulation requiert la fixation des facteurs de transcription ATF4 ou/et CHOP sur les séquences promotrices de type AARE ou CHOP-RE. De plus, la liaison simultanée de ces deux facteurs sur une même séquence AARE confère à la transcription des gènes une plus grande sensibilité de sa réponse à la carence en acides aminés.

Quand le stress cellulaire perdure dans le temps, la cellule met en place des processus de mort cellulaire, principalement le processus apoptotique. Les mécanismes mis en jeu impliquent le facteur de transcription CHOP qui favorise l'expression des gènes responsables de la mise en place du processus apoptotique, tout en limitant l'expression de ceux impliqués dans le processus autophagique.

L'ensemble des résultats présentés dans ce travail, montre l'importance de la voie eIF2 α /ATF4 à la fois, dans la régulation du processus autophagique afin de permettre à la cellule de survivre lors d'un stress de courte durée, mais aussi dans la régulation du processus apoptotique face à un stress de longue durée.

Dans ce chapitre, les résultats obtenus seront discutés et des expériences seront proposées afin de préciser les mécanismes moléculaires de régulation des gènes et des acteurs impliqués dans le processus autophagique via la voie eIF2 α /ATF4/CHOP. L'étude de ces mécanismes sera abordée successivement pour des temps courts puis longs de carence en acides aminés ainsi que la validation de ces résultats dans un modèle *in vivo*.

2. Implication de la voie eIF2 α /ATF4 dans la régulation de la transcription des gènes de l'autophagie lors d'une courte carence en acides aminés

❖ Les voies mTORC1 et eIF2 α /ATF4 ont-elles les mêmes cibles de facteurs de transcription impliqués dans la régulation des gènes de l'autophagie?

La variation de concentrations en acides aminés conduit à la modulation de plusieurs voies de signalisation. En particulier, lors d'une carence en acides aminés indispensables, la voie GCN2/eIF2 α /ATF4 est activée alors que la voie mTORC1 est inhibée par ce même signal. Il a été décrit que la kinase mTOR joue un rôle clé dans la régulation de certains facteurs de transcription impliqués dans la régulation du processus autophagique tel que le facteur TFEB. Comme décrit dans la partie de l'étude bibliographique, TFEB est, en conditions basales, retenu dans le cytoplasme sous sa forme inactive phosphorylée via principalement l'action des kinases ERK2 ou mTORC1. Suite au jeûne ou à une carence nutritionnelle, ces kinases sont inhibées ce qui permet à TFEB de transloquer dans le noyau activant ainsi l'expression de gènes impliqués dans la formation et l'élongation des autophagosomes (*WIPI*, *MAP1LC3*, *ATG9B*), de gènes codant pour les protéines « cargo » (*p62/SQSTM1*) et enfin de gènes jouant un rôle clé dans la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (*UVRAG*, *VPS11*, *VPS18*) (Settembre et al, 2011).

Il serait donc intéressant de déterminer si l'inhibition de la voie impliquant le complexe mTORC1 n'agirait pas en synergie avec l'activation de la voie eIF2 α /ATF4 dans la régulation des gènes de l'autophagie en réponse à une carence en un acide aminé indispensable. Pour y parvenir, pourront être étudiés dans des conditions de carence: (1) l'effet de l'inhibition de mTORC1 (rapamycine, siRNA dirigé contre raptor...) sur la régulation des gènes cibles de la voie eIF2 α /ATF4; (2) l'implication de la voie eIF2 α /ATF4 dans la régulation des facteurs de transcription cibles de mTORC1 tel que TFEB. Pour cela, pourront être réalisées des études (i) de la translocation du facteur TFEB dans des cellules GCN2 $^{-/-}$ et ATF4 $^{-/-}$ et (ii) de la fixation des facteurs ATF4 et CHOP sur la séquence promotrice de *TFEB* (ChIP).

❖ Identification des partenaires d'ATF4 sur l'AARE

Nous avons mis en évidence une classe de gènes de l'autophagie qui fixent ATF4 sur leur promoteur en absence de CHOP et de C/EBP β (*Atg16l1*, *Map1lc3b*, *Atg12*, *Atg3*, *Becn1*, et *Gabarapl2*). Etant donné qu'ATF4 ne se fixe que sous forme d'hétérodimère, il apparaît important d'identifier le(s) partenaire(s) protéique(s) qui pourrai(en)t interagir avec ATF4 et ainsi participer à la régulation de la transcription dépendante de l'AARE. Un certain nombre de

facteurs ont déjà été décrits dans le cas d'autres gènes régulés par ATF4 tels que les facteurs de transcription ATF2, ATF5, ATF7 ou ATF3 (Kilberg et al, 2009). La présence de ces partenaires protéiques pourra être, dans un premier temps, identifiée par immunoprécipitation de la chromatine (double CHIP) afin de vérifier la fixation de ce(s) facteur(s) sur la séquence AARE des gènes cibles. Dans un deuxième temps, l'activité fonctionnelle de ce(s) facteur(s) identifié(s) pourra être vérifiée par cotransfections transitoires des cellules avec des constructions luciférase (LUC) contenant le fragment génomique codant pour l'AARE et des vecteurs d'expression des facteurs étudiés. Dans un troisième temps, le rôle fonctionnel de ce(s) facteur(s) pourra être testé dans des cellules invalidées pour leurs expressions. L'acquisition de ces informations permettrait de mieux connaître les mécanismes gouvernant la régulation de la transcription des gènes de l'autophagie *via* la voie eIF2 α /ATF4.

❖ *Etude de la fonctionnalité des séquences AARE et CHOP-RE*

Nous avons pu identifier un AARE fonctionnel (3'-GTGTCATCA-5') dans la séquence promotrice de *p62* qui diffère d'une base avec la séquence consensus et sur lequel se fixent les facteurs de transcription ATF4 et CHOP. Ces deux facteurs sont indispensables et coopèrent pour activer la transcription. Par ailleurs, nous avons pu mettre en évidence des séquences AARE et CHOP-RE dans le promoteur des différents gènes impliqués dans l'autophagie à l'aide des séquences consensus précédemment décrites (Figure S3, 1^{er} Article). La fixation d'ATF4 et/ou de CHOP sur ces séquences AARE et CHOP-RE a été établie sur les produits d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) avec des anticorps dirigés contre ATF4 et/ou CHOP et amplifiés à l'aide d'amorces chevauchant ces séquences.

Cependant, le rôle fonctionnel de ces séquences identifiées reste à démontrer. Des expériences de transfections transitoires avec des vecteurs AARE- ou CHOP-RE-Luciférase pourront être réalisées dans des cellules en cultures carencées ou non en leucine. Une fois la fonctionnalité des séquences mise en évidence, une séquence consensus pourra être établie pour les AARE et les CHOP-RE des gènes de l'autophagie. Par la suite, ceci permettra de rechercher de nouveaux gènes de l'autophagie dont la transcription régulée par la voie eIF2 α /ATF4.

❖ *Recherche d'autres gènes de l'autophagie potentiellement régulés par la voie eIF2 α /ATF4*

Les gènes codant pour des protéines impliquées dans le processus autophagique sont nombreux. Pour la majorité des gènes testés, nous avons réussi à mettre en évidence l'importance de la voie eIF2 α /ATF4 dans la régulation de leur transcription en réponse au stress.

La régulation transcriptionnelle de ces gènes permettrait ainsi le maintien de l'autophagie *via* le renouvellement continu des protéines autophagiques consommées au cours de ce processus.

Néanmoins, il apparaît important de tester l'implication de la voie eIF2 α /ATF4 dans la régulation d'autres gènes de l'autophagie. En particulier, pourront être étudiés des gènes codant pour des protéines impliquées dans: (i) l'initiation de l'autophagie: *ULK1*, *ATG13*, *FIP200*, (ii) la formation du pré-autophagosome: *Vps34(PIK3C3)*, *Vps15*, *ATG14L*, *UVRAG*, *Ambra...* et (iii) l'élongation: *ATG4*, *WIPI1*... Ces gènes pourront être mis en évidence grâce à (1) la recherche des séquences consensus AARE ou CHOP-RE dans leurs promoteurs (2) la mesure de l'induction de leur ARNm par qPCR en réponse à la carence en acides aminés (3) le criblage à plus grande échelle par utilisation de puces à ARNs ciblées pour la fonction autophagique. Les gènes identifiés pourront par la suite être classés selon leur dépendance à ATF4 et/ou CHOP.

❖ ***Etude de la corrélation entre l'accumulation de l'ARNm et sa protéine pour les différents gènes impliqués dans le processus autophagique***

Les résultats que nous avons obtenus montrent que l'induction de l'ARNm de p62 par la voie eIF2 α /ATF4 en réponse à une carence en acides aminés, permet de maintenir un niveau stable de la protéine en dépit de sa dégradation par les autolysosomes. Il apparaît donc indispensable de vérifier s'il existe une corrélation entre l'accumulation des ARNm et leurs protéines pour les autres gènes impliqués dans le processus autophagique. Pour cela, le niveau protéique des autres acteurs autophagiques étudiés pourra être suivi par western blot dans des cellules sauvages, et dans des cellules invalidées pour l'expression de GCN2, ATF4 ou CHOP, carencées ou non en leucine.

3. Etude de la spécificité et de la fonctionnalité de p62 dans le processus autophagique

❖ ***Etude de la spécificité de p62 dans l'autophagie dans notre modèle d'étude***

p62 est une protéine décrite comme étant impliquée à la fois dans le processus autophagique et dans le complexe du protéasome-ubiquitine-dépendant (UPS). Dans les deux cas, p62 reconnaît les protéines ubiquitinylées destinées à la dégradation. Dans le processus dépendant du protéasome (UPS), p62 joue le rôle d'une E3-ligase en transférant les protéines ubiquitinylées sur les E4-ligases. Dans le cas de l'autophagie sélective, l'activité spécifique de p62 semble être contrôlée par son état de phosphorylation (médiée par la caséine kinase 2, CK2) sur la sérine 403 de son domaine d'interaction avec l'ubiquitine (UBA) (Matsumoto et al, 2011).

Etant donné le double rôle de p62, il serait donc important de déterminer si l'induction de l'expression de cette protéine observée lors d'une carence en acide aminé, participe uniquement au processus autophagique ou intervient aussi dans le complexe UPS. Pour répondre à cette question, des inhibiteurs spécifiques du complexe UPS qui n'interfèrent pas avec la voie eIF2 α /ATF4 tels que la lactacystine (Dick et al, 1997) ou l'epoxomycine (Meng et al, 1999) pourront être utilisés. D'autre part, la phosphorylation de p62 sur sa sérine 403 pourra être étudiée faite par double marquage GFP-p62/ S403-p au microscope confocal mais aussi par western blot grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre phospho-p62 (Matsumoto et al, 2011).

❖ *Etude du rôle fonctionnel de p62 dans l'autophagie lors d'une carence en acides aminés*

Le niveau protéique de p62 est maintenu lors d'une carence en acides aminés grâce à la régulation transcriptionnelle de son gène *via* la voie eIF2 α /ATF4. Il apparaît donc important de vérifier le rôle fonctionnel de p62 dans la viabilité cellulaire via son implication dans le processus autophagique selon la durée de la carence en un acide aminé indispensable. Pour cela, des cellules invalidées pour l'expression de p62 (p62^{-/-}) pourront être utilisées (Rodriguez et al, 2006). La régulation du processus autophagique lors de la carence en acides aminés pourrait être étudiée dans des p62^{-/-} *versus* p62^{+/+} grâce à (1) la quantification de la lipodation de LC3, (2) l'observation de la fluorescence de cellules exprimant la construction mCherry-EGFP-LC3B. (3) la mesure de l'accumulation des agrégats cellulaires et protéiques destinés à la dégradation grâce à la quantification du produit du western blot ou de la microscopie à fluorescence de l'ubiquitine marquée.

4. Réponse différentielle de l'expression des gènes en fonction de la sévérité de la carence en acides aminés

❖ *Cas des gènes de l'autophagie étudiés*

Le modèle de carence en un acide aminé indispensable présente un avantage considérable dans l'étude de l'effet d'un stress sur les processus adaptatifs de la cellule. En effet, contrairement à un stress du RE, aux dommages à l'ADN ou à l'hypoxie, la carence en un acide aminé indispensable constitue un stress ménagé pour la cellule. Afin de déterminer la sensibilité des différentes classes de gènes mises en évidence dans notre étude, nous avons étudié l'effet de concentrations croissantes en leucine sur l'induction de leur expression. Les résultats obtenus

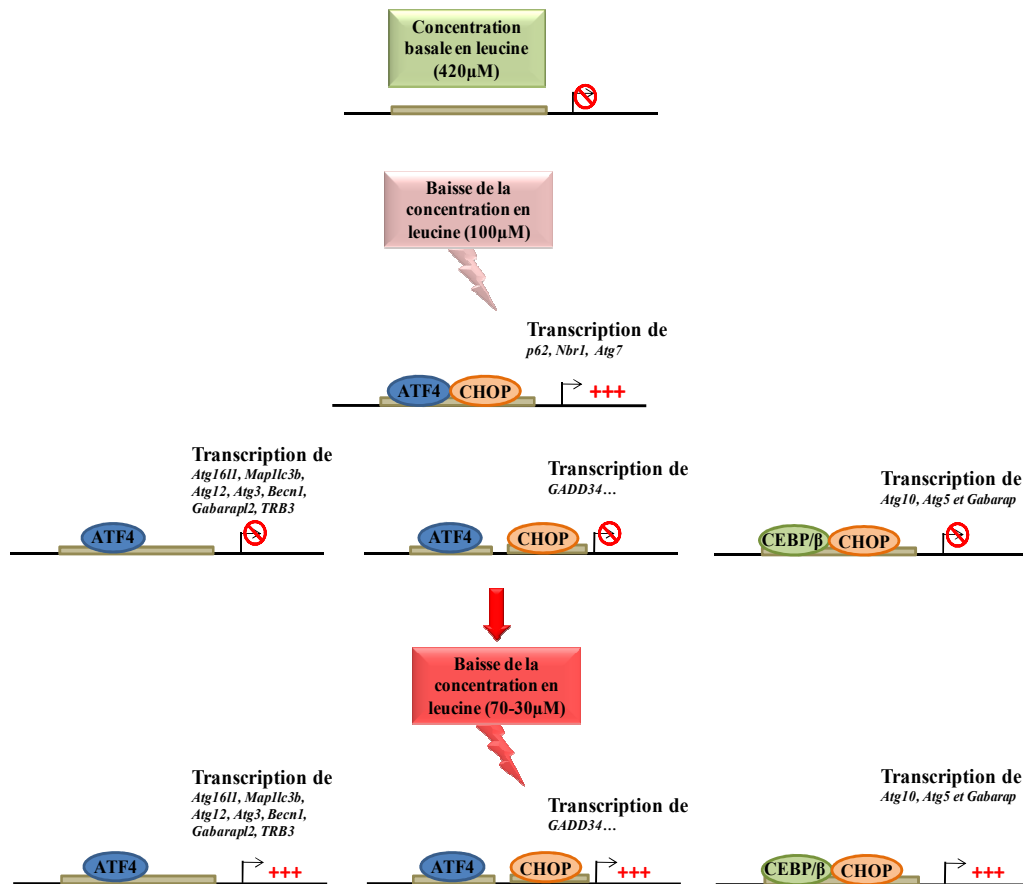


Figure 58: Réponse différentielle de l'expression des gènes en fonction de la sévérité de la carence en leucine. Les résultats que nous avons obtenus suggèrent que la fixation simultanée des deux facteurs de transcription ATF4 et CHOP sur la même séquence AARE promotrice confère au gène une plus grande sensibilité de sa réponse transcriptionnelle à la carence en acides aminés.

nous ont permis de corrélérer la sévérité de la carence en leucine au mécanisme de régulation. Nous avons notamment montré pour les gènes *p62*, *Atg7* et *Nbr1*, dont la transcription est régulée par la coopération des facteurs ATF4 et CHOP, que l'induction de leur expression est détectable dès 100µM de concentration en leucine. Par contre, pour les deux autres classes de gènes qui ne fixent qu'ATF4 (*Atg16l1*, *Map1lc3b*, *Atg12*, *Atg3*, *Becn1*, *Gabarapl2*) et ceux qui fixent CHOP et C/EBPβ (*Atg10*, *Atg5* et *Gabarap*) sur leurs séquences promotrices, leur expression est induite à des concentrations plus faibles (entre 70 et 30µM) (**Figure 58**). Il serait donc intéressant de vérifier si cette différence de sensibilité de réponse entre les différentes classes de gènes est observée pour d'autres acides aminés indispensables.

❖ *Cas d'autres gènes cibles de la voie eIF2α/ATF4*

Cette réponse différentielle en fonction de la sévérité de la carence ne se limite pas aux gènes de l'autophagie. En effet, la voie eIF2α/ATF4 est impliquée dans la régulation d'autres gènes cibles qui jouent des rôles cellulaires différents dans l'adaptation au stress (*GADD34*, *ASNS*, *TRB3* et *ATF3*). Leur régulation dépend de la fixation d'ATF4 et/ou de CHOP sur leurs séquences promotrices, sans la mise en place d'une coopération entre les deux facteurs (Siu et al, 2002 ; Su & Kilberg, 2008) (**Figure 59**). Les résultats obtenus confirment que lorsqu'ATF4 et CHOP ne se fixent pas sur la même séquence promotrice de type AARE, la sensibilité à la diminution de la concentration en acides aminés est moindre (entre 70 et 30µM) comparée à celle des gènes tels que *p62*, *Atg7* et *Nbr1* qui sont régulés grâce à la coopération entre les facteurs de transcription ATF4 et CHOP. Ce phénomène pourrait être du à l'accumulation précoce à la fois des protéines ATF4 et CHOP lors d'une carence en acides aminés. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent une corrélation entre la régulation de la transcription des gènes régulés via la fixation et la coopération d'ATF4 et de CHOP sur la séquence AARE et leur meilleure sensibilité au stress cellulaire.

❖ *Corrélation entre la sensibilité au stress et la fonction des ATG*

L'ensemble des résultats obtenus mettent en évidence que la classe des gènes *p62*, *Atg7* et *Nbr1* régulés à la fois par ATF4 et CHOP est la plus sensible au stress cellulaire. Ces protéines jouent un rôle fonctionnel important dès les premières étapes du processus autophagique ce qui pourrait expliquer la sensibilité de leur induction lors d'un stress. En effet, ATG7 est décrit comme une «Ubiquitin-activating enzyme E1-like protein» qui chaperonne la formation du complexe ATG5-ATG12-ATG16L et par conséquent joue un rôle indispensable dans les premières étapes de la formation de l'autophagosome. p62 et NBR1, quant à elles, sont des protéines « cargo » qui sont rapidement utilisés et dégradés par l'autolysosome.

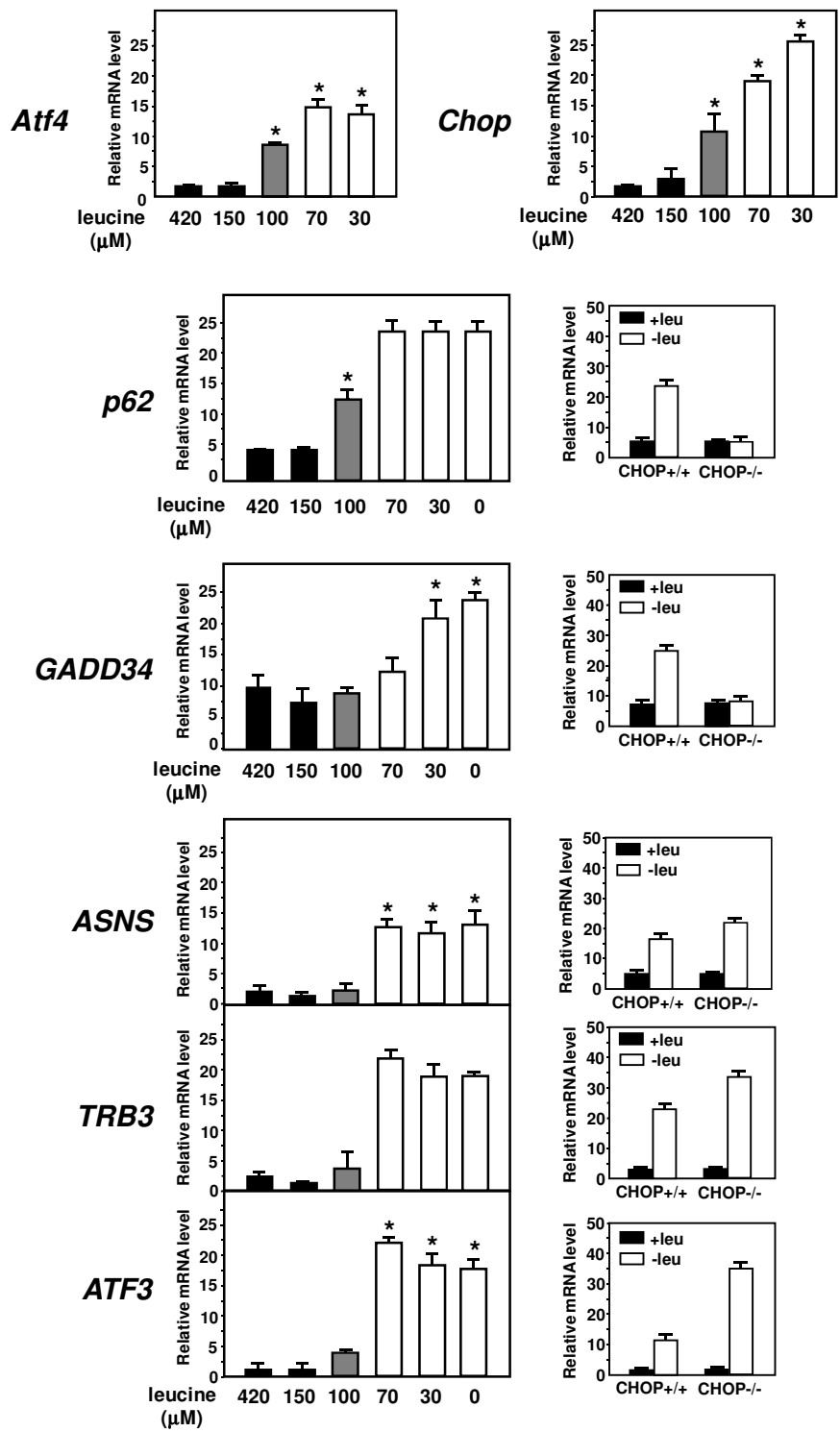


Figure 59: Effet de la concentration en leucine sur l'activation de la transcription de gènes dépendants d'ATF4, de CHOP ou des deux. Induction de l'expression de différents gènes cible de la voie eIF2 α /ATF4 en réponse à différentes concentrations en leucine et étude de leur dépendance à CHOP. Les barres d'erreur indiquent les écarts types de 3 expérimentations indépendantes (test de Student). (*) indique une valeur $P \leq 0.05$ relative à la valeur du milieu contrôle (420 μM).

Par conséquent, il serait intéressant de vérifier le rôle précoce de ces protéines dans l'autophagie pour des différentes concentrations en acides aminés et à différents temps de carence. Dans des modèles cellulaires invalidés pour l'expression de certains gènes (ATG7^{-/-}, p62^{-/-}, NBR1^{-/-}), pourrait être étudiés: (1) la variation de la lipidation de LC3 par Western Blot et la quantité protéique d'autres marqueurs de l'autophagie tels que p62; (2) l'impact sur la formation des autolysosomes grâce au double marquage mCherry-EGFP-LC3B.

L'ensemble des données obtenues sur la chronologie de l'induction des gènes de l'autophagie en fonction de leur sensibilité aux stress permettrait de fournir des informations importantes pour les études *in vivo* ultérieures.

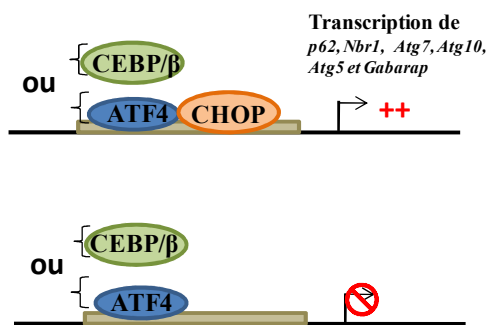
5. Régulation de la transcription des gènes de l'autophagie lors de longues carence en acides aminés

Lors de courtes périodes de stress (2-8h), CHOP est impliqué dans le processus autophagique et la survie cellulaire via son rôle clé dans la régulation transcriptionnelle de certains gènes de l'autophagie. Cependant, quand le stress perdure dans le temps (16h-48h), la mort cellulaire programmée se met en place et le rôle de CHOP dans l'induction du processus apoptotique prédominerait sur son rôle pro-autophagique. Pour ces temps longs de carence, une induction de l'expression des gènes pro-apoptotiques et une inhibition dépendante de CHOP des gènes autophagiques sont observées. En effet, même si les gènes impliqués dans le processus autophagique demeurent induits, leur expression est plus forte en absence de ce facteur.

❖ Implication d'un autre facteur de transcription dans la régulation de l'expression des gènes de l'autophagie lors des longues carences en acides aminés?

Lorsque la carence en acides aminés se prolonge (16h-48h), l'expression des gènes *p62*, *Nbr1*, et *Atg7*, *Atg10*, *Atg5* et *Gabarap* est inhibée par CHOP (induction est plus importante dans les cellules CHOP^{-/-} que dans les cellules sauvages). L'étude de l'interaction de CHOP avec la séquence promotrice de ces gènes pour ces temps longs de carence, montre un maintien de sa fixation au niveau des AARE ou des CHOP-RE de ces gènes. L'hypothèse que nous privilégions est qu'un autre facteur de transcription « X » activateur serait recruté au niveau du promoteur de ces différents gènes. Ce facteur « X » serait capable de se fixer (i) directement sur les mêmes séquences promotrices que CHOP ou (ii) indirectement via sa fixation sur la protéine CHOP

 2-8 heures de carence en acides aminés



 16-48 heures de carence en acides aminés

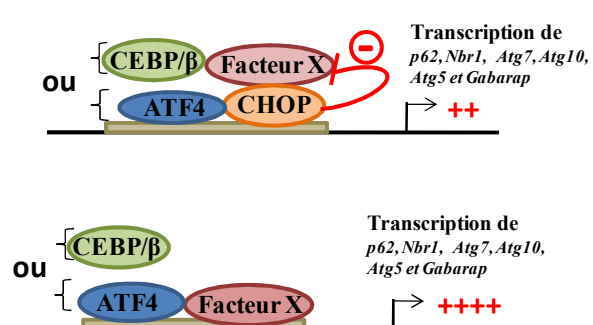


Figure 60: Modèle hypothétique de régulation de la transcription des gènes impliqués dans l'autophagie (*p62, Nbr1, Atg7, Atg10, Atg5 et Gabarap*) selon la durée de la carence en leucine. Pour des temps courts de carence en acides aminés (2h-8h), la régulation de la transcription des gènes *p62, Nbr1, Atg7, Atg10, Atg5 et Gabarap* est dépendante de *CHOP*. Cependant, lorsque cette carence se prolonge (16h-48h), la régulation de leur transcription n'est plus sous la dépendance du facteur *CHOP* mais pourrait mettre en jeu un facteur *X* capable de se fixer sur la même séquence promotrice.

(**Figure 60**). D'autre part, l'activité transcriptionnelle de ce facteur serait inhibée en présence de CHOP.

❖ ***TFEB, un bon candidat pour la régulation de la transcription de ces gènes lors de longues carences en acides aminés***

Le facteur de transcription TFEB a été décrit comme étant un facteur de transcription jouant un rôle clé dans la régulation de gènes lysosomaux et de certains gènes impliqués dans le processus autophagique (*WIPI, MAP1LC3, ATG9B, p62, UVRAG, VPS11, VPS18*) en réponse à un stress cellulaire (Settembre et al, 2011). De plus, ce facteur de transcription a été décrit comme (1) étant activé par déphosphorylation lui permettant ainsi d'être transloqué dans le noyau des cellules lors d'une carence en acides aminés et ceci même lors de stress prolongé, (2) étant capable de se fixer sur son promoteur et ainsi d'activer sa propre transcription (Settembre et al, 2013). Toutes ces données font que TFEB pourrait être le facteur « X » et jouer un rôle clé dans la régulation de la transcription des gènes de l'autophagie lors des longues carences en acides aminés.

Des résultats préliminaires d'immuno-précipitations de la chromatine avec un anticorps dirigé contre TFEB montrent que ce facteur se fixe d'une part, sur sa propre séquence promotrice et d'autre part, sur les séquences promotrices de gènes impliqués dans les processus autophagique (*p62, ATG10, Gabarap, Nbr1 et ATG7*) et apoptotique (*PUMA, Bcl2 et Bim*) lors d'une carence en leucine de 24, 36 ou 48h (**Figure 61**). Afin de confirmer ces résultats préliminaires, il serait important par la suite de regarder lors d'une longue cinétique de carence en leucine (1) la translocation de TFEB dans les noyaux des cellules en utilisant un anticorps dirigés contre TFEB ; (2) l'induction de l'expression de ces gènes dans les cellules invalidées pour TFEB (TFEB^{-/-}) ; (3) l'interaction de TFEB avec CHOP au niveau des séquences promotrices des gènes étudiés (double ChIP). Les résultats obtenus devraient nous permettre de mieux comprendre le rôle de TFEB dans la régulation des gènes impliqués dans le processus autophagique lors d'une carence en acides aminés et son interaction possible avec la voie eIF2 α /ATF4.

❖ ***Implication des gènes de l'autophagie dans la mise en place de l'apoptose***

Nos résultats montrent qu'en réponse à de longues carences en leucine (16h-48h), l'expression des gènes *p62, Nbr1, et Atg7, Atg10, Atg5 et Gabarap* est maintenue alors que celle des gènes impliqués dans le processus apoptotique est induite. Il a été décrit qu'en réponse à un stress cellulaire prolongé ou très important, certaines protéines impliquées dans le processus autophagique peuvent devenir pro-apoptotiques suite à leurs interactions avec les protéines

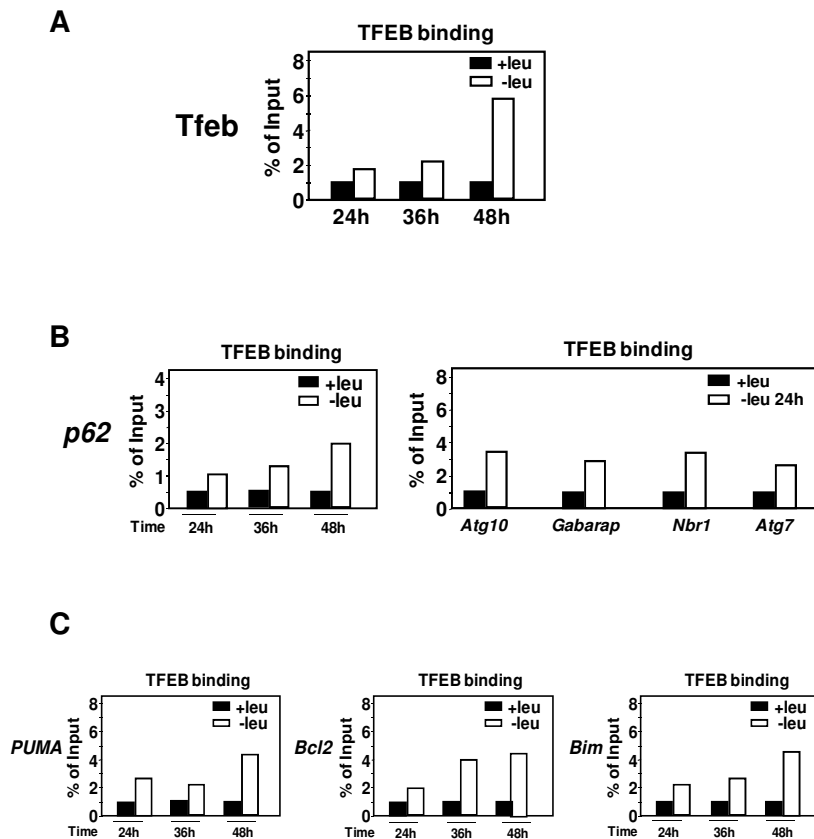


Figure 61: Fixation du facteur de transcription TFEB sur les séquences promotrices de gènes impliqués dans les processus autophagique et apoptotique. Immuno-précipitation de la chromatine issue de MEFs CHOP+/+ carencées ou non en leucine pendant 24, 36 ou 48h avec un anticorps dirigé contre TFEB. La séquence promotrice des gènes cibles fixant TFEB est amplifiée par qPCR grâce à des primers spécifiques. Le résultat est donné en pourcentage de séquences fixant TFEB par rapport au produit total de PCR et standardisé par rapport aux IC (Input Chromatine, chromatine non précipitée).

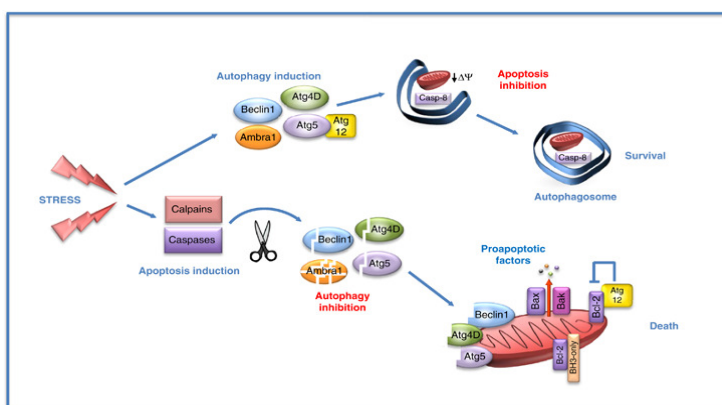


Figure 62: Interaction entre l'autophagie et l'apoptose en réponse à un stress cellulaire. La destinée de la cellule lors d'un stress dépend de la régulation et de l'interaction entre les deux processus autophagique et apoptotique. L'autophagie inhibe l'apoptose en inhibant l'action des caspases 8 et en endommageant ou dépolarisant les mitochondries afin d'inhiber le relargage du cytochrome C. L'apoptose inhibe le processus autophagique en dégradant les protéines Ambra1, Beclin-1, ATG3 et ATG5 par les caspases et les calpains. Par la suite, le produit de leurs dégradations migre au niveau de la membrane de la mitochondrie où va se produire une action pro-apoptotique (D'après Fimia GM. *et al.* 2013).

impliqués dans la mort cellulaire par apoptose. C'est notamment le cas pour ATG5, ATG7 (Walls et al, 2010), Beclin-1 (Yu et al, 2004), Ambra1 (activating molecule in beclin 1-regulated autophagy 1) (Fimia et al, 2013) mais aussi p62 (Jin et al, 2009) (**Figure 62**). Il serait donc intéressant d'étudier le rôle de ces protéines dans le processus apoptotique lors d'une carence prolongée en acides aminés. Pour cela, la viabilité des cellules et la mort cellulaire pourront être mesurées dans des cellules invalidées pour l'expression de ces différents gènes de l'autophagie en utilisant un test de réduction du XTT (pour l'étude de la viabilité cellulaire) et l'analyse du double marquage Annexin-V/7-AAD par FACS (pour la mort cellulaire).

❖ *Implication de CHOP dans la régulation de la transcription des gènes de l'apoptose*

Le facteur de transcription CHOP joue un rôle clé dans la régulation des gènes impliqués dans le processus apoptotique comme *Puma et Bim* (Altman et al, 2009; Ryder et al, 2013). Les résultats que nous avons obtenus dans des cellules carencées en leucine montrent une induction de l'expression de *Puma et Bim* dépendante de CHOP entre 16h et 48h de carence. Ceci est confirmé par les résultats de l'immunoprécipitation de la chromatine qui montrent que CHOP se fixe sur la séquence promotrice de ces gènes qu'à partir de 16h de carence (Figure 2, Article 2). Cependant, les résultats obtenus par western blot indiquent que la protéine CHOP est bien présente dans la cellule dès 6h de carence et quelle se fixe sur la séquences promotrices des gènes de l'autophagie (Figure 1 et 4, Article 2). Dans la littérature, il a été mis en évidence que la phosphorylation de la protéine CHOP par la MAP Kinase p38 améliorerait sa capacité à réguler la transcription des acteurs impliqués dans le processus apoptotique (Maytin et al, 2001). Cette augmentation de l'activité transcriptionnelle de CHOP pourrait aussi être due à sa coopération avec d'autres facteurs qui restent à identifier. Au vu de ces données, l'étude de l'état de phosphorylation de CHOP selon la durée de la carence ainsi que son interaction avec ses potentiels partenaires semblent une bonne piste afin de comprendre le mécanisme du recrutement tardif du facteur CHOP au niveau des promoteurs des gènes de l'apoptose lors d'une carence en acides aminés.

6. Etude du processus autophagique *in vivo*

❖ *Implication de la voie eIF2 α /ATF4 dans la régulation des gènes de l'autophagie *in vivo**

Dans le but de vérifier *in vivo* l'implication de la voie eIF2 α /ATF4 dans le processus autophagique mise en évidence *in vitro*, nous avons effectué quelques expériences préliminaires

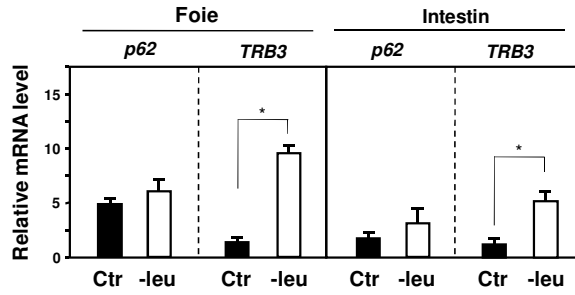


Figure 63: Induction de l'expression des ARNm de *p62* et *TRB3* au niveau du foie et de l'intestin de souris *GCN2*^{+/+} nourries avec un régime contrôle (Ctr) ou carencé en leucine (-Leu) pendant 4h. Les barres d'erreur indiquent les écarts types de 3 expérimentations indépendantes (test de Student). (*) indique une valeur $P \leq 0.05$ relative à la valeur du milieu contrôle (420 μ M).

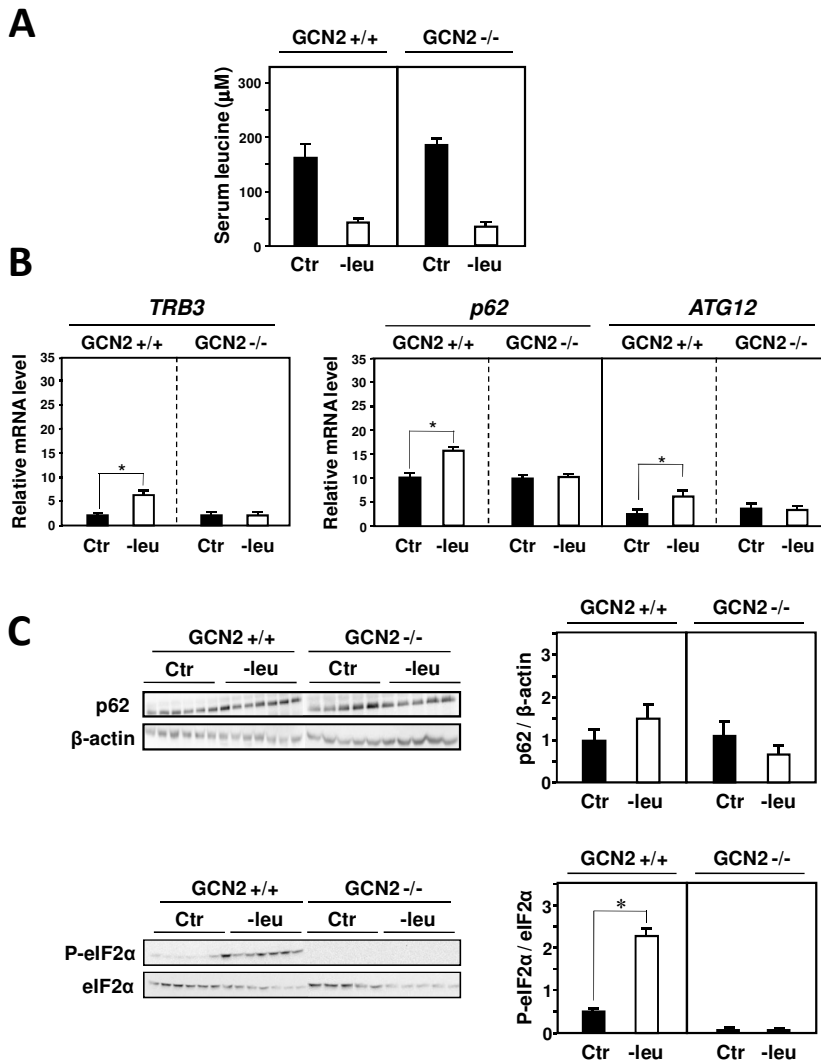


Figure 64: Rôle de GCN2 dans la régulation de l'expression de *p62* au niveau du foie de souris nourries avec un régime contrôle (Ctr) ou carencé en leucine (-Leu) pendant 10 jours. (A) Mesure de la Concentration en leucine au niveau du sérum des souris. (B) Rôle de GCN2 dans la régulation d'expression des ARNm de *p62* et de *ATG12* au niveau de foie de souris *GCN2*^{+/+} et *-/-* nourries avec un régime contrôle (Ctr) ou carencé en leucine (-Leu) pendant 10 jours. *TRB3* est un gène marqueur de l'activation de la voie. (C) Niveau protéique de *p62* et P-eIF2 α dans le foie des souris *GCN2*^{+/+} et *-/-* nourries avec un régime Ctr ou -Leu pendant 10 jours. Les barres d'erreur indiquent les écarts types de 3 expérimentations indépendantes (test de Student). (*) indique une valeur $P \leq 0.05$ relative à la valeur du milieu contrôle (420 μ M).

dans le foie et l'intestin de souris GCN2^{+/+} et GCN2^{-/-} nourries avec un régime contrôle ou carencé en leucine.

Résultats préliminaires

Dans un premier temps, nous avons mesuré l'induction de l'expression de l'ARNm de *TRB3* (gène marqueur de l'activation de la voie GCN2/eIF2 α) et de *p62* au niveau du foie et de l'intestin de souris GCN2^{+/+} nourries avec un régime contrôle ou carencé en leucine pendant 4h (**Figure 63**). Les résultats obtenus montrent une induction de l'expression de l'ARNm de *TRB3* en réponse à la consommation du régime carencé. En revanche, l'ARNm de *p62* n'est pas induit que ce soit au niveau hépatique ou au niveau intestinal. Le même résultat a été observé pour 9h de carence (résultats non montrés).

Etant donné ces résultats, nous avons choisi de refaire ces mêmes expériences lors de la consommation d'un régime carencé en leucine pendant une plus longue période (10 jours). Les résultats obtenus montrent une induction significative de l'expression des ARNm de *p62*, *ATG12* et *TRB3* dans le foie de souris GCN2^{+/+} nourries avec un régime carencé en leucine durant 10 jours. Par contre, cette induction n'est pas observée en absence de GCN2 (souris GCN2^{-/-}) (**Figure 64**). Les résultats de Western Blot avec des anticorps dirigés contre p62 sur des extraits de foies de souris GCN2^{+/+} et GCN2^{-/-}, nourries avec un régime contrôle ou carencé en leucine pendant 10 jours, ne montrent pas de variation significative du niveau protéique de p62 suite à cette carence (**Figure 64**). Néanmoins, une tendance à l'augmentation du niveau protéique de p62 en présence de GCN2 est observée suite à la carence, alors qu'une diminution de sa quantité est constatée en absence de GCN2.

Interprétation des résultats et perspectives

Contrairement à ce que nous avons observé dans des cellules en cultures, la consommation d'un régime carencé en leucine n'entraîne pas à court terme l'induction de l'expression de *p62* au niveau hépatique. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que (1) le foie, qui représente un organe métabolique très important, mettrait en place des mécanismes d'adaptation et de régulation très rapides pour faire face aux divers stress, (2) les différents organes agissent en synergie afin de permettre le maintien de l'homéostasie de l'organisme. Lors de la consommation d'un régime carencé en leucine sur une longue durée, les résultats obtenus *in vivo* au niveau hépatique montrent une augmentation relativement faible mais significative de l'ARNm de p62 et d'ATG12. Etant donné que le foie est un carrefour métabolique très régulé en interconnexion avec de nombreux organes (**Figure 65**), il apparaît important, de regarder induction de

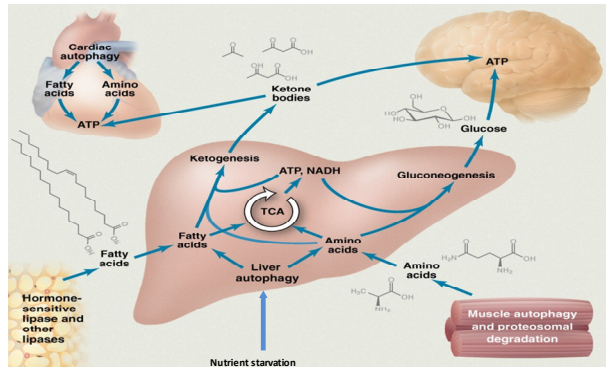


Figure 65: Le foie, un carrefour métabolique bien régulé. Le foie interagit avec plusieurs organes afin de maintenir l'homéostasie cellulaire. En cas de carence nutritionnelle, il y a mise en place du processus autophagique afin de libérer les acides aminés et les acides gras et fournir l'énergie nécessaire pour le fonctionnement du cerveau et du cœur (d'après Rabinowitz J.D. and White E. 2010).

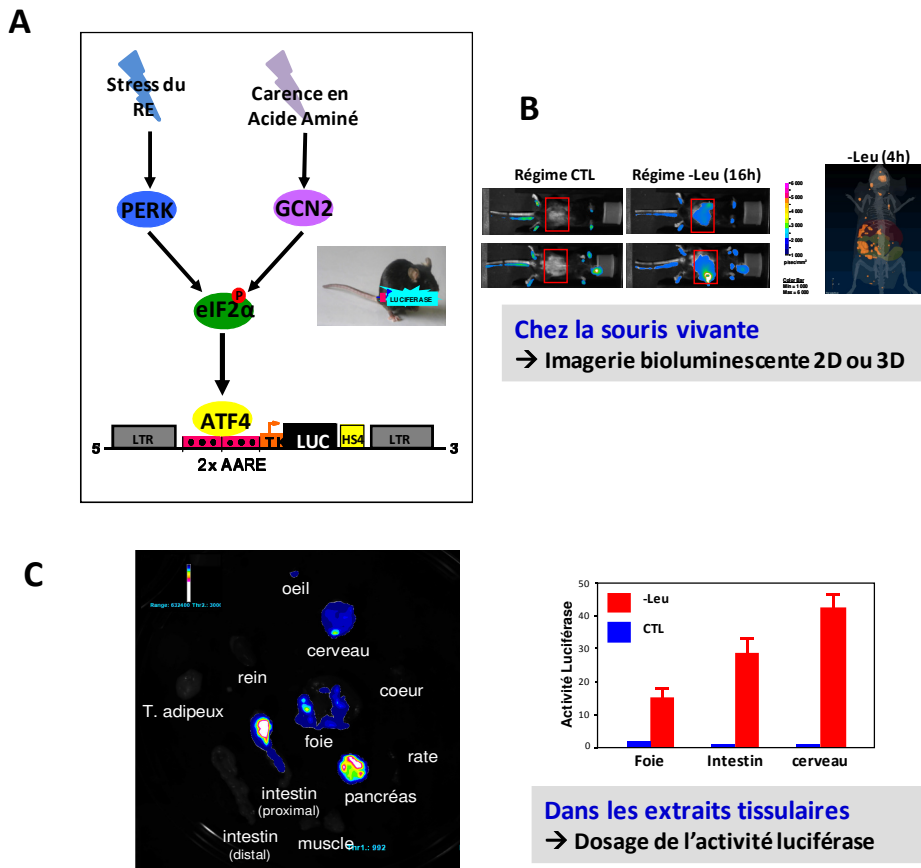


Figure 66: Modèle d'étude de l'activation de la voie eIF2α/ATF4 *in vivo*: La lignée de souris transgénique AARE-Luciférase. (A) Modèle de souris transgéniques comprenant un transgène comprenant un vecteur avec la luciférase comme gène l'intérêt, deux copies de la séquence CARE du gène TRIB3 (séquences AARE) et le promoteur minimum de la thymidine kinase (souris AARE-LUC). (B) Mise en évidence de l'activation de la voie eIF2α/ATF4 *in vivo* et des organes cibles de la carence en acides en aminés par imagerie en bioluminescence. (C) Mise en évidence des tissus cibles de la carence en leucine par bioluminescence et dosage de l'activité Luciférase dans le foie, l'intestin et le cerveau des souris AARE-LUC qui ont été mises à jeun pendant 16h puis nourries pendant 4h ou 16h, soit avec le régime contrôle (CTL) ou soit avec un régime carencé en leucine (-leu).

l'expression des gènes impliqués dans le processus autophagique au niveau d'autres organes (1) qui ont un renouvellement rapide de leurs protéines, et (2) dans lesquels la voie eIF2 α /ATF4 est activée lors de la consommation d'un régime carencé en leucine

Pour identifier les tissus cibles de la carence en acides aminés, nous avons développé au laboratoire un modèle de souris transgénique exprimant le gène rapporteur luciférase (LUC) sous le contrôle des éléments AARE du gène TRB3 (souris AARE-LUC) (**Figure 66**). Le niveau d'expression du gène LUC peut être ainsi étudié au niveau de chaque tissu et même au niveau de chaque cellule. La comparaison des niveaux d'expression du gène luciférase obtenu entre des régimes contrôle et carencés en acides aminés peut être d'abord réalisée dans les différents tissus de l'animal vivant par imagerie en bioluminescence. Ensuite, après sacrifice de l'animal, l'activité luciférase peut être étudiée dans les différents tissus identifiés par immuno-histochimie et par dosage dans les extraits tissulaires. Ainsi, ce modèle de souris AARE-LUC nous permettra de cibler les tissus dans lesquels la voie eIF2 α /ATF4 est activée par la carence en acides aminés et par la suite d'étudier les mécanismes de régulation du processus autophagique.

❖ *Rôle de CHOP dans la régulation des gènes de l'autophagie in vivo*

Le facteur de transcription CHOP a été décrit comme jouant un rôle clé dans la régulation du processus apoptotique (Zinszner et al, 1998). La plus part des travaux décrivant le rôle de CHOP dans la mise en place de la mort cellulaire par apoptose ont utilisé comme modèle d'étude le stress du RE. Cependant, le rôle exact de CHOP dans le processus autophagique *in vivo* reste encore à démontrer. En utilisant des souris CHOP^{-/-} versus CHOP^{+/+} nourries avec un régime carencé en un acide aminé indispensable, le rôle de CHOP dans le processus autophagique pourra être étudié dans les tissus précédemment identifiés avec les souris AARE-LUC.

L'implication de ce facteur dans la régulation du processus autophagique et la survie cellulaire pourront être mis en évidence en étudiant la régulation de l'expression et de la fonctionnalité des gènes de l'autophagie (qPCR pour déterminer la régulation transcriptionnelle des gènes de l'autophagie, western blot pour étudier la lipidation de LC3 et la variation de la quantité des différentes protéines). Ainsi, les résultats obtenus nous permettront de valider chez la souris les résultats obtenus *in vitro* et de déterminer le rôle de CHOP dans le processus autophagique lors de la consommation d'un régime carencé en acides aminés.



Conclusion générale

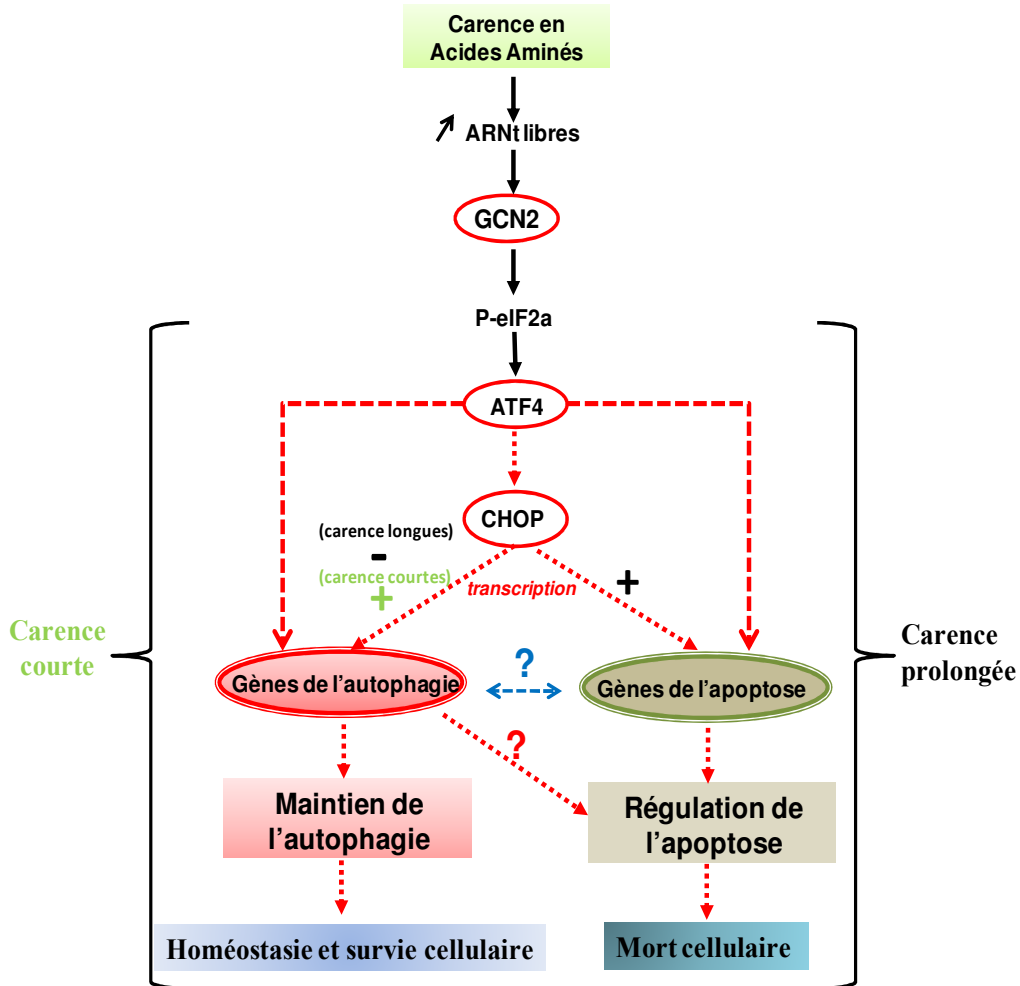


Figure 67: Rôle de la voie de signalisation eIF2 α /ATF4 dans la régulation de l'expression des gènes de l'autophagie et de l'apoptose lors d'une carence en acides aminés chez les mammifères.

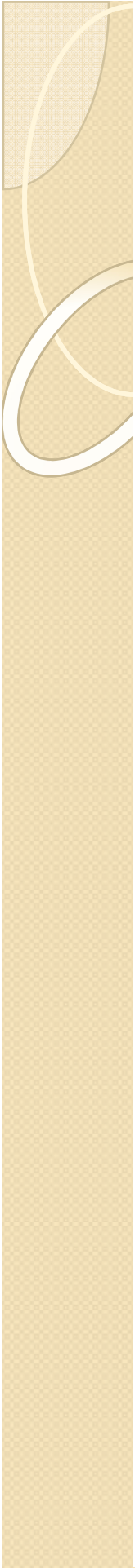
CONCLUSION GENERALE

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont permis de mettre en évidence le rôle clé de la voie eIF2 α /ATF4 dans la régulation de la transcription d'un grand nombre de gènes impliqués dans le processus autophagique en réponse à une carence en acides aminés. Trois classes de gènes de l'autophagie ont pu ainsi être identifiées selon leur dépendance à ATF4 et CHOP et la liaison de ces facteurs sur les éléments spécifiques de leurs promoteurs en fonction de l'intensité du stress. Plus généralement, nous avons démontré que ce mécanisme de régulation transcriptionnel des gènes de l'autophagie pouvait également être activé lors d'un stress tel que le stress du réticulum endoplasmique.

Par ailleurs, les résultats obtenus ont aussi permis de mettre en évidence le rôle clé de la voie eIF2 α /ATF4/CHOP dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans l'autophagie et l'apoptose selon la durée de la carence en un acide aminé indispensable.

Ainsi, ce travail a permis de mettre en évidence qu'en cas de carence en acides aminés, la voie eIF2 α /ATF4/CHOP joue un rôle clé dans le devenir de la cellule. En fonction de la durée et de l'intensité du stress, la régulation très coordonnée de ces mécanismes moléculaires va permettre successivement la survie de la cellule et ensuite l'apoptose (**Figure 67**).

Etant donnée l'implication de la dérégulation d'une part de la voie eIF2 α /ATF4 et d'autre part du processus autophagique dans certaines pathologies telles que le diabète, les maladies infectieuses ou inflammatoires, les maladies neurodégénératives et le cancer, ces résultats devraient permettre d'établir le lien entre la voie de signalisation eIF2 α /ATF4 et la dérégulation du processus autophagique dans ces pathologies. L'approfondissement de ces connaissances pourra participer à mettre en place dans le futur, des traitements pharmacologiques qui cibleraient la voie eIF2 α /ATF4 et permettrait ainsi de moduler le processus autophagique impliqué dans ces physiopathologies.



Annexes



Publication non présentée

Averous J, Lambert-Langlais S, Cherasse Y, Carraro V, Parry L, **B'chir W**,
Jousse C, Maurin AC, Bruhat A, Fafournoux P. (2011)

**“Amino acid deprivation regulates the stress-inducible
gene p8 via the GCN2/ATF4 pathway”**

Biochem. Biophys. Res. Commun. 16;413(1):24-9

ANNEXES

Averous J, Lambert-Langlais S, Cherasse Y, Carraro V, Parry L, **B'chir W**, Jousse C, Maurin AC, Bruhat A, Fafournoux P.

“Amino acid deprivation regulates the stress-inducible gene p8 via the GCN2/ATF4 pathway.”

Biochem Biophys Res Commun. 2011 Sep 16;413(1):24-9.



Amino acid deprivation regulates the stress-inducible gene p8 via the GCN2/ATF4 pathway

J. Averous^{a,*}, S. Lambert-Langlais^a, Y. Cherasse^b, V. Carraro^a, L. Parry^a, W. B'chir^a, C. Jousse^a, A.C. Maurin^a, A. Bruhat^a, P. Fafournoux^{a,*}

^aUnité de Nutrition Humaine, UMR1019, INRA de Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle, France

^bDepartment of Molecular Behavioral Biology, Osaka Bioscience Institute, Suita, Osaka 565-0874, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 August 2011

Available online 16 August 2011

Keywords:

GCN2

ATF4

p8

AARE

Amino acid

ABSTRACT

In mammals, the GCN2/ATF4 pathway has been described as the main pathway involved in the regulation of gene expression upon amino acid limitation. This regulation is notably conferred by the presence of a cis-element called Amino Acid Response Element (AARE) in the promoter of specific genes. *In vivo*, the notion of amino acid limitation is not limited to nutritional context, indeed several pathological situations are associated with alteration of endogenous amino acid availability. This is notably true in the context of tumour in which the alteration of the microenvironment can lead to a perturbation in nutrient availability. P8 is a small weakly folded multifunctional protein that is overexpressed in several kinds of cancers and whose expression is induced by different stresses. In this study we have demonstrated that amino acid starvation was also able to induce p8 expression. Moreover, we brought the evidence, *in vitro* and *in vivo*, that the GCN2/ATF4 pathway is involved in this regulation through the presence of an AARE in p8 promoter.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

All the organisms possess adaptative mechanisms to cope with changes in nutrient availability. In mammals, amino acid homeostasis presents two important features. Firstly, in adult human nine amino acids are essential since they cannot be synthesized *de novo* by the organism; secondly, there is no specific storage of amino acids. In consequence, if essential amino acids are not enough provided by diet, the organism has to tune finely amino acid homeostasis. In addition to a dietary deficiency, amino acid homeostasis can be affected by several pathological situations such as cancer, sepsis or trauma [1–3]. It exists different levels of adaptation to restore amino acid homeostasis i.e. exchanges between organs, modification of the flux of proteolysis and proteosynthesis. Another level of adaptation is the modification of gene expression. Indeed, it has been demonstrated that amino acids by themselves are able to regulate the expression of specific genes [4,5] such as amino acid transporters, enzymes or transcription factors.

Since several years the understanding of the molecular mechanisms involved in the regulation of gene expression by amino acid limitation in mammals has progressed [6–9]. One of the major pathways implies the kinase GCN2. This protein detects the accumula-

tion of free tRNA which leads to the induction of its activity. The phosphorylation, by GCN2, of its substrate, the α subunit of the initiation factor eIF2, induces a global inhibition of protein synthesis but also an increase of the translation of specific mRNA such as the transcription factor ATF4 (activating transcription factor 4) due to the presence of uORF in its 5'UTR [10]. ATF4 is then able to bind amino acid response element (AARE) located in the promoter of specific genes and to induce their transcription [11]. The core sequence of the AARE is 5'- $\frac{A}{C}$ TT $\frac{G}{C}$ CATCA-3' and according to the differences observed between genes, several transcription factors and cofactors (ATF2, C/EBP β , JDP2. . .) [8,12,13] are also involved positively or negatively in the regulation of the AARE dependent transcription. However several studies have determined the master role of ATF4 in the regulation of the AARE-dependent transcription [11,14,15]. So far, few genes have been described as possessing an AARE sequence in their promoters [15]. By promoter sequence analysis we have identified a putative AARE site in the promoter of the p8 gene. Previous studies have determined that this sequence was a C/EBP/ATF binding site [16,17].

P8, also known as nupr1, is a small protein of 82 amino acids that possesses notably a nuclear localization signal and a basic helix-loop helix motif. An architectural role of p8 has been notably suggested in the regulation of transcription [18]. P8 has been first described as a gene induced during the pancreatitis in rats [19]. It is described as stress inducible protein, indeed the expression of p8 mRNA has been shown to be induced by several kinds of cellular

* Corresponding authors.

E-mail addresses: julien.averous@clermont.inra.fr (J. Averous), pierre.fafournoux@clermont.inra.fr (P. Fafournoux).

stresses such as, serum withdrawal or a stress of the endoplasmic reticulum (ER) [20,21]. Notably, it has been shown that an ER stress induces p8 expression in an ATF4-dependent manner [22]. The precise role of p8 is not well determined. According to the context, p8 has been shown to promote either cell survival or cell death. P8 being over-expressed in several kinds of tumours, the understanding of its regulation would be relevant in order to precise its function according to the cellular context [23].

It is noticeable that the tumour microenvironment may present an alteration of the vascularisation, leading to a deficit in blood supply, and as a consequence a deprivation of nutrients and notably amino acid. In consequence the tumour has to cope with this deficit in amino acid through the activation of adaptive mechanisms. Recently Ye et al. have demonstrated the importance of the GCN2/ATF4 pathway in the maintenance of metabolic homeostasis in tumour cells [24]. The impact of amino acid availability on p8 expression has never been studied, however it could represent an important feature in the context of the modification of the tumour microenvironment. Moreover it would also signify that p8 may have a role in other pathological or nutritional contexts where the amino acids availability is compromised. This study proposes to establish whether p8 is regulated by amino acid deficiency and to assess the role of the GCN2/ATF4 pathway in such regulation.

2. Material and methods

2.1. Ethics statement

Maintenance of the mice and experiments were conducted according to the guidelines formulated by the European Community for the use of experimental animals (L358-86/609/EEC) and were approved by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA-France). INRA animal facilities were approved by the french veterinary department (C634514).

2.2. Animal

Mice were maintained in our animal facility as previously described [25]. The experimental diets, control and leucine devoid, were identical to our previous study [25]. The mice were acclimated to control diet for 7 days and to overnight starvation. On the morning of day of experiment, mice had free access to experimental diets for 2 h or 4 h until they were killed by pentobarbital overdose. Each animal experiment was repeated three times with four animals in each group.

2.3. Cell culture

MEFs and NIH-3T3 cells were grown in DMEM with 10% FCS at 37 °C with 5% CO₂. The media lacking leucine has been previously described [11].

2.4. Protein analysis

Protein extraction was performed with our standard lysis buffer (50 mM Tris, 25 mM beta-glycerophosphate, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5% (v/v) triton X100, 1 mM DTT, 1 mM benzimidazole, protease cocktail inhibitors (Sigma)). SDS-PAGE were performed as described previously [11].

2.5. Plasmid constructions

2X-AARE-TK Luc and ATF4 plasmids have been previously described [6,11]. P8 promoter fragment (–1399 + 11) have been obtained from genomic mice DNA by PCR, primers containing appropriate restriction sites at their 5' end. Forward primer: 5'-cat-

cgcacgcgtcaaggcaggttgatctctgag; Reverse primer: 5'-caagcgtc-gagtcttgctgtctcctgtctgaatgctg. Amplified fragments were then cloned into the pGL3-basic reporter construct (Promega) by MluI and XhoI digestion.

The p8 mutated promoter has been obtained by PCR using the previous construct as template.

The same forward primer than previously was used, the reverse primer contained the AARE mutated sequence and a part of the promoter containing a BstXI restriction site. Reverse primer: 5'-cctaaaccacggggtggcccccgcctccaagcctgtctgatcattctggcctttccc. The amplified fragment has been cloned in the previous construct after a MluI BstXI digestion.

2.6. DNA transfection and luciferase assay

Cells were transfected by the calcium phosphate coprecipitation method as described [6], 0.5 µg of luciferase plasmid and ATF4 plasmid were transfected into the cells with 0.05 µg of pCMV-βGal, a plasmid carrying the bacterial β-galactosidase gene fused to the human cytomegalovirus as an internal control. The total amount of plasmid DNA was adjusted to 1.05 µg by addition of the empty plasmid. Cells were then exposed to the precipitate for 16 h. Luciferase activity and β-Galactosidase activity were measured as described previously [11].

2.7. RNA extraction and reverse-transcription

Total RNA was prepared using an RNeasy mini kit (Qiagen) and treated with DNase I, Amp Grade (Invitrogen). RNA (0.5 µg) was reverse-transcribed with 100 U of Superscript II plus RNase H reverse transcriptase (Invitrogen) using 100 µM random hexamer primers.

2.8. Real time PCR

PCR was carried out using a CFX96 (Biorad) and iQ-SYBR green supermix. The following experimental protocol was used for all the primers: denaturation (95 °C for 10 min), amplification (repeated 45 times; 95 °C for 15 s, 60 °C for 5 s and 72 °C for 8 s). Primer used: ASNS-For 5'-tacaaccacaagcgctaca and ASNS-Rev 5'-aagggcct-gactccataggt-3'; p8-For 5'-ctagaggatgaagatggaatcctg and p8-REV 5'-gagttctggaacttggtcagca; batc-For 5'-tacagcttcaccaccagc and batc-Rev 5'-aaggaaggctgaaaagagc.

2.9. Chromatin immunoprecipitation analysis (ChIP)

ChIP analysis was performed according to the protocol of Upstate Biotechnology, Inc. (Charlottesville, VA) with minor modifications as previously described [25]. Real-time PCR was performed as described. Primers used: p8-For 5'-gtgagctctgtgaggaggga and p8-Rev 5'- agccctgtctgatcgaatct.

3. Results

The first step of this study was to determine if leucine limitation induced the expression of p8 mRNA and if such induction was GCN2-dependent. GCN2 deficient mouse embryonic fibroblast (MEF) has been used to check this hypothesis. In GCN2+/+ cells, as expected, the consequences of leucine starvation were the phosphorylation of eIF2α and the induction of ATF4 protein level (Fig. 1A). Consistently with our previous data and those from the literature, in GCN2–/– cells the phosphorylation of eIF2α and the induction of ATF4 were abolished. Then, the level of p8 mRNA has been measured in GCN2+/+ and GCN2–/– cells which have been leucine starved for 2, 4 and 8 h. In parallel, the level of asparagine synthetase (ASNS) mRNA has been determined as a positive

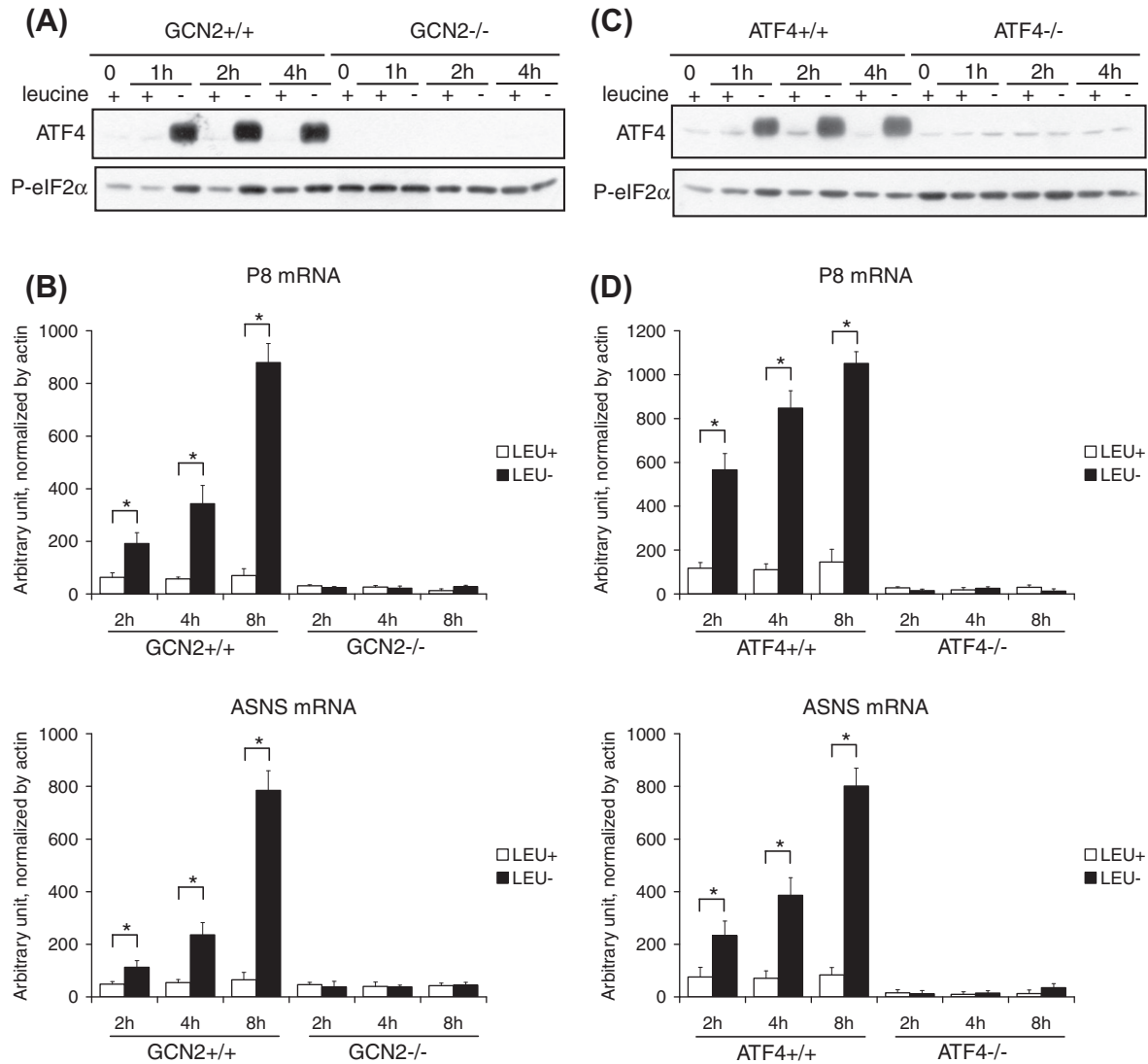


Fig. 1. Leucine starvation induces p8 mRNA expression in a GCN2/ATF4-dependent manner. MEFs cells (GCN2^{+/+}, GCN2^{-/-}, ATF4^{+/+}, ATF4^{-/-}) were cultured in DMEM/F12ham devoid or not of leucine during 1, 2, 4 and 8 h. (A) Western blot analysis of Pser51-eIF2 α and ATF4 from total protein extract of control and leucine starved GCN2^{+/+} and GCN2^{-/-} cells. (B) The mRNA levels of p8 and ASNS were measured in GCN2^{+/+} and GCN2^{-/-} cells by real-time PCR, results were normalized by actin mRNA levels and were expressed in % of the time 0 h. (C) Same experiments than a, with ATF4^{+/+} and ATF4^{-/-} cells. (D) Same experiments than b, with ATF4^{+/+} and ATF4^{-/-} cells. Differences between control cells and leucine starved cells at each time point were assessed by Student's test. Bars with (*) are significantly different from each other ($P < 0.05$).

control (Fig. 1B). It has been well described that leucine starvation induces ASNS expression in a GCN2/ATF4 dependent-manner. Indeed, in GCN2^{+/+} cells the amount of ASNS mRNA was induced by the absence of leucine whereas it remained unaffected in GCN2^{-/-} cells. In GCN2^{+/+} cells, the amount of p8 mRNA was significantly increased since 2 h of starvation and an induction of 9-fold was observed after 8 h (Fig. 1B). This induction was not observed in leucine starved GCN2^{-/-} cells. These results demonstrated that leucine starvation induced p8 expression in a GCN2-dependent manner.

In order to determine whether ATF4 was involved in the regulation of p8 mRNA during leucine starvation, we have performed the same experiments in ATF4 deficient MEF. The ATF4^{+/+} cells behaved in the same way than the GCN2^{+/+} in term of phosphorylation of eIF2 α and ATF4 expression (Fig. 1C). In ATF4^{-/-}, the phosphorylation of eIF2 α was still observed, however due to the absence of ATF4 the induction of ASNS mRNA was abolished; the same result has been obtained for p8 mRNA (Fig. 1D). It appeared that the regulation of p8 mRNA by leucine starvation depended on the presence of ATF4.

This last result sustained the hypothesis that the C/EBP/ATF site present in p8 promoter is a functional AARE. Indeed, as illustrated in Fig. 2A the C/EBP/ATF site located between -111 and -103 is identical to the AARE sequence characterized in the CHOP promoter. A fragment of 1399 bases pairs of the mouse p8 promoter has been cloned in front of the luciferase reporter perform. A point mutation of the C/EBP/ATF sequence in the p8 promoter has been also performed. This point mutation, in the context of CHOP promoter, has been previously shown to abolish the responsiveness of the AARE sequence to leucine starvation [6] by disrupting ATF4 binding to the AARE [11]. We have used as a positive control a plasmid containing two copies of the CHOP AARE in front of a minimal promoter TK (2XAARE-TK). These constructions have been tested by transient transfection in NIH-3T3 cells. During leucine starvation an induction of the transcriptional activity of p8 promoter was observed (Fig. 2B). We obtained a similar result with the 2XAARE-TK construct. Moreover the mutation of the C/EBP/ATF sequence abolished totally the induction of the transcriptional activity. We have also co-transfected an ATF4 expression vector together with each construct. The over-expression of ATF4 has been

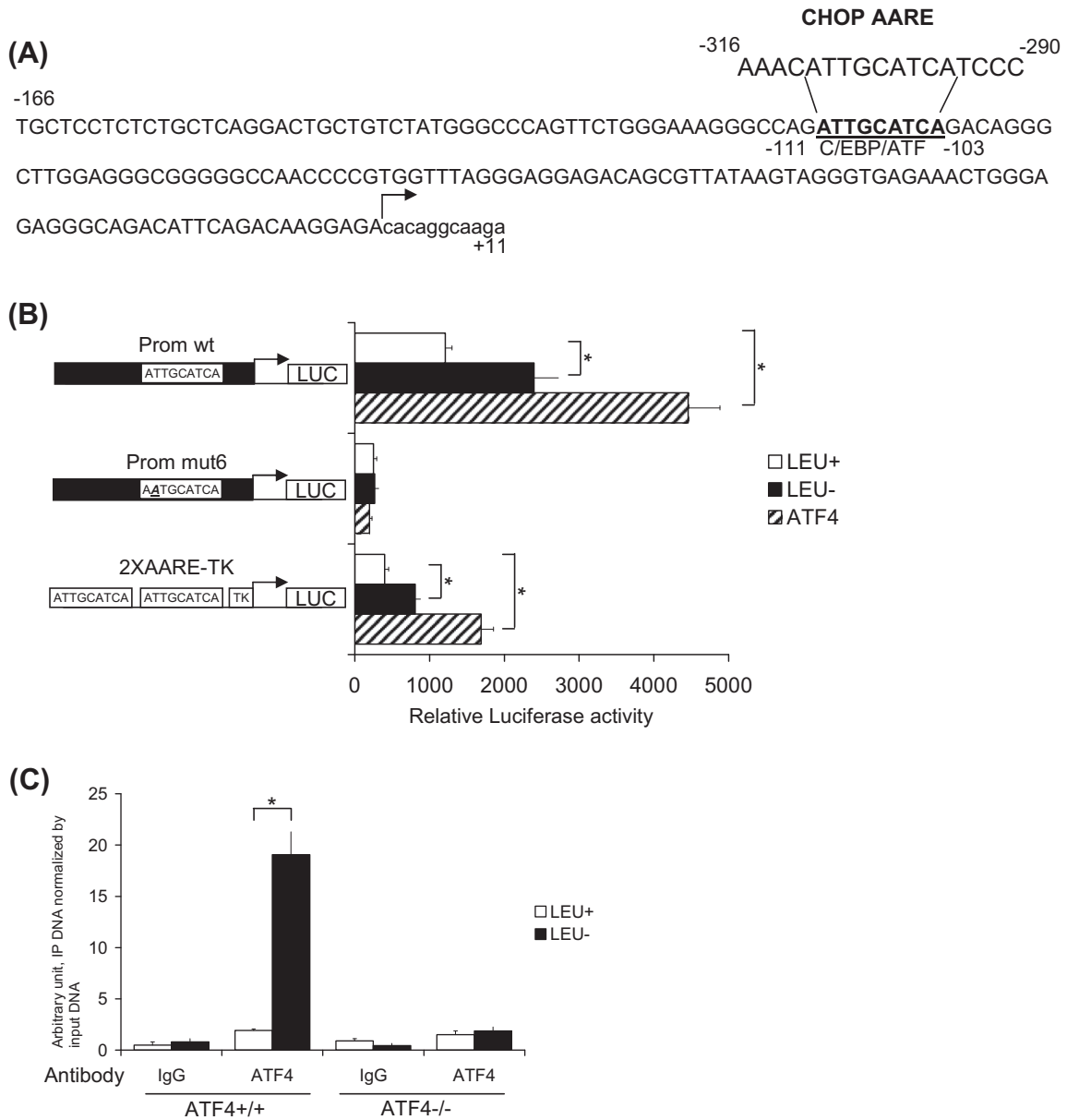


Fig. 2. The C/EBP-ATF site in p8 promoter is a functional AARE. (A) Representation of p8 promoter. The C/EBP-ATF site is identical to the CHOP AARE sequence. (B) NIH-3T3 cells were transfected with a plasmid encoding the luciferase gene driven either by: the wild-type promoter of p8 (prom-wt), the promoter of p8 mutated in the C/EBP/ATF sequence (prom mut6) or two copies of the CHOP-AARE and the minimal promoter of Thymidine-Kinase (2XAARE-TK). When indicated, the cells were also co-transfected with an expression vectors encoding ATF4. A plasmid pCMV-βGAL was used as an internal control. Twenty-four hours after the transfection the cells were cultured for 8 h in DMEM/F12ham devoid or not of leucine. Results were expressed as the ratio of the luciferase activity normalized by the beta-gal activity. (c) MEF ATF4^{+/+} and ATF4^{-/-} were cultured in DMEM/F12ham devoid or not of leucine for 2 h, ChIP analysis were performed using an antibody specific for ATF4 or a non-specific antibody control (IgG). The amount of PCR product obtained with immunoprecipitated DNA (IP) were normalized with the product obtained with input DNA. Differences between control cells, leucine starved cells or ATF4 transfected cells were assessed by Student's test. Bars with (*) are significantly different from each other ($P < 0.05$).

shown to induce the AARE-dependent transcription. The induction observed with the 2XAARE-TK confirmed this previous result. Concerning the p8 promoter, the over-expression of ATF4 induced the transcriptional activity of the wild type but has no effect on the mutated promoter (Fig. 2B). These experiments confirmed that the C/EBP/ATF site present in the promoter was responsible for the induction of the transcription during leucine starvation. In consequence, the p8 C/EBP/ATF site is a functional AARE sequence. To further confirm that the induction of transcription by ATF4 was a direct consequence of the binding of ATF4 to the AARE in the p8 promoter, Chromatin immuno-precipitation (ChIP) experiment has been performed. ATF4^{-/-} cells have been used as negative control. In ATF4^{+/+} cells, the binding of ATF4 on the sequence containing

the AARE was found to be induced about 8-fold after 2 h of leucine starvation (Fig. 2C).

These results demonstrated *in vitro* that the GCN2/ATF4 pathway controls p8 expression in response to leucine starvation. However we wanted to assess whether this regulation could take place *in vivo*, in a nutritional context for which the activation of the GCN2/ATF4 pathway have been well described [25]. Mice were fed with a control diet or with a diet deficient in leucine which induced a rapid and important decrease of plasma leucinemia (data not shown). The level of p8 and ASNS mRNA has been measured in liver of wild-type and GCN2 knock-out mice. In wild type mice an induction of ASNS was observed 2 h following the consumption of the leucine deficient diet (Fig. 3A). Four hours after the beginning

of the meal consumption, for both p8 and ASNS mRNAs, an induction was observed. In GCN2 knock-out mice liver, no induction was observed for ASNS and p8 mRNA. For the last, we even observed a decrease of its amount following the consumption of the leucine deficient diet (Fig. 3A). The binding of ATF4 on p8 promoter *in vivo* has been checked by ChIP as described above. In wild type mice, the interaction of ATF4 with p8 promoter was confirmed whereas in absence of GCN2 this interaction disappeared (Fig. 3B). Together these results confirmed that the regulation of p8 expression takes place *in vivo* in a nutritional condition leading to a deficit in an essential amino acid.

4. Discussion

The concept of regulation of gene expression by amino acid in mammals is now well established. In the last decade, the GCN2/ATF4 pathway has emerged as the main pathway involved in the regulation of gene expression by amino acid limitation [26]. Importantly, it has been recently demonstrated that this signalling pathway, which have been well characterized *in vitro*, was also relevant *in vivo* in a context of a nutritional challenge [25]. However the number of genes for which a functional AARE has been characterized is still limited. Their identification represents an important step in order to have a better understanding in the role of the GCN2/ATF4 pathway in the adaptation to amino acid limitation.

In the present study, we have shown that p8 expression is induced by leucine starvation. The essential role of GCN2 in this regulation was confirmed by using GCN2^{-/-} cells and mice. Our experiments have also demonstrated that ATF4 was necessary for

the regulation of p8 expression during leucine starvation. Moreover, the study of p8 promoter and the ChIP experiments have confirmed that the C/EBP/ATF composite site was a functional AARE able to bind ATF4 during leucine starvation. These results were in agreement with previous studies which have demonstrated that ATF4 was able to activate p8 expression [22]. ATF4 translation is induced consecutively to the phosphorylation of eIF2 α , this step being the initial event of the Integrated Stress Response (ISR). Indeed, eIF2 α is phosphorylated by four different kinases: GCN2, PERK (activated by ER stress), PKR (activated by interferon and viral infection) and HRI (activated by heme deficiency). This phosphorylation event is going to coordinate a translational and transcriptional program, notably through ATF4, which adapt cell to a stress [27]. In consequence, p8 expression should be induced by any treatment that induces the ISR. Indeed, Salazar and coll have demonstrated that the eIF2 α phosphorylation occurring during cannabinoid treatment was responsible for the induction of p8 expression [21]. In this Study, the phosphorylation of eIF2 α was proposed to be the consequence of an ER stress caused by ceramides accumulation following cannabinoid treatment. As well, several drugs, which induce an ER stress, increase p8 expression in an ATF4-dependent manner [22]. Our present work enforces the notion that p8 is a part of the ISR and for the first time we demonstrated that one of the eIF2 α kinase is involved in the regulation of p8 expression following a cellular stress. Due to the presence of an AARE, p8 can be considered as one of the early target of the transcriptional program of the ISR. In the context of cannabinoid treatment, it has been proposed that p8 is involved in the induction of apoptosis and autophagy following an ER stress [21]. The

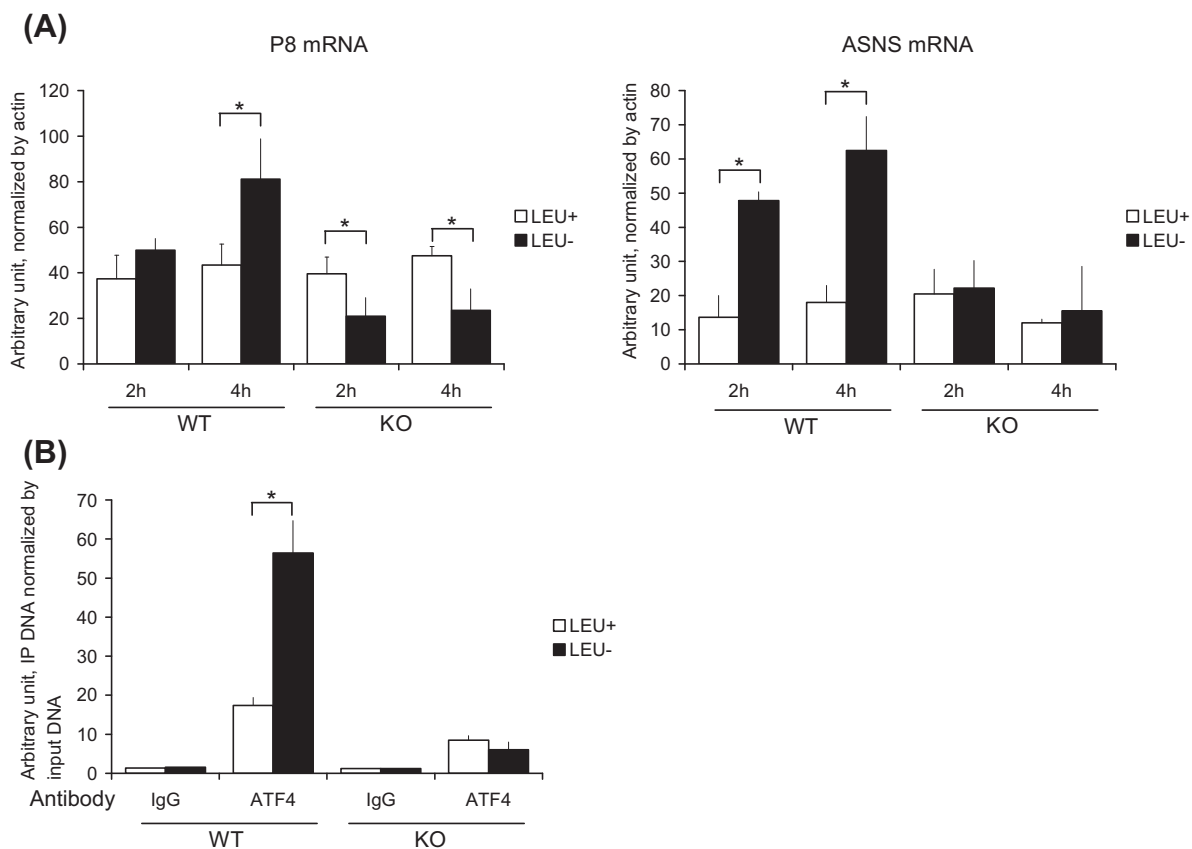


Fig. 3. The regulation of p8 by leucine availability occurs *in vivo* in mice liver. Overnight starved mice were fed for 2 and 4 h either with a control (Leu+) or a leucine-deficient (Leu-) diet. (A) The mRNA levels of p8 and ASNS were measured in total hepatic RNA by real time PCR, the results were normalized by actin mRNA levels and were expressed in% of the time 0 h. (B) ChIP analysis were performed on DNA from liver nuclear extract using an antibody specific for ATF4 or a non-specific antibody control (IgG). The amount of PCR product obtained with immunoprecipitated DNA (IP) were normalized with the product obtained with input DNA. Differences between mice fed with control diet and mice fed with leucine diet were assessed by Student's test. Bars with (*) are significantly different from each other ($P < 0.05$).

authors have also demonstrated that p8 was involved in the proper induction of ATF4 and several ISR regulated gene such as trb3 or CHOP. Similarly, Jin et al. have shown that over-expression of p8 led to the increase of ATF4 expression and in consequence to the induction of CHOP and TRB3 expression [22]. However, it is not yet clear how p8 may regulate ATF4 expression, nevertheless this regulation could define a positive feedback in the context of the ATF4-dependent transcription. Further investigation will be necessary to elucidate this question.

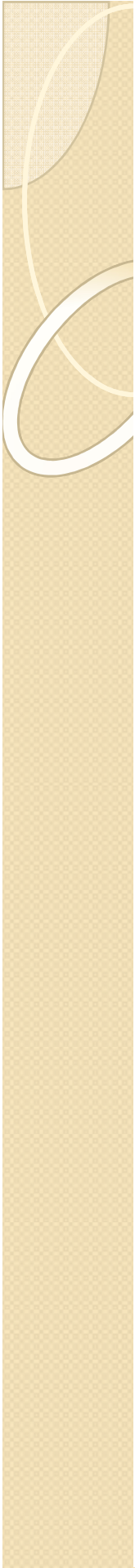
Our work demonstrated that the GCN2 pathway was involved in the regulation of p8 through an AARE in the context of amino acid limitation. This finding extends the field of investigation concerning this small puzzling stress protein. It would be of interest to determine the role of p8 in the adaptation to amino acid limitation. It represents an interesting issue not only in term of nutrition, but also for pathologies such as cancers for which the amount of amino acids may be also severely affected in the cellular microenvironment.

Acknowledgments

We are grateful to D. Ron and H. Harding for the gift of GCN2^{-/-} and ATF4^{-/-} MEFs. The authors thank also J. Iovanna for its helpful advices. We would like also to thank Melody Fimbel for her technical support.

References

- [1] C. Obled, I. Papet, D. Breuille, Metabolic bases of amino acid requirements in acute diseases, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 5 (2002) 189–197.
- [2] G. Biolo, G. Toigo, B. Ciochi, R. Situlin, F. Iscra, A. Gullo, G. Guarnieri, Metabolic response to injury and sepsis: changes in protein metabolism, *Nutrition* 13 (1997) 525–575.
- [3] M. Jeevanandam, G.D. Horowitz, S.F. Lowry, M.F. Brennan, Cancer cachexia and protein metabolism, *Lancet* 1 (1984) 1423–1426.
- [4] A. Bruhat, C. Jousse, X.Z. Wang, D. Ron, M. Ferrara, P. Fafournoux, Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 17588–17593.
- [5] R.G. Hutson, M.S. Kilberg, Cloning of rat asparagine synthetase and specificity of the amino acid-dependent control of its mRNA content, *Biochem. J.* 304 (Pt 3) (1994) 745–750.
- [6] A. Bruhat, C. Jousse, V. Carraro, A.M. Reimold, M. Ferrara, P. Fafournoux, Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the CHOP promoter, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 7192–7204.
- [7] F. Siu, P.J. Bain, R. LeBlanc-Chaffin, H. Chen, M.S. Kilberg, ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 24120–24127.
- [8] H. Chen, Y.X. Pan, E.E. Dudenhausen, M.S. Kilberg, Amino acid deprivation induces the transcription rate of the human asparagine synthetase gene through a timed program of expression and promoter binding of nutrient-responsive basic region/leucine zipper transcription factors as well as localized histone acetylation, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 50829–50839.
- [9] J. Fernandez, A.B. Lopez, C. Wang, R. Mishra, L. Zhou, I. Yaman, M.D. Snider, M. Hatzoglou, Transcriptional control of the arginine/lysine transporter, cat-1, by physiological stress, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 50000–50009.
- [10] H.P. Harding, I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira, D. Ron, Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells, *Mol. Cell.* 6 (2000) 1099–1108.
- [11] J. Averous, A. Bruhat, C. Jousse, V. Carraro, G. Thiel, P. Fafournoux, Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 5288–5297.
- [12] Y. Cherasse, C. Chaveroux, C. Jousse, A.C. Maurin, V. Carraro, L. Parry, P. Fafournoux, A. Bruhat, Role of the repressor JDP2 in the amino acid-regulated transcription of CHOP, *FEBS Lett.* 582 (2008) 1537–1541.
- [13] Y. Cherasse, A.C. Maurin, C. Chaveroux, C. Jousse, V. Carraro, L. Parry, C. Deval, C. Chambon, P. Fafournoux, A. Bruhat, The p300/CBP-associated factor (PCAF) is a cofactor of ATF4 for amino acid-regulated transcription of CHOP, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 5954–5965.
- [14] C. Deval, C. Chaveroux, A.C. Maurin, Y. Cherasse, L. Parry, V. Carraro, D. Milenkovic, M. Ferrara, A. Bruhat, C. Jousse, P. Fafournoux, Amino acid limitation regulates the expression of genes involved in several specific biological processes through GCN2-dependent and GCN2-independent pathways, *FEBS J.* 276 (2009) 707–718.
- [15] M.S. Kilberg, J. Shan, N. Su, ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation, *Trends Endocrinol. Metab.* 20 (2009) 436–443.
- [16] S. Vasseur, G.V. Mallo, A. Garcia-Montero, E.M. Ortiz, F. Fiedler, E. Canepa, S. Moreno, J.L. Iovanna, Structural and functional characterization of the mouse p8 gene: promotion of transcription by the CAAT-enhancer binding protein alpha (C/EBPalpha) and C/EBPbeta trans-acting factors involves a C/EBP cis-acting element and other regions of the promoter, *Biochem. J.* 343 (Pt 2) (1999) 377–383.
- [17] C.M. Passe, G. Cooper, C.C. Quirk, The murine p8 gene promoter is activated by activating transcription factor 4 (ATF4) in the gonadotrope-derived LbetaT2 cell line, *Endocrine* 30 (2006) 81–91.
- [18] S. Goruppi, J.L. Iovanna, Stress-inducible protein p8 is involved in several physiological and pathological processes, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 1577–1581.
- [19] G.V. Mallo, F. Fiedler, E.L. Calvo, E.M. Ortiz, S. Vasseur, V. Keim, J. Morisset, J.L. Iovanna, Cloning and expression of the rat p8 cDNA, a new gene activated in pancreas during the acute phase of pancreatitis, pancreatic development, and regeneration, and which promotes cellular growth, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 32360–32369.
- [20] S. Vasseur, G. Vidal Mallo, F. Fiedler, H. Bodeker, E. Canepa, S. Moreno, J.L. Iovanna, Cloning and expression of the human p8, a nuclear protein with mitogenic activity, *Eur. J. Biochem.* 259 (1999) 670–675.
- [21] M. Salazar, A. Carracedo, I.J. Salanueva, S. Hernandez-Tiedra, M. Lorente, A. Egia, P. Vazquez, C. Blazquez, S. Torres, S. Garcia, J. Nowak, G.M. Fimia, M. Piacentini, F. Cecconi, P.P. Pandolfi, L. Gonzalez-Feria, J.L. Iovanna, M. Guzman, P. Boya, G. Velasco, Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells, *J. Clin. Invest.* 119 (2009) 1359–1372.
- [22] H.O. Jin, S.K. Seo, S.H. Woo, T.B. Choe, S.I. Hong, J.I. Kim, I.C. Park, Nuclear protein 1 induced by ATF4 in response to various stressors acts as a positive regulator on the transcriptional activation of ATF4, *IUBMB Life* 61 (2009) 1153–1158.
- [23] C.E. Cano, T. Hamidi, M.J. Sandi, J.L. Iovanna, Nupr1: the Swiss-knife of cancer, *J. Cell. Physiol.* 226 (2011) 1439–1443.
- [24] J. Ye, M. Kumanova, L.S. Hart, K. Sloane, H. Zhang, D.N. De Panis, E. Bobrovnikova-Marjon, J.A. Diehl, D. Ron, C. Koumenis, The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation, *Embo. J.* 29 (2010) 2082–2096.
- [25] V. Carraro, A.C. Maurin, S. Lambert-Langlais, J. Averous, C. Chaveroux, L. Parry, C. Jousse, D. Ord, T. Ord, P. Fafournoux, A. Bruhat, Amino acid availability controls TRB3 transcription in liver through the GCN2/eIF2alpha/ATF4 pathway, *PLoS One* 5 (2010) e15716.
- [26] C. Chaveroux, S. Lambert-Langlais, Y. Cherasse, J. Averous, L. Parry, V. Carraro, C. Jousse, A.C. Maurin, A. Bruhat, P. Fafournoux, Molecular mechanisms involved in the adaptation to amino acid limitation in mammals, *Biochimie* 92 (2010) 736–745.
- [27] H.P. Harding, Y. Zhang, H. Zeng, I. Novoa, P.D. Lu, M. Calfon, N. Sadri, C. Yun, B. Popko, R. Paules, D.F. Stojdl, J.C. Bell, T. Hettmann, J.M. Leiden, D. Ron, An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress, *Mol. Cell.* 11 (2003) 619–633.



Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abastado JP, Miller PF, Jackson BM, Hinnebusch AG (1991) Suppression of ribosomal reinitiation at upstream open reading frames in amino acid-starved cells forms the basis for GCN4 translational control. *Molecular and cellular biology* **11**: 486-496
- Adelson ME, Martinand-Mari C, Iacono KT, Muto NF, Suhadolnik RJ (1999) Inhibition of human immunodeficiency virus (HIV-1) replication in SupT1 cells transduced with an HIV-1 LTR-driven PKR cDNA construct. *European journal of biochemistry / FEBS* **264**: 806-815
- Aguilera MO, Beron W, Colombo MI (2012) The actin cytoskeleton participates in the early events of autophagosome formation upon starvation induced autophagy. *Autophagy* **8**: 1590-1603
- Ait Ghezala H, Jolles B, Salhi S, Castrillo K, Carpentier W, Cagnard N, Bruhat A, Fafournoux P, Jean-Jean O (2012) Translation termination efficiency modulates ATF4 response by regulating ATF4 mRNA translation at 5' short ORFs. *Nucleic acids research* **40**: 9557-9570
- Alers S, Loffler AS, Wesselborg S, Stork B (2012) Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Molecular and cellular biology* **32**: 2-11
- Altman BJ, Wofford JA, Zhao Y, Coloff JL, Ferguson EC, Wieman HL, Day AE, Ilkayeva O, Rathmell JC (2009) Autophagy provides nutrients but can lead to Chop-dependent induction of Bim to sensitize growth factor-deprived cells to apoptosis. *Molecular biology of the cell* **20**: 1180-1191
- Ameri K, Harris AL (2007) Activating transcription factor 4. *Int J Biochem Cell Biol*
- Ameri K, Harris AL (2008) Activating transcription factor 4. *Int J Biochem Cell Biol* **40**: 14-21
- Ampofo E, Sokolowsky T, Gotz C, Montenarh M (2013) Functional interaction of protein kinase CK2 and activating transcription factor 4 (ATF4), a key player in the cellular stress response. *Biochimica et biophysica acta* **1833**: 439-451
- Aplin A, Jasionowski T, Tuttle DL, Lenk SE, Dunn WA, Jr. (1992) Cytoskeletal elements are required for the formation and maturation of autophagic vacuoles. *Journal of cellular physiology* **152**: 458-466
- Arends MJ, Wyllie AH (1991) Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *International review of experimental pathology* **32**: 223-254
- Ariyama Y, Shimizu H, Satoh T, Tsuchiya T, Okada S, Oyadomari S, Mori M (2007) Chop-deficient mice showed increased adiposity but no glucose intolerance. *Obesity (Silver Spring)* **15**: 1647-1656

- Atkin JD, Farg MA, Walker AK, McLean C, Tomas D, Horne MK (2008) Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* **30**: 400-407
- Aulak KS, Liu J, Wu J, Hyatt SL, Puppi M, Henning SJ, Hatzoglou M (1996) Molecular sites of regulation of expression of the rat cationic amino acid transporter gene. *The Journal of biological chemistry* **271**: 29799-29806
- Aulak KS, Mishra R, Zhou L, Hyatt SL, de Jonge W, Lamers W, Snider M, Hatzoglou M (1999) Post-transcriptional regulation of the arginine transporter Cat-1 by amino acid availability. *The Journal of biological chemistry* **274**: 30424-30432.
- 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. *The Journal of biological chemistry* **279**: 5288-5297
- Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G, Ktistakis NT (2008) Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology* **182**: 685-701
- B'Chir W, Maurin AC, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, Parry L, Stepien G, Fafournoux P, Bruhat A (2013) The eIF2alpha/ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic acids research*
- Bailey J, Europe-Finner GN (2005) Identification of human myometrial target genes of the c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) pathway: the role of activating transcription factor 2 (ATF2) and a novel spliced isoform ATF2-small. *Journal of molecular endocrinology* **34**: 19-35
- Bailey J, Phillips RJ, Pollard AJ, Gilmore K, Robson SC, Europe-Finner GN (2002) Characterization and functional analysis of cAMP response element modulator protein and activating transcription factor 2 (ATF2) isoforms in the human myometrium during pregnancy and labor: identification of a novel ATF2 species with potent transactivation properties. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **87**: 1717-1728
- Bain PJ, LeBlanc-Chaffin R, Chen H, Pali SS, Leach KM, Kilberg MS (2002) The mechanism for transcriptional activation of the human ATA2 transporter gene by amino acid deprivation is different than that for asparagine synthetase. *J Nutr* **132**: 3023-3029
- Balachandran S, Roberts PC, Brown LE, Truong H, Pattnaik AK, Archer DR, Barber GN (2000) Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. *Immunity* **13**: 129-141
- Baldwin AS (2012) Regulation of cell death and autophagy by IKK and NF-kappaB: critical mechanisms in immune function and cancer. *Immunological reviews* **246**: 327-345
- Baltzis D, Li S, Koromilas AE (2002) Functional characterization of pkr gene products expressed in cells from mice with a targeted deletion of the N terminus or C terminus domain of PKR. *The Journal of biological chemistry* **277**: 38364-38372

- Baltzis D, Qu LK, Papadopoulou S, Blais JD, Bell JC, Sonenberg N, Koromilas AE (2004) Resistance to vesicular stomatitis virus infection requires a functional cross talk between the eukaryotic translation initiation factor 2alpha kinases PERK and PKR. *Journal of virology* **78**: 12747-12761
- 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. *The Journal of biological chemistry* **275**: 26976-26985.
- Barbul A (1986) Arginine: biochemistry, physiology, and therapeutic implications. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition* **10**: 227-238
- Beau I, Esclatine A, Codogno P (2008) Lost to translation: when autophagy targets mature ribosomes. *Trends in cell biology* **18**: 311-314
- Beckerman R, Prives C (2010) Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**: a000935
- Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J, Mazure NM (2009) Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Molecular and cellular biology* **29**: 2570-2581
- Bensaad K, Cheung EC, Vousden KH (2009) Modulation of intracellular ROS levels by TIGAR controls autophagy. *Embo J* **28**: 3015-3026
- Berlanga JJ, Santoyo J, De Haro C (1999) Characterization of a mammalian homolog of the GCN2 eukaryotic initiation factor 2alpha kinase. *Eur J Biochem* **265**: 754-762.
- Bernard A, Klionsky DJ (2013) Autophagosome formation: tracing the source. *Developmental cell* **25**: 116-117
- Betin VM, Lane JD (2009a) Atg4D at the interface between autophagy and apoptosis. *Autophagy* **5**: 1057-1059
- Betin VM, Lane JD (2009b) Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *Journal of cell science* **122**: 2554-2566
- Bhattacharya A, Eissa NT (2013) Autophagy and autoimmunity crosstalks. *Frontiers in immunology* **4**: 88
- Bhousmik A, Singha N, O'Connell MJ, Ronai ZA (2008) Regulation of TIP60 by ATF2 modulates ATM activation. *The Journal of biological chemistry* **283**: 17605-17614
- Bhousmik A, Takahashi S, Breitweiser W, Shiloh Y, Jones N, Ronai Z (2005) ATM-dependent phosphorylation of ATF2 is required for the DNA damage response. *Mol Cell* **18**: 577-587
- Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T (2005) p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *The Journal of cell biology* **171**: 603-614

Bjorkoy G, Lamark T, Johansen T (2006) p62/SQSTM1: a missing link between protein aggregates and the autophagy machinery. *Autophagy* **2**: 138-139

Bouman L, Schlierf A, Lutz AK, Shan J, Deinlein A, Kast J, Galehdar Z, Palmisano V, Patenge N, Berg D, Gasser T, Augustin R, Trumbach D, Irrcher I, Park DS, Wurst W, Kilberg MS, Tatzelt J, Winklhofer KF (2011) Parkin is transcriptionally regulated by ATF4: evidence for an interconnection between mitochondrial stress and ER stress. *Cell death and differentiation* **18**: 769-782

Boya P, Reggiori F, Codogno P (2013) Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature cell biology* **15**: 713-720

Breitwieser W, Lyons S, Flenniken AM, Ashton G, Bruder G, Willington M, Lacaud G, Kouskoff V, Jones N (2007) Feedback regulation of p38 activity via ATF2 is essential for survival of embryonic liver cells. *Genes Dev* **21**: 2069-2082

Brenk M, Scheler M, Koch S, Neumann J, Takikawa O, Hacker G, Bieber T, von Bubnoff D (2009) Tryptophan deprivation induces inhibitory receptors ILT3 and ILT4 on dendritic cells favoring the induction of human CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ T regulatory cells. *J Immunol* **183**: 145-154

Bromati CR, Lellis-Santos C, Yamanaka TS, Nogueira TC, Leonelli M, Caperuto LC, Gorjao R, Leite AR, Anhe GF, Bordin S (2011) UPR induces transient burst of apoptosis in islets of early lactating rats through reduced AKT phosphorylation via ATF4/CHOP stimulation of TRB3 expression. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* **300**: R92-100

Browne GJ, Proud CG (2004) A novel mTOR-regulated phosphorylation site in elongation factor 2 kinase modulates the activity of the kinase and its binding to calmodulin. *Molecular and cellular biology* **24**: 2986-2997

Bruhat A, Averous J, Carraro V, Zhong C, Reimold AM, Kilberg MS, Fafournoux P (2002) Differences in the molecular mechanisms involved in the transcriptional activation of the CHOP and asparagine synthetase genes in response to amino acid deprivation or activation of the unfolded protein response. *The Journal of biological chemistry* **277**: 48107-48114

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.

Bruhat A, Jousse C, Wang XZ, Ron D, Ferrara M, Fafournoux P (1997a) Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. *The Journal of biological chemistry* **272**: 17588-17593

Bruhat A, Jousse C, Wang XZ, Ron D, Ferrara M, Fafournoux P (1997b) Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. *The Journal of biological chemistry* **272**: 17588-17593

Brush MH, Weiser DC, Shenolikar S (2003) Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Molecular and cellular biology* **23**: 1292-1303

Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA, Snyder SH, Sabatini DM (1998) RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 1432-1437

Carlberg U, Nilsson A, Nygard O (1990) Functional properties of phosphorylated elongation factor 2. *European journal of biochemistry / FEBS* **191**: 639-645

Carraro V, Maurin AC, Lambert-Langlais S, Averous J, Chaveroux C, Parry L, Jousse C, Örd D, Örd T, Fafournoux P, Bruhat A (2010) Amino acid availability controls TRB3 transcription in liver through the GCN2/eIF2 α /ATF4 pathway. *PloS one* **5 (12)**: e15716

Cazanave SC, Elmi NA, Akazawa Y, Bronk SF, Mott JL, Gores GJ (2010) CHOP and AP-1 cooperatively mediate PUMA expression during lipooapoptosis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* **299**: G236-243

Cecconi F, Levine B (2008) The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death. *Developmental cell* **15**: 344-357

Chaveroux C, Jousse C, Cherasse Y, Maurin AC, Parry L, Carraro V, Derijard B, Bruhat A, Fafournoux P (2009) Identification of a novel amino acid response pathway triggering ATF2 phosphorylation in mammals. *Molecular and cellular biology* **29**: 6515-6526

Chen Y, Wang JJ, Li J, Hosoya KI, Ratan R, Townes T, Zhang SX (2012) Activating transcription factor 4 mediates hyperglycaemia-induced endothelial inflammation and retinal vascular leakage through activation of STAT3 in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia* **55**: 2533-2545

Cherasse Y, Chaveroux C, Jousse C, Maurin AC, Carraro V, Parry L, Fafournoux P, Bruhat A (2008) Role of the repressor JDP2 in the amino acid-regulated transcription of CHOP. *FEBS Lett* **582**: 1537-1541

Cherkasova VA, Hinnebusch AG (2003) Translational control by TOR and TAP42 through dephosphorylation of eIF2 α kinase GCN2. *Genes & development* **17**: 859-872

Choi AM, Ryter SW, Levine B (2013) Autophagy in human health and disease. *The New England journal of medicine* **368**: 1845-1846

Codogno P, Meijer AJ (2010) Autophagy: a potential link between obesity and insulin resistance. *Cell metabolism* **11**: 449-451

Cohen JJ (1993) Apoptosis. *Immunology today* **14**: 126-130

Collas P, Dahl JA (2008) Chop it, ChIP it, check it: the current status of chromatin immunoprecipitation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **13**: 929-943

Comincini S, Allavena G, Palumbo S, Morini M, Durando F, Angeletti F, Pirtoli L, Miracco C (2013) microRNA-17 regulates the expression of ATG7 and modulates the autophagy process, improving the sensitivity to Temozolomide and low-dose ionizing radiation treatments in human glioblastoma cells. *Cancer biology & therapy* **14**

Copetti T, Demarchi F, Schneider C (2009) p65/RelA binds and activates the beclin 1 promoter. *Autophagy* **5**: 858-859

Costa-Mattioli M, Gobert D, Harding H, Herdy B, Azzi M, Bruno M, Bidinosti M, Ben Mamou C, Marcinkiewicz E, Yoshida M, Imataka H, Cuello AC, Seidah N, Sossin W, Lacaille JC, Ron D, Nader K, Sonenberg N (2005) Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2alpha kinase GCN2. *Nature* **436**: 1166-1173

Costa-Mattioli M, Gobert D, Stern E, Gamache K, Colina R, Cuello C, Sossin W, Kaufman R, Pelletier J, Rosenblum K, Krnjevic K, Lacaille JC, Nader K, Sonenberg N (2007) eIF2alpha phosphorylation bidirectionally regulates the switch from short- to long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* **129**: 195-206

Couturier J, Paccalin M, Lafay-Chebassier C, Chalon S, Ingrand I, Pinguet J, Pontcharraud R, Guillard O, Fauconneau B, Page G (2012) Pharmacological inhibition of PKR in APP^{swePS1dE9} mice transiently prevents inflammation at 12 months of age but increases Abeta42 levels in the late stages of the Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research* **9**: 344-360

Crichton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, Gasco M, Garrone O, Crook T, Ryan KM (2006) DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* **126**: 121-134

Cudna RE, Dickson AJ (2006) Engineering responsiveness to cell culture stresses: growth arrest and DNA damage gene 153 (GADD153) and the unfolded protein response (UPR) in NS0 myeloma cells. *Biotechnology and bioengineering* **94**: 514-521

Cullinan SB, Diehl JA (2004) PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *The Journal of biological chemistry* **279**: 20108-20117

Cybulski N, Hall MN (2009) TOR complex 2: a signaling pathway of its own. *Trends in biochemical sciences* **34**: 620-627

Das G, Shrivage BV, Baehrecke EH (2012) Regulation and function of autophagy during cell survival and cell death. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**

De Angelis R, Iezzi S, Bruno T, Corbi N, Di Padova M, Floridi A, Fanciulli M, Passananti C (2003) Functional interaction of the subunit 3 of RNA polymerase II (RPB3) with transcription factor-4 (ATF4). *FEBS Lett* **547**: 15-19

de Haro C, Mendez R, Santoyo J (1996) The eIF-2alpha kinases and the control of protein synthesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **10**: 1378-1387

Deng J, Lu PD, Zhang Y, Scheuner D, Kaufman RJ, Sonenberg N, Harding HP, Ron D (2004) Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Molecular and cellular biology* **24**: 10161-10168

Dennis PB, Pullen N, Kozma SC, Thomas G (1996) The principal rapamycin-sensitive p70(s6k) phosphorylation sites, T-229 and T-389, are differentially regulated by rapamycin-insensitive kinase kinases. *Molecular and cellular biology* **16**: 6242-6251

Deutsch PJ, Hoeffler JP, Jameson JL, Lin JC, Habener JF (1988) Structural determinants for transcriptional activation by cAMP-responsive DNA elements. *The Journal of biological chemistry* **263**: 18466-18472

Deval C, Chaveroux C, Maurin AC, 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 J* **276**: 707-718

Deval C, Talvas J, Chaveroux C, Maurin AC, Mordier S, Cherasse Y, Parry L, Carraro V, Jousse C, Bruhat A, Fafournoux P (2008) Amino-acid limitation induces the GCN2 signaling pathway in myoblasts but not in myotubes. *Biochimie* **90**: 1716-1721

Dever TE (2002) Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* **108**: 545-556

Dick LR, Cruikshank AA, Destree AT, Grenier L, McCormack TA, Melandri FD, Nunes SL, Palombella VJ, Parent LA, Plamondon L, Stein RL (1997) Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin in cultured cells. *The Journal of biological chemistry* **272**: 182-188

Dickson DW (2004) Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect? *The Journal of clinical investigation* **114**: 23-27

Djavaheri-Mergny M, Amelotti M, Mathieu J, Besancon F, Bauvy C, Souquere S, Pierron G, Codogno P (2006) NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. *The Journal of biological chemistry* **281**: 30373-30382

Djavaheri-Mergny M, Maiuri MC, Kroemer G (2010) Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1. *Oncogene* **29**: 1717-1719

Donnelly N, Gorman AM, Gupta S, Samali A (2013) The eIF2alpha kinases: their structures and functions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*

Dreux M, Chisari FV (2010) Viruses and the autophagy machinery. *Cell Cycle* **9**: 1295-1307

Dreux M, Chisari FV (2011) Impact of the autophagy machinery on hepatitis C virus infection. *Viruses* **3**: 1342-1357

Ebert SM, Monteys AM, Fox DK, Bongers KS, Shields BE, Malmberg SE, Davidson BL, Suneja M, Adams CM (2010) The transcription factor ATF4 promotes skeletal myofiber atrophy during fasting. *Mol Endocrinol* **24**: 790-799

Eby KG, Rosenbluth JM, Mays DJ, Marshall CB, Barton CE, Sinha S, Johnson KN, Tang L, Pietenpol JA (2010) ISG20L1 is a p53 family target gene that modulates genotoxic stress-induced autophagy. *Molecular cancer* **9**: 95

Ecker N, Mor A, Journo D, Abeliovich H (2010) Induction of autophagic flux by amino acid deprivation is distinct from nitrogen starvation-induced macroautophagy. *Autophagy* **6**: 879-890

Egan D, Kim J, Shaw RJ, Guan KL (2011a) The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy* **7**: 643-644

Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, Vasquez DS, Joshi A, Gwinn DM, Taylor R, Asara JM, Fitzpatrick J, Dillin A, Viollet B, Kundu M, Hansen M, Shaw RJ (2011b) Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* **331**: 456-461

Fabre C, Carvalho G, Tasdemir E, Braun T, Ades L, Grosjean J, Boehrer S, Metivier D, Souquere S, Pierron G, Fenaux P, Kroemer G (2007) NF-kappaB inhibition sensitizes to starvation-induced cell death in high-risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Oncogene* **26**: 4071-4083

Fagard R, London IM (1981) Relationship between phosphorylation and activity of heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**: 866-870

Fang R, Xiong Y, Singleton CK (2003) IfkA, a presumptive eIF2 alpha kinase of Dictyostelium, is required for proper timing of aggregation and regulation of mound size. *BMC developmental biology* **3**: 3

Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V (2012) Role of apoptosis in disease. *Aging* **4**: 330-349

Fels DR, Koumenis C (2006) The PERK/eIF2alpha/ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth. *Cancer biology & therapy* **5**: 723-728

Fesus L, Davies PJ, Piacentini M (1991) Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. *European journal of cell biology* **56**: 170-177

Fimia GM, Corazzari M, Antonioli M, Piacentini M (2013) Ambra1 at the crossroad between autophagy and cell death. *Oncogene* **32**: 3311-3318

Fougeray S, Mami I, Bertho G, Beaune P, Thervet E, Pallet N (2012) Tryptophan depletion and the kinase GCN2 mediate IFN-gamma-induced autophagy. *J Immunol* **189**: 2954-2964

Fullwood MJ, Zhou W, Shenolikar S (2012) Targeting phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha to treat human disease. *Progress in molecular biology and translational science* **106**: 75-106

- Gallinetti J, Harputlugil E, Mitchell JR (2013) Amino acid sensing in dietary-restriction-mediated longevity: roles of signal-transducing kinases GCN2 and TOR. *The Biochemical journal* **449**: 1-10
- Gazzola GC, Dall'Asta V, Guidotti GG (1981) Adaptive regulation of amino acid transport in cultured human fibroblasts. Sites and mechanism of action. *The Journal of biological chemistry* **256**: 3191-3198
- Geeraert C, Ratier A, Pfisterer SG, Perdiz D, Cantaloube I, Rouault A, Patingre S, Proikas-Cezanne T, Codogno P, Pous C (2010) Starvation-induced hyperacetylation of tubulin is required for the stimulation of autophagy by nutrient deprivation. *The Journal of biological chemistry* **285**: 24184-24194
- Georgopoulos K, Morgan BA, Moore DD (1992) Functionally distinct isoforms of the CRE-BP DNA-binding protein mediate activity of a T-cell-specific enhancer. *Molecular and cellular biology* **12**: 747-757
- Gietzen DW (1993) Neural mechanisms in the responses to amino acid deficiency. *J Nutr* **123**: 610-625.
- Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF, Aebersold R, Sonenberg N (1999) Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes & development* **13**: 1422-1437
- Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. *Molecular and cellular biology* **11**: 6059-6066
- Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M (2004) hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell death and differentiation* **11**: 390-402
- Gottlieb RA, Carreira RS (2010) Autophagy in health and disease. 5. Mitophagy as a way of life. *American journal of physiology Cell physiology* **299**: C203-210
- Green DR, Kroemer G (2009) Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* **458**: 1127-1130
- Groskreutz DJ, Babor EC, Monick MM, Varga SM, Hunninghake GW (2010) Respiratory syncytial virus limits alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2alpha) phosphorylation to maintain translation and viral replication. *The Journal of biological chemistry* **285**: 24023-24031
- 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
- Gunnery S, Mathews MB (1998) RNA binding and modulation of PKR activity. *Methods* **15**: 189-198

- 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 Metab* **5**: 103-114
- Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V (2004) Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* **119**: 753-766
- Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell* **30**: 214-226
- Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Oomori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano A, Yoshimori T (2013) Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* **495**: 389-393
- Han J, Back SH, Hur J, Lin YH, Gildersleeve R, Shan J, Yuan CL, Krokowski D, Wang S, Hatzoglou M, Kilberg MS, Sartor MA, Kaufman RJ (2013) ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nature cell biology* **15**: 481-490
- 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, Yonezawa K, Weng QP, Kozlowski MT, Belham C, Avruch J (1998) Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism [published erratum appears in J Biol Chem 1998 Aug 21;273(34):22160]. *The Journal of biological chemistry* **273**: 14484-14494
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**: 885-889
- Harding HP, Zhang Y, Ron D (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum- resident kinase [published erratum appears in Nature 1999 Mar 4;398(6722):90] [see comments]. *Nature* **397**: 271-274
- Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* **11**: 619-633
- Harris J (2011) Autophagy and cytokines. *Cytokine* **56**: 140-144
- Hart LS, Cunningham JT, Datta T, Dey S, Tameire F, Lehman SL, Qiu B, Zhang H, Cerniglia G, Bi M, Li Y, Gao Y, Liu H, Li C, Maity A, Thomas-Tikhonenko A, Perl AE, Koong A, Fuchs SY, Diehl JA, Mills IG, Ruggero D, Koumenis C (2012) ER stress-mediated autophagy promotes Myc-dependent transformation and tumor growth. *The Journal of clinical investigation* **122**: 4621-4634

- Hatano M, Umemura M, Kimura N, Yamazaki T, Takeda H, Nakano H, Takahashi S, Takahashi Y (2013) The 5'-Untranslated Region Regulates ATF5 mRNA Stability via Nonsense-Mediated mRNA Decay in Response to Environmental Stress. *The FEBS journal*
- Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A (2009) A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nature cell biology* **11**: 1433-1437
- He C, Klionsky DJ (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual review of genetics* **43**: 67-93
- Hetz C, Glimcher LH (2009) Fine-tuning of the unfolded protein response: Assembling the IRE1alpha interactome. *Molecular cell* **35**: 551-561
- Hinnebusch AG (1988) Novel mechanisms of translational control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Genet* **4**: 169-174
- Hinnebusch AG (2005) Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annual review of microbiology* **59**: 407-450
- Holcik M, Sonenberg N (2005) Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 318-327
- Hoozemans JJ, van Haastert ES, Nijholt DA, Rozemuller AJ, Eikelenboom P, Scheper W (2009) The unfolded protein response is activated in pretangle neurons in Alzheimer's disease hippocampus. *Am J Pathol* **174**: 1241-1251
- Huang S, Houghton PJ (2001) Mechanisms of resistance to rapamycins. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* **4**: 378-391
- Hung CM, Garcia-Haro L, Sparks CA, Guertin DA (2012) mTOR-dependent cell survival mechanisms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**
- Hyatt SL, Aulak KS, Malandro M, Kilberg MS, Hatzoglou M (1997) Adaptive regulation of the cationic amino acid transporter-1 (Cat-1) in Fao cells. *The Journal of biological chemistry* **272**: 19951-19957
- Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, Mizushima N, Tanida I, Kominami E, Ohsumi M, Noda T, Ohsumi Y (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**: 488-492
- Inoki K, Corradetti MN, Guan KL (2005) Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nature genetics* **37**: 19-24
- Inoki K, Kim J, Guan KL (2012) AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annual review of pharmacology and toxicology* **52**: 381-400
- Inuzuka T, Yun BG, Ishikawa H, Takahashi S, Hori H, Matts RL, Ishimori K, Morishima I (2004) Identification of crucial histidines for heme binding in the N-terminal domain of the heme-regulated eIF2alpha kinase. *The Journal of biological chemistry* **279**: 6778-6782

Ishihara T, Hoshino T, Namba T, Tanaka K, Mizushima T (2007) Involvement of up-regulation of PUMA in non-steroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications* **356**: 711-717

Ishikawa H, Yun BG, Takahashi S, Hori H, Matts RL, Ishimori K, Morishima I (2002) NO-induced activation mechanism of the heme-regulated eIF2alpha kinase. *Journal of the American Chemical Society* **124**: 13696-13697

Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews Molecular cell biology* **11**: 113-127

Jacquel A, Obba S, Boyer L, Dufies M, Robert G, Gounon P, Lemichez E, Luciano F, Solary E, Auberger P (2012) Autophagy is required for CSF-1-induced macrophagic differentiation and acquisition of phagocytic functions. *Blood* **119**: 4527-4531

Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB, Thomas G (1997) Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *Embo J* **16**: 3693-3704.

Jefferson LS, Kimball SR (2003) Amino acids as regulators of gene expression at the level of mRNA translation. *The Journal of nutrition* **133**: 2046S-2051S

Jewell JL, Guan KL (2013) Nutrient signaling to mTOR and cell growth. *Trends in biochemical sciences* **38**: 233-242

Jewell JL, Russell RC, Guan KL (2013) Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nature reviews Molecular cell biology* **14**: 133-139

Jiang HY, Wek RC (2005) GCN2 phosphorylation of eIF2alpha activates NF-kappaB in response to UV irradiation. *The Biochemical journal* **385**: 371-380

Jin C, Kato K, Chimura T, Yamasaki T, Nakade K, Murata T, Li H, Pan J, Zhao M, Sun K, Chiu R, Ito T, Nagata K, Horikoshi M, Yokoyama KK (2006) Regulation of histone acetylation and nucleosome assembly by transcription factor JDP2. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 331-338

Jin C, Li H, Murata T, Sun K, Horikoshi M, Chiu R, Yokoyama KK (2002) JDP2, a repressor of AP-1, recruits a histone deacetylase 3 complex to inhibit the retinoic acid-induced differentiation of F9 cells. *Molecular and cellular biology* **22**: 4815-4826

Jin Z, Li Y, Pitti R, Lawrence D, Pham VC, Lill JR, Ashkenazi A (2009) Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell* **137**: 721-735

Jing K, Lim K (2012) Why is autophagy important in human diseases? *Experimental & molecular medicine* **44**: 69-72

Johansen T, Lamark T (2011) Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* **7**: 279-296

- Johnson CW, Melia TJ, Yamamoto A (2012) Modulating macroautophagy: a neuronal perspective. *Future medicinal chemistry* **4**: 1715-1731
- Joubert PE, Pombo Gregoire I, Meiffren G, Rabourdin-Combe C, Faure M (2011) [Autophagy and pathogens: <<Bon appetit Messieurs!>>]. *Medecine sciences : M/S* **27**: 41-47
- Joung I, Strominger JL, Shin J (1996) Molecular cloning of a phosphotyrosine-independent ligand of the p56lck SH2 domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 5991-5995
- Jousse C, Deval C, Maurin AC, Parry L, Cherasse Y, Chaveroux C, Lefloch R, Lenormand P, Bruhat A, Fafournoux P (2007) TRB3 Inhibits the Transcriptional Activation of Stress-regulated Genes by a Negative Feedback on the ATF4 Pathway. *The Journal of biological chemistry* **282**: 15851-15861
- Jousse C, Oyadomari S, Novoa I, Lu P, Zhang Y, Harding HP, Ron D (2003) Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2alpha phosphatase, CREP, promotes survival of stressed cells. *The Journal of cell biology* **163**: 767-775
- Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH (2010) mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* **584**: 1287-1295
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo J* **19**: 5720-5728
- Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D (2011) The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell death and differentiation* **18**: 571-580
- Kara CJ, Liou HC, Ivashkiv LB, Glimcher LH (1990) A cDNA for a human cyclic AMP response element-binding protein which is distinct from CREB and expressed preferentially in brain. *Molecular and cellular biology* **10**: 1347-1357
- Karanam B, Wang L, Wang D, Liu X, Marmorstein R, Cotter R, Cole PA (2007) Multiple roles for acetylation in the interaction of p300 HAT with ATF-2. *Biochemistry* **46**: 8207-8216
- Kawai T, Matsumoto M, Takeda K, Sanjo H, Akira S (1998) ZIP kinase, a novel serine/threonine kinase which mediates apoptosis. *Molecular and cellular biology* **18**: 1642-1651
- Kawasaki H, Schiltz L, Chiu R, Itakura K, Taira K, Nakatani Y, Yokoyama KK (2000) ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation. *Nature* **405**: 195-200
- Kazemi S, Papadopoulou S, Li S, Su Q, Wang S, Yoshimura A, Matlashewski G, Dever TE, Koromilas AE (2004) Control of alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 alpha) phosphorylation by the human papillomavirus type 18 E6 oncoprotein: implications for eIF2 alpha-dependent gene expression and cell death. *Molecular and cellular biology* **24**: 3415-3429

- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* **26**: 239-257
- Kilberg MS, Shan J, Su N (2009) ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends Endocrinol Metab* **20**: 436-443
- 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
- Kimball SR (2001) Regulation of translation initiation by amino acids in eukaryotic cells. *Progress in molecular and subcellular biology* **26**: 155-184
- Kirkin V, McEwan DG, Novak I, Dikic I (2009) A role for ubiquitin in selective autophagy. *Molecular cell* **34**: 259-269
- Koban I, Matthes R, Hubner NO, Welk A, Sietmann R, Lademann J, Kramer A, Kocher T (2012) XTT assay of ex vivo saliva biofilms to test antimicrobial influences. *GMS Krankenhaushygiene interdisziplinär* **7**: Doc06
- Kojima E, Takeuchi A, Haneda M, Yagi A, Hasegawa T, Yamaki K, Takeda K, Akira S, Shimokata K, Isobe K (2003) The function of GADD34 is a recovery from a shutoff of protein synthesis induced by ER stress: elucidation by GADD34-deficient mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17**: 1573-1575
- Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, Sou YS, Ueno I, Sakamoto A, Tong KI, Kim M, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Ueno T, Kominami E, Motohashi H, Tanaka K, Yamamoto M (2010) The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nature cell biology* **12**: 213-223
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**: 880-884
- Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K (2007) Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* **131**: 1149-1163
- Kourtis N, Tavernarakis N (2009) Autophagy and cell death in model organisms. *Cell death and differentiation* **16**: 21-30
- Kozak M (1999) Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* **234**: 187-208
- Kraft C, Martens S (2012) Mechanisms and regulation of autophagosome formation. *Curr Opin Cell Biol* **24**: 496-501

- Krishnamoorthy T, Pavitt GD, Zhang F, Dever TE, Hinnebusch AG (2001) Tight binding of the phosphorylated alpha subunit of initiation factor 2 (eIF2alpha) to the regulatory subunits of guanine nucleotide exchange factor eIF2B is required for inhibition of translation initiation. *Molecular and cellular biology* **21**: 5018-5030
- Kroemer G, Marino G, Levine B (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* **40**: 280-293
- Kruger U, Wang Y, Kumar S, Mandelkow EM (2012) Autophagic degradation of tau in primary neurons and its enhancement by trehalose. *Neurobiology of aging* **33**: 2291-2305
- Krustev LP (1976) Cell autophagy of the liver in starvation and undernutrition. *Bibliotheca nutritio et dieta*: 145-154
- Lam D, Kosta A, Luciani MF, Golstein P (2008) The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is required to signal autophagic cell death. *Molecular biology of the cell* **19**: 691-700
- Lapaquette P, Glasser AL, Huett A, Xavier RJ, Darfeuille-Michaud A (2010) Crohn's disease-associated adherent-invasive E. coli are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cellular microbiology* **12**: 99-113
- Laplante M, Sabatini DM (2013) Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *Journal of cell science* **126**: 1713-1719
- Lavrik IN, Krammer PH (2012) Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell death and differentiation* **19**: 36-41
- Laybutt DR, Preston AM, Akerfeldt MC, Kench JG, Busch AK, Biankin AV, Biden TJ (2007) Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia* **50**: 752-763
- Lazorchak AS, Su B (2011) Perspectives on the role of mTORC2 in B lymphocyte development, immunity and tumorigenesis. *Protein & cell* **2**: 523-530
- Lee MN, Ha SH, Kim J, Koh A, Lee CS, Kim JH, Jeon H, Kim DH, Suh PG, Ryu SH (2009a) Glycolytic flux signals to mTOR through glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-mediated regulation of Rheb. *Molecular and cellular biology* **29**: 3991-4001
- Lee SH, Bahn JH, Whitlock NC, Baek SJ (2010) Activating transcription factor 2 (ATF2) controls tolfenamic acid-induced ATF3 expression via MAP kinase pathways. *Oncogene* **29**: 5182-5192
- Lee YY, Cevallos RC, Jan E (2009b) An upstream open reading frame regulates translation of GADD34 during cellular stresses that induce eIF2alpha phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **284**: 6661-6673
- Lemaire PA, Anderson E, Lary J, Cole JL (2008) Mechanism of PKR Activation by dsRNA. *Journal of molecular biology* **381**: 351-360

- Leng S, Hao Y, Du D, Xie S, Hong L, Gu H, Zhu X, Zhang J, Fan D, Kung HF (2013) Ursolic acid promotes cancer cell death by inducing Atg5-dependent autophagy. *International journal of cancer Journal international du cancer*
- Leung-Pineda V, Pan Y, Chen H, Kilberg MS (2004) Induction of p21 and p27 expression by amino acid deprivation of HepG2 human hepatoma cells involves mRNA stabilization. *The Biochemical journal* **379**: 79-88
- Levin DH, Petryshyn R, London IM (1980) Characterization of double-stranded-RNA-activated kinase that phosphorylates alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 (eIF-2 alpha) in reticulocyte lysates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**: 832-836
- Levine B (2007) Cell biology: autophagy and cancer. *Nature* **446**: 745-747
- Levine B, Deretic V (2007) Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nature reviews Immunology* **7**: 767-777
- Levine B, Kroemer G (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**: 27-42
- Levine B, Mizushima N, Virgin HW (2011) Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* **469**: 323-335
- Levine B, Ranganathan R (2010) Autophagy: Snapshot of the network. *Nature* **466**: 38-40
- Li DD, Wang LL, Deng R, Tang J, Shen Y, Guo JF, Wang Y, Xia LP, Feng GK, Liu QQ, Huang WL, Zeng YX, Zhu XF (2009) The pivotal role of c-Jun NH2-terminal kinase-mediated Beclin 1 expression during anticancer agents-induced autophagy in cancer cells. *Oncogene* **28**: 886-898
- Li XY, Green MR (1996) Intramolecular inhibition of activating transcription factor-2 function by its DNA-binding domain. *Genes & development* **10**: 517-527
- Liang C, Lee JS, Inn KS, Gack MU, Li Q, Roberts EA, Vergne I, Deretic V, Feng P, Akazawa C, Jung JU (2008) Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nature cell biology* **10**: 776-787
- Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **402**: 672-676
- Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G, Herman B, Levine B (1998) Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *Journal of virology* **72**: 8586-8596
- Lin YS, Green MR (1988) Interaction of a common cellular transcription factor, ATF, with regulatory elements in both E1a- and cyclic AMP-inducible promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 3396-3400
- Ling YM, Shaw MH, Ayala C, Coppens I, Taylor GA, Ferguson DJ, Yap GS (2006) Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. *The Journal of experimental medicine* **203**: 2063-2071

Liu CY, Kaufman RJ (2003) The unfolded protein response. *Journal of cell science* **116**: 1861-1862

Liu CY, Schroder M, Kaufman RJ (2000) Ligand-independent dimerization activates the stress response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* **275**: 24881-24885

Liu G, Bi Y, Wang R, Wang X (2013) Self-eating and self-defense: autophagy controls innate immunity and adaptive immunity. *Journal of leukocyte biology* **93**: 511-519

Liu HY, Han J, Cao SY, Hong T, Zhuo D, Shi J, Liu Z, Cao W (2009) Hepatic autophagy is suppressed in the presence of insulin resistance and hyperinsulinemia: inhibition of FoxO1-dependent expression of key autophagy genes by insulin. *The Journal of biological chemistry* **284**: 31484-31492

Liu W, Phang JM (2012) Proline dehydrogenase (oxidase), a mitochondrial tumor suppressor, and autophagy under the hypoxia microenvironment. *Autophagy* **8**: 1407-1409

Liu Y, Laszlo C, Liu W, Chen X, Evans SC, Wu S (2010) Regulation of G(1) arrest and apoptosis in hypoxia by PERK and GCN2-mediated eIF2alpha phosphorylation. *Neoplasia* **12**: 61-68

Lu W, Laszlo CF, Miao Z, Chen H, Wu S (2009) The role of nitric-oxide synthase in the regulation of UVB light-induced phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2. *The Journal of biological chemistry* **284**: 24281-24288

Luo S, Chen Q, Cebollero E, Xing D (2009) Mitochondria: one of the origins for autophagosomal membranes? *Mitochondrion* **9**: 227-231

Lynch-Day MA, Mao K, Wang K, Zhao M, Klionsky DJ (2012) The role of autophagy in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2**: a009357

Ma K, Vattem KM, Wek RC (2002) Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress. *The Journal of biological chemistry* **277**: 18728-18735

Maekawa T, Bernier F, Sato M, Nomura S, Singh M, Inoue Y, Tokunaga T, Imai H, Yokoyama M, Reimold A, Glimcher LH, Ishii S (1999) Mouse ATF-2 null mutants display features of a severe type of meconium aspiration syndrome. *The Journal of biological chemistry* **274**: 17813-17819

Maekawa T, Sakura H, Kanei-Ishii C, Sudo T, Yoshimura T, Fujisawa J, Yoshida M, Ishii S (1989) Leucine zipper structure of the protein CRE-BP1 binding to the cyclic AMP response element in brain. *Embo J* **8**: 2023-2028

Mah LY, O'Prey J, Baudot AD, Hoekstra A, Ryan KM (2012) DRAM-1 encodes multiple isoforms that regulate autophagy. *Autophagy* **8**: 18-28

- Maiuri MC, Malik SA, Morselli E, Kepp O, Criollo A, Mouchel PL, Carnuccio R, Kroemer G (2009) Stimulation of autophagy by the p53 target gene Sestrin2. *Cell Cycle* **8**: 1571-1576
- Malhi H, Kaufman RJ (2011) Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *Journal of hepatology* **54**: 795-809
- Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL, Schiaffino S, Sandri M (2007) FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab* **6**: 458-471
- Mammucari C, Schiaffino S, Sandri M (2008) Downstream of Akt: FoxO3 and mTOR in the regulation of autophagy in skeletal muscle. *Autophagy* **4**: 524-526
- Marten NW, Burke EJ, Hayden JM, Straus DS (1994) Effect of amino acid limitation on the expression of 19 genes in rat hepatoma cells. *Faseb J* **8**: 538-544
- Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E (2007) Role of autophagy in cancer. *Nature reviews Cancer* **7**: 961-967
- Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, Bray K, Reddy A, Bhanot G, Gelinas C, Dipaola RS, Karantza-Wadsworth V, White E (2009) Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* **137**: 1062-1075
- Mathew R, White E (2007) Why sick cells produce tumors: the protective role of autophagy. *Autophagy* **3**: 502-505
- Matsumoto G, Wada K, Okuno M, Kurosawa M, Nukina N (2011) Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Molecular cell* **44**: 279-289
- Matsumoto M, Minami M, Takeda K, Sakao Y, Akira S (1996) Ectopic expression of CHOP (GADD153) induces apoptosis in M1 myeloblastic leukemia cells. *FEBS letters* **395**: 143-147
- Maurin AC, 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 Metab* **1**: 273-277
- Maytin EV, Ubeda M, Lin JC, Habener JF (2001) Stress-inducible transcription factor CHOP/gadd153 induces apoptosis in mammalian cells via p38 kinase-dependent and -independent mechanisms. *Experimental cell research* **267**: 193-204
- McAlpine F, Williamson LE, Tooze SA, Chan EY (2013) Regulation of nutrient-sensitive autophagy by uncoordinated 51-like kinases 1 and 2. *Autophagy* **9**: 361-373
- McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ (2001) Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Molecular and cellular biology* **21**: 1249-1259
- Meijer AJ (2008) Amino acid regulation of autophagosome formation. *Methods Mol Biol* **445**: 89-109

- Meijer AJ, Codogno P (2009) Autophagy: regulation and role in disease. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* **46**: 210-240
- Melendez A, Levine B (2009) Autophagy in *C. elegans*. *WormBook : the online review of C elegans biology*: 1-26
- Meley D, Bauvy C, Houben-Weerts JH, Dubbelhuis PF, Helmond MT, Codogno P, Meijer AJ (2006) AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis. *The Journal of biological chemistry* **281**: 34870-34879
- Mellor HR, Harris AL (2007) The role of the hypoxia-inducible BH3-only proteins BNIP3 and BNIP3L in cancer. *Cancer metastasis reviews* **26**: 553-566
- Meng L, Mohan R, Kwok BH, Elofsson M, Sin N, Crews CM (1999) Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 10403-10408
- Mercer CA, Kaliappan A, Dennis PB (2009) A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy* **5**: 649-662
- Meyuhas O (2000) Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *European journal of biochemistry / FEBS* **267**: 6321-6330
- Millward J (1994) Can we define indispensable amino acid requirements and assess protein quality in adults? *J Nutr* **124**: 1509S-1516S
- Mizushima N (2007) Autophagy: process and function. *Genes Dev* **21**: 2861-2873
- Mizushima N, Klionsky DJ (2007) Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annual review of nutrition* **27**: 19-40
- Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y, Yoshimori T (2003) Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *Journal of cell science* **116**: 1679-1688
- Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T (2002) Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell structure and function* **27**: 421-429
- Montminy MR, Bilezikjian LM (1987) Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* **328**: 175-178
- Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Vicencio JM, Criollo A, Maiuri MC, Kroemer G (2009) Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochimica et biophysica acta* **1793**: 1524-1532
- Mortimore GE, Poso AR (1988) Amino acid control of intracellular protein degradation. *Methods in enzymology* **166**: 461-476

- Moscat J, Diaz-Meco MT (2012) p62: a versatile multitasker takes on cancer. *Trends in biochemical sciences* **37**: 230-236
- Mousavi SA, Kjekken R, Berg TO, Seglen PO, Berg T, Brech A (2001) Effects of inhibitors of the vacuolar proton pump on hepatic heterophagy and autophagy. *Biochimica et biophysica acta* **1510**: 243-257
- Munafò DB, Colombo MI (2002) Induction of autophagy causes dramatic changes in the subcellular distribution of GFP-Rab24. *Traffic* **3**: 472-482
- Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D, Mellor AL (2005) GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity* **22**: 633-642
- Naito T, Kuma A, Mizushima N (2013) Differential contribution of insulin and amino acids to the mTORC1-autophagy pathway in the liver and muscle. *The Journal of biological chemistry*
- Nameki N, Yoneyama M, Koshihara S, Tochio N, Inoue M, Seki E, Matsuda T, Tomo Y, Harada T, Saito K, Kobayashi N, Yabuki T, Aoki M, Nunokawa E, Matsuda N, Sakagami N, Terada T, Shirouzu M, Yoshida M, Hirota H, Osanai T, Tanaka A, Arakawa T, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Kinoshita K, Guntert P, Kigawa T, Yokoyama S (2004) Solution structure of the RWD domain of the mouse GCN2 protein. *Protein science : a publication of the Protein Society* **13**: 2089-2100
- Napetschnig J, Wu H (2013) Molecular basis of NF-kappaB signaling. *Annual review of biophysics* **42**: 443-468
- Nezis IP, Stenmark H (2012) p62 at the interface of autophagy, oxidative stress signaling, and cancer. *Antioxid Redox Signal* **17**: 786-793
- Ng S, Wu YT, Chen B, Zhou J, Shen HM (2011) Impaired autophagy due to constitutive mTOR activation sensitizes TSC2-null cells to cell death under stress. *Autophagy* **7**: 1173-1186
- Nguyen HT, Lapaquette P, Bringer MA, Darfeuille-Michaud A (2013) Autophagy and Crohn's Disease. *Journal of innate immunity*
- Nivon M, Richet E, Codogno P, Arrigo AP, Kretz-Remy C (2009) Autophagy activation by NFkappaB is essential for cell survival after heat shock. *Autophagy* **5**: 766-783
- Noble CG, Dong JM, Manser E, Song H (2008) Bcl-xL and UVRAG cause a monomer-dimer switch in Beclin1. *The Journal of biological chemistry* **283**: 26274-26282
- Nomura N, Zu YL, Maekawa T, Tabata S, Akiyama T, Ishii S (1993) Isolation and characterization of a novel member of the gene family encoding the cAMP response element-binding protein CRE-BP1. *The Journal of biological chemistry* **268**: 4259-4266
- Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D (2001) Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *The Journal of cell biology* **153**: 1011-1022

- Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Jungreis R, Harding HP, Ron D (2003) Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *Embo J* **22**: 1180-1187
- Nozaki J, Kubota H, Yoshida H, Naitoh M, Goji J, Yoshinaga T, Mori K, Koizumi A, Nagata K (2004) The endoplasmic reticulum stress response is stimulated through the continuous activation of transcription factors ATF6 and XBP1 in Ins2^{+/+}Akita pancreatic beta cells. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **9**: 261-270
- Ohsumi Y (2001) Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature reviews Molecular cell biology* **2**: 211-216
- Ohtsuki K, Nakamura M, Koike T, Ishida N, Baron S (1980) A ribosomal protein mediates eIF-2 phosphorylation by interferon-induced kinase. *Nature* **287**: 65-67
- Olanow CW (2007) The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease--2007. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* **22 Suppl 17**: S335-342
- Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, Gotoh T, Akira S, Araki E, Mori M (2002) Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *The Journal of clinical investigation* **109**: 525-532
- Palii SS, Kays CE, Deval C, Bruhat A, Fafournoux P, Kilberg MS (2009) Specificity of amino acid regulated gene expression: analysis of genes subjected to either complete or single amino acid deprivation. *Amino acids* **37**: 79-88
- Pan YX, Chen H, Thiaville MM, Kilberg MS (2007) Activation of the ATF3 gene through a coordinated amino acid-sensing response programme that controls transcriptional regulation of responsive genes following amino acid limitation. *Biochem J* **401**: 299-307
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *The Journal of biological chemistry* **282**: 24131-24145
- Paschen W, Gissel C, Linden T, Althausen S, Doutheil J (1998) Activation of gadd153 expression through transient cerebral ischemia: evidence that ischemia causes endoplasmic reticulum dysfunction. *Brain Res Mol Brain Res* **60**: 115-122
- Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **122**: 927-939
- Pei Y, Chen ZP, Ju HQ, Komatsu M, Ji YH, Liu G, Guo CW, Zhang YJ, Yang CR, Wang YF, Kitazato K (2011) Autophagy is involved in anti-viral activity of pentagalloylglucose (PGG) against Herpes simplex virus type 1 infection in vitro. *Biochemical and biophysical research communications* **405**: 186-191
- Peng T, Golub TR, Sabatini DM (2002) The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation. *Molecular and cellular biology* **22**: 5575-5584

Persengiev SP, Green MR (2003) The role of ATF/CREB family members in cell growth, survival and apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **8**: 225-228

Pietrocola F, Izzo V, Niso-Santano M, Vacchelli E, Galluzzi L, Maiuri MC, Kroemer G (2013) Regulation of autophagy by stress-responsive transcription factors. *Seminars in cancer biology*

Pike LR, Singleton DC, Buffa F, Abramczyk O, Phadwal K, Li JL, Simon AK, Murray JT, Harris AL (2013) Transcriptional up-regulation of ULK1 by ATF4 contributes to cancer cell survival. *The Biochemical journal* **449**: 389-400

Polager S, Ofir M, Ginsberg D (2008) E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. *Oncogene* **27**: 4860-4864

Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, Hughes PD, Michalak EM, McKimm-Breschkin J, Motoyama N, Gotoh T, Akira S, Bouillet P, Strasser A (2007) ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* **129**: 1337-1349

Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G, Levine B (2003) Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *The Journal of clinical investigation* **112**: 1809-1820

Rafie-Kolpin M, Han AP, Chen JJ (2003) Autophosphorylation of threonine 485 in the activation loop is essential for attaining eIF2alpha kinase activity of HRI. *Biochemistry* **42**: 6536-6544

Ravikumar B, Rubinsztein DC (2004) Can autophagy protect against neurodegeneration caused by aggregate-prone proteins? *Neuroreport* **15**: 2443-2445

Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC, Menzies FM, Moreau K, Narayanan U, Renna M, Siddiqi FH, Underwood BR, Winslow AR, Rubinsztein DC (2010) Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* **90**: 1383-1435

Reimold AM, Grusby MJ, Kosaras B, Fries JW, Mori R, Maniwa S, Clauss IM, Collins T, Sidman RL, Glimcher MJ, Glimcher LH (1996) Chondrodysplasia and neurological abnormalities in ATF-2-deficient mice. *Nature* **379**: 262-265

Robert G, Gastaldi C, Puissant A, Hamouda A, Jacquelin A, Dufies M, Belhacene N, Colosetti P, Reed JC, Auberger P, Luciano F (2012) The anti-apoptotic Bcl-B protein inhibits BECN1-dependent autophagic cell death. *Autophagy* **8**: 637-649

Rodriguez A, Duran A, Selloum M, Champy MF, Diez-Guerra FJ, Flores JM, Serrano M, Auwerx J, Diaz-Meco MT, Moscat J (2006) Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62. *Cell metabolism* **3**: 211-222

Romao S, Gannage M, Munz C (2013) Checking the garbage bin for problems in the house, or how autophagy assists in antigen presentation to the immune system. *Seminars in cancer biology*

- Ron D (2002) Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *The Journal of clinical investigation* **110**: 1383-1388
- Ron D, Habener JF (1992) CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes & development* **6**: 439-453
- Rouschop KM, van den Beucken T, Dubois L, Niessen H, Bussink J, Savelkoul K, Keulers T, Mujcic H, Landuyt W, Voncken JW, Lambin P, van der Kogel AJ, Koritzinsky M, Wouters BG (2010) The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest* **120**: 127-141
- Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J (2004) Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 13489-13494
- Rubinsztein DC, Shpilka T, Elazar Z (2012) Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Current biology : CB* **22**: R29-34
- Rupniewska Z, Bojarska-Junak A (2004) [Apoptosis: mitochondrial membrane permeabilization and the role played by Bcl-2 family proteins]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **58**: 538-547
- Ryder CB, McColl K, Distelhorst CW (2013) Acidosis blocks CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP)- and c-Jun-mediated induction of p53-upregulated mediator of apoptosis (PUMA) during amino acid starvation. *Biochemical and biophysical research communications* **430**: 1283-1288
- Ryter SW, Cloonan SM, Choi AM (2013) Autophagy: A critical regulator of cellular metabolism and homeostasis. *Molecules and cells*
- Rzyski T, Milani M, Pike L, Buffa F, Mellor HR, Winchester L, Pires I, Hammond E, Ragoussis I, Harris AL (2010) Regulation of autophagy by ATF4 in response to severe hypoxia. *Oncogene* **29**: 4424-4435
- Salih DA, Brunet A (2008) FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Current opinion in cell biology* **20**: 126-136
- Sanchez P, De Carcer G, Sandoval IV, Moscat J, Diaz-Meco MT (1998) Localization of atypical protein kinase C isoforms into lysosome-targeted endosomes through interaction with p62. *Molecular and cellular biology* **18**: 3069-3080
- Sankari SL, Masthan KM, Babu NA, Bhattacharjee T, Elumalai M (2012) Apoptosis in cancer--an update. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* **13**: 4873-4878
- Sarbassov DD, Sabatini DM (2005) Redox regulation of the nutrient-sensitive raptor-mTOR pathway and complex. *The Journal of biological chemistry* **280**: 39505-39509

- Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA, Di Malta C, Donaudy F, Embrione V, Polishchuk RS, Banfi S, Parenti G, Cattaneo E, Ballabio A (2009) A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* **325**: 473-477
- Sarkar S, Rubinsztein DC (2006) Inositol and IP3 levels regulate autophagy: biology and therapeutic speculations. *Autophagy* **2**: 132-134
- Sato M, Sato K (2013) Dynamic regulation of autophagy and endocytosis for cell remodeling during early development. *Traffic* **14**: 479-486
- Scarlatti F, Bauvy C, Ventruti A, Sala G, Cluzeaud F, Vandewalle A, Ghidoni R, Codogno P (2004) Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. *The Journal of biological chemistry* **279**: 18384-18391
- Schlottmann S, Buback F, Stahl B, Meierhenrich R, Walter P, Georgieff M, Senftleben U (2008) Prolonged classical NF-kappaB activation prevents autophagy upon E. coli stimulation in vitro: a potential resolving mechanism of inflammation. *Mediators of inflammation* **2008**: 725854
- Schwartz LM, Smith SW, Jones ME, Osborne BA (1993) Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 980-984
- Schweichel JU, Merker HJ (1973) The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* **7**: 253-266
- Scott PH, Brunn GJ, Kohn AD, Roth RA, Lawrence JC, Jr. (1998) Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 7772-7777
- Seca H, Lima RT, Lopes-Rodrigues V, Guimaraes JE, Almeida GM, Vasconcelos MH (2013) Targeting miR-21 Induces Autophagy and Chemosensitivity of Leukemia Cells. *Current drug targets*
- Seibenhener ML, Geetha T, Wooten MW (2007) Sequestosome 1/p62--more than just a scaffold. *FEBS Lett* **581**: 175-179
- Sengupta A, Molkentin JD, Yutzey KE (2009) FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry* **284**: 28319-28331
- Settembre C, Ballabio A (2011) TFEB regulates autophagy: an integrated coordination of cellular degradation and recycling processes. *Autophagy* **7**: 1379-1381
- Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Garcia Arencibia M, Vetrini F, Erdin S, Erdin SU, Huynh T, Medina D, Colella P, Sardiello M, Rubinsztein DC, Ballabio A (2011) TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* **332**: 1429-1433
- Settembre C, Fraldi A, Medina DL, Ballabio A (2013) Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nature reviews Molecular cell biology* **14**: 283-296

- Shah OJ, Anthony JC, Kimball SR, Jefferson LS (2000) 4E-BP1 and S6K1: translational integration sites for nutritional and hormonal information in muscle. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* **279**: E715-729
- Shaw RJ (2009) LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol (Oxf)* **196**: 65-80
- Shaw RJ, Bardeesy N, Manning BD, Lopez L, Kosmatka M, DePinho RA, Cantley LC (2004) The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer cell* **6**: 91-99
- Shen HM, Codogno P (2011) Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy* **7**: 457-465
- Shen X, Zhang K, Kaufman RJ (2004) The unfolded protein response--a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J Chem Neuroanat* **28**: 79-92
- Shimazawa M, Inokuchi Y, Ito Y, Murata H, Aihara M, Miura M, Araie M, Hara H (2007) Involvement of ER stress in retinal cell death. *Molecular vision* **13**: 578-587
- Shpilka T, Mizushima N, Elazar Z (2012) Ubiquitin-like proteins and autophagy at a glance. *J Cell Sci* **125**: 2343-2348
- Shpilka T, Weidberg H, Pietrokovski S, Elazar Z (2011) Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome biology* **12**: 226
- Simonsen A, Tooze SA (2009) Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *The Journal of cell biology* **186**: 773-782
- Sini P, James D, Chresta C, Guichard S (2010) Simultaneous inhibition of mTORC1 and mTORC2 by mTOR kinase inhibitor AZD8055 induces autophagy and cell death in cancer cells. *Autophagy* **6**: 553-554
- Siu F, Bain PJ, LeBlanc-Chaffin R, Chen H, Kilberg MS (2002) ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. *The Journal of biological chemistry* **277**: 24120-24127.
- Sofer A, Lei K, Johannessen CM, Ellisen LW (2005) Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Molecular and cellular biology* **25**: 5834-5845
- Sok J, Wang XZ, Batchvarova N, Kuroda M, Harding H, Ron D (1999) CHOP-Dependent stress-inducible expression of a novel form of carbonic anhydrase VI. *Molecular and cellular biology* **19**: 495-504
- Sokka AL, Putkonen N, Mudo G, Pryazhnikov E, Reijonen S, Khiroug L, Belluardo N, Lindholm D, Korhonen L (2007) Endoplasmic reticulum stress inhibition protects against excitotoxic neuronal injury in the rat brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**: 901-908

- Son JH, Shim JH, Kim KH, Ha JY, Han JY (2012) Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Experimental & molecular medicine* **44**: 89-98
- Song ZC, Zhou W, Shu R, Ni J (2012) Hypoxia induces apoptosis and autophagic cell death in human periodontal ligament cells through HIF-1 α pathway. *Cell proliferation* **45**: 239-248
- Sou YS, Tanida I, Komatsu M, Ueno T, Kominami E (2006) Phosphatidylserine in addition to phosphatidylethanolamine is an in vitro target of the mammalian Atg8 modifiers, LC3, GABARAP, and GATE-16. *The Journal of biological chemistry* **281**: 3017-3024
- Souba WW, Smith RJ, Wilmore DW (1985) Glutamine metabolism by the intestinal tract. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition* **9**: 608-617
- Sowa H, Karsenty G (2007) ATF4 is a key molecule linking food intake and skeletal development. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* **7**: 326-327
- Straus DS, Burke EJ, Marten NW (1993) Induction of insulin-like growth factor binding protein-1 gene expression in liver of protein-restricted rats and in rat hepatoma cells limited for a single amino acid. *Endocrinology* **132**: 1090-1100
- Su N, Kilberg MS (2008) C/EBP homology protein (CHOP) interacts with activating transcription factor 4 (ATF4) and negatively regulates the stress-dependent induction of the asparagine synthetase gene. *The Journal of biological chemistry* **283**: 35106-35117
- Sullivan WJ, Jr., Narasimhan J, Bhatti MM, Wek RC (2004) Parasite-specific eIF2 (eukaryotic initiation factor-2) kinase required for stress-induced translation control. *The Biochemical journal* **380**: 523-531
- Sumpter R, Jr., Levine B (2011) Selective autophagy and viruses. *Autophagy* **7**: 260-265
- Sun SY (2013) mTOR kinase inhibitors as potential cancer therapeutic drugs. *Cancer letters*
- Sun T, Li D, Wang L, Xia L, Ma J, Guan Z, Feng G, Zhu X (2011) c-Jun NH2-terminal kinase activation is essential for up-regulation of LC3 during ceramide-induced autophagy in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Journal of translational medicine* **9**: 161
- Sun X, Liu J, Crary JF, Malagelada C, Sulzer D, Greene LA, Levy OA (2013) ATF4 protects against neuronal death in cellular Parkinson's disease models by maintaining levels of parkin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **33**: 2398-2407
- Sundrud MS, Koralov SB, Feuerer M, Calado DP, Kozhaya AE, Rhule-Smith A, Lefebvre RE, Unutmaz D, Mazitschek R, Waldner H, Whitman M, Keller T, Rao A (2009) Halofuginone inhibits TH17 cell differentiation by activating the amino acid starvation response. *Science* **324**: 1334-1338
- Suzuki T, Inoki K (2011) Spatial regulation of the mTORC1 system in amino acids sensing pathway. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **43**: 671-679
- Sylvester SL, ap Rhys CM, Luethy-Martindale JD, Holbrook NJ (1994) Induction of GADD153, a CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-related gene, during the acute phase response in

rats. Evidence for the involvement of C/EBPs in regulating its expression. *The Journal of biological chemistry* **269**: 20119-20125

Tang H, Da L, Mao Y, Li Y, Li D, Xu Z, Li F, Wang Y, Tiollais P, Li T, Zhao M (2009) Hepatitis B virus X protein sensitizes cells to starvation-induced autophagy via up-regulation of beclin 1 expression. *Hepatology* **49**: 60-71

Tang QQ, Lane MD (2000) Role of C/EBP homologous protein (CHOP-10) in the programmed activation of CCAAT/enhancer-binding protein-beta during adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 12446-12450

Tasdemir E, Chiara Maiuri M, Morselli E, Criollo A, D'Amelio M, Djavaheri-Mergny M, Cecconi F, Tavernarakis N, Kroemer G (2008a) A dual role of p53 in the control of autophagy. *Autophagy* **4**: 810-814

Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, Criollo A, Morselli E, Zhu C, Harper F, Nannmark U, Samara C, Pinton P, Vicencio JM, Carnuccio R, Moll UM, Madeo F, Paterlini-Brechot P, Rizzuto R, Szabadkai G, Pierron G, Blomgren K, Tavernarakis N, Codogno P, Cecconi F, Kroemer G (2008b) Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nature cell biology* **10**: 676-687

Teske BF, Wek SA, Bunpo P, Cundiff JK, McClintick JN, Anthony TG, Wek RC (2011) The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress. *Molecular biology of the cell* **22**: 4390-4405

Tomek M, Akiyama T, Dass CR (2012) Role of Bcl-2 in tumour cell survival and implications for pharmacotherapy. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **64**: 1695-1702

Tumbarello DA, Waxse BJ, Arden SD, Bright NA, Kendrick-Jones J, Buss F (2012) Autophagy receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome. *Nature cell biology* **14**: 1024-1035

Ubeda M, Vallejo M, Habener JF (1999) CHOP enhancement of gene transcription by interactions with Jun/Fos AP-1 complex proteins [In Process Citation]. *Molecular and cellular biology* **19**: 7589-7599

Vakana E, Sassano A, Plataniias LC (2010) Induction of autophagy by dual mTORC1-mTORC2 inhibition in BCR-ABL-expressing leukemic cells. *Autophagy* **6**: 966-967

Vallejo M, Ron D, Miller CP, Habener JF (1993) C/ATF, a member of the activating transcription factor family of DNA-binding proteins, dimerizes with CAAT/enhancer-binding proteins and directs their binding to cAMP response elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 4679-4683

Vattem KM, Wek RC (2004) Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 11269-11274

- Vlahopoulos SA, Logotheti S, Mikas D, Giarika A, Gorgoulis V, Zoumpourlis V (2008) The role of ATF-2 in oncogenesis. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **30**: 314-327
- Walls KC, Ghosh AP, Franklin AV, Klocke BJ, Ballestas M, Shacka JJ, Zhang J, Roth KA (2010) Lysosome dysfunction triggers Atg7-dependent neural apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **285**: 10497-10507
- Wang C, Xia T, Du Y, Meng Q, Li H, Liu B, Chen S, Guo F (2013) Effects of ATF4 on PGC1alpha expression in brown adipose tissue and metabolic responses to cold stress. *Metabolism: clinical and experimental* **62**: 282-289
- Wang X, Wang B, Fan Z, Shi X, Ke ZJ, Luo J (2007) Thiamine deficiency induces endoplasmic reticulum stress in neurons. *Neuroscience* **144**: 1045-1056
- Wang XZ, Kuroda M, Sok J, Batchvarova N, Kimmel R, Chung P, Zinszner H, Ron D (1998) Identification of novel stress-induced genes downstream of chop. *Embo J* **17**: 3619-3630
- Watanabe R, Tambe Y, Inoue H, Isono T, Haneda M, Isobe K, Kobayashi T, Hino O, Okabe H, Chano T (2007) GADD34 inhibits mammalian target of rapamycin signaling via tuberous sclerosis complex and controls cell survival under bioenergetic stress. *International journal of molecular medicine* **19**: 475-483
- Webb JL, Ravikumar B, Rubinsztein DC (2004) Microtubule disruption inhibits autophagosome-lysosome fusion: implications for studying the roles of aggresomes in polyglutamine diseases. *The international journal of biochemistry & cell biology* **36**: 2541-2550
- Wethmar K, Smink JJ, Leutz A (2010) Upstream open reading frames: molecular switches in (patho)physiology. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **32**: 885-893
- White E (2012) Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nature reviews Cancer* **12**: 401-410
- Whitney ML, Jefferson LS, Kimball SR (2009) ATF4 is necessary and sufficient for ER stress-induced upregulation of REDD1 expression. *Biochemical and biophysical research communications* **379**: 451-455
- Wong AH, Durbin JE, Li S, Dever TE, Decker T, Koromilas AE (2001) Enhanced antiviral and antiproliferative properties of a STAT1 mutant unable to interact with the protein kinase PKR. *The Journal of biological chemistry* **276**: 13727-13737
- Wong PM, Puente C, Ganley IG, Jiang X (2013) The ULK1 complex: sensing nutrient signals for autophagy activation. *Autophagy* **9**: 124-137
- Wu YT, Ouyang W, Lazorchak AS, Liu D, Shen HM, Su B (2011) mTOR complex 2 targets Akt for proteasomal degradation via phosphorylation at the hydrophobic motif. *The Journal of biological chemistry* **286**: 14190-14198

- Wu YT, Tan HL, Huang Q, Ong CN, Shen HM (2009) Activation of the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway promotes necrotic cell death via suppression of autophagy. *Autophagy* **5**: 824-834
- Wytenbach A, Hands S, King MA, Lipkow K, Tolkovsky AM (2008) Amelioration of protein misfolding disease by rapamycin: translation or autophagy? *Autophagy* **4**: 542-545
- Xavier RJ, Huett A, Rioux JD (2008) Autophagy as an important process in gut homeostasis and Crohn's disease pathogenesis. *Gut* **57**: 717-720
- Xia HG, Zhang L, Chen G, Zhang T, Liu J, Jin M, Ma X, Ma D, Yuan J (2010) Control of basal autophagy by calpain1 mediated cleavage of ATG5. *Autophagy* **6**: 61-66
- Yamaguchi H, Wang HG (2004) CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry* **279**: 45495-45502
- Yaman I, Fernandez J, Sarkar B, Schneider RJ, Snider MD, Nagy LE, Hatzoglou M (2002) Nutritional control of mRNA stability is mediated by a conserved AU-rich element that binds the cytoplasmic shuttling protein HuR. *The Journal of biological chemistry* **277**: 41539-41546
- Yang JW, Zhu LX, Yuan GH, Chen YX, Zhang L, Chen Z (2013) Autophagy appears during the development of the mouse lower first molar. *Histochemistry and cell biology* **139**: 109-118
- Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS (2010) Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell metabolism* **11**: 467-478
- Ye J, Kumanova M, Hart LS, Sloane K, Zhang H, De Panis DN, Bobrovnikova-Marjon E, Diehl JA, Ron D, Koumenis C (2010) The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *Embo J* **29**: 2082-2096
- Yla-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL (2009) 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* **5**: 1180-1185
- Yordy B, Iijima N, Huttner A, Leib D, Iwasaki A (2012) A neuron-specific role for autophagy in antiviral defense against herpes simplex virus. *Cell host & microbe* **12**: 334-345
- Young VR (1998) Human amino acid requirements: counterpoint to Millward and the importance of tentative revised estimates. *The Journal of nutrition* **128**: 1570-1573
- Young VR, El-Khoury AE, Melchor S, Castillo L (1994) The biochemistry and physiology of protein and amino acid metabolism, with reference to protein nutrition. In *Protein Metabolism During Infancy*, Niels CRR (ed), Vol. 33, pp 1-28. New York: Nestec Ltd., Vevey/ Raven Press, Ltd.
- Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, Brunner T, Simon HU (2006) Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nature cell biology* **8**: 1124-1132

- Yu L, Lenardo MJ, Baehrecke EH (2004) Autophagy and caspases: a new cell death program. *Cell Cycle* **3**: 1124-1126
- Yu L, Wan F, Dutta S, Welsh S, Liu Z, Freundt E, Baehrecke EH, Lenardo M (2006) Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 4952-4957
- Yuk JM, Shin DM, Lee HM, Yang CS, Jin HS, Kim KK, Lee ZW, Lee SH, Kim JM, Jo EK (2009) Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. *Cell host & microbe* **6**: 231-243
- Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, Gonzalez FJ, Semenza GL (2008) Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *The Journal of biological chemistry* **283**: 10892-10903
- Zhang M, Chen L, Wang S, Wang T (2009) Rab7: roles in membrane trafficking and disease. *Bioscience reports* **29**: 193-209
- Zhang P, McGrath BC, Reinert J, Olsen DS, Lei L, Gill S, Wek SA, Vattem KM, Wek RC, Kimball SR, Jefferson LS, Cavener DR (2002) The GCN2 eIF2alpha kinase is required for adaptation to amino acid deprivation in mice. *Molecular and cellular biology* **22**: 6681-6688
- Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL (2007) FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab* **6**: 472-483
- Zhao M, Klionsky DJ (2011) AMPK-dependent phosphorylation of ULK1 induces autophagy. *Cell metabolism* **13**: 119-120
- Zhong C, Chen C, Kilberg MS (2003) Characterization of the nutrient-sensing response unit in the human asparagine synthetase promoter. *Biochem J* **372**: 603-609
- Zhong Y, Wang QJ, Li X, Yan Y, Backer JM, Chait BT, Heintz N, Yue Z (2009) Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nature cell biology* **11**: 468-476
- Zhou D, Palam LR, Jiang L, Narasimhan J, Staschke KA, Wek RC (2008) Phosphorylation of eIF2 directs ATF5 translational control in response to diverse stress conditions. *The Journal of biological chemistry* **283**: 7064-7073
- Zhou L, Liu F (2010) Autophagy: roles in obesity-induced ER stress and adiponectin downregulation in adipocytes. *Autophagy* **6**: 1196-1197
- Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J (2011) A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **469**: 221-225
- Zhu H, Wu H, Liu X, Li B, Chen Y, Ren X, Liu CG, Yang JM (2009) Regulation of autophagy by a beclin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells. *Autophagy* **5**: 816-823

Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D (1998) CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* **12**: 982-995

Résumé

Chez les mammifères, les carences nutritionnelles telles que les carences en acides aminés constituent un stress nutritionnel important. Pour faire face à ces situations, l'organisme dispose de processus adaptatifs tels que l'autophagie, régulés par de multiples voies de signalisation. Au niveau cellulaire, plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la régulation de ces processus adaptatifs qui permettent la survie cellulaire lors de différentes conditions de stress environnementaux y compris la carence en acides aminés. En particulier, la voie eIF2 α /ATF4 joue un rôle crucial dans l'adaptation des cellules à ces différents stress notamment en régulant la transcription de nombreux gènes cibles spécifiques.

L'objectif de ce travail était donc de déterminer le rôle de la voie eIF2 α /ATF4 dans la régulation de la transcription des gènes impliqués dans l'autophagie en réponse à carence en acides aminés. En utilisant p62 comme un modèle de travail, nous avons montré que la kinase GCN2 qui phosphoryle eIF2 α et les facteurs de transcription ATF4 et CHOP jouent un rôle clé dans la régulation de la transcription d'un grand nombre de gènes impliqués dans le processus autophagique en réponse à une carence en acides aminés. Nous avons en particulier identifié trois classes de gènes de l'autophagie selon leur dépendance à ATF4 et CHOP et la liaison de ces facteurs sur les éléments spécifiques de leurs promoteurs en fonction de l'intensité du stress. Plus généralement, nous avons démontré que ce mécanisme pouvait également être activé par la kinase PERK lors d'un stress du réticulum endoplasmique.

Enfin, nous avons pu montrer que durant les six premières heures de la carence en acides aminés, la voie eIF2 α /ATF4/CHOP n'est pas impliquée dans la diminution de la viabilité cellulaire. Cependant, lorsque la carence en acides aminés est prolongée (16-48h), CHOP joue un rôle clé dans la régulation de l'apoptose et dans la répression du processus autophagique en contrôlant la transcription des gènes cibles spécifiques.

Ainsi, ce travail a permis de mettre en évidence qu'en cas de carence en acides aminés, la voie eIF2 α /ATF4/CHOP joue un rôle clé dans le devenir de la cellule. En fonction de la durée et de l'intensité du stress, la régulation très coordonnée de ces mécanismes moléculaires va permettre successivement la survie de la cellule et ensuite l'apoptose.

Mots clé : Stress cellulaire, Autophagie, Apoptose, ATF4, CHOP, Transcription

Abstract

In mammals, nutritional deficiencies such as amino acid limitation are an important nutritional stress. To deal with these situations, the body has adaptive processes such as autophagy regulated by multiple signaling pathways. At the cellular level, several signaling pathways are involved in the regulation of these adaptive processes that allow cell survival in different conditions of environmental stress, including amino acid deficiency. In particular, the eIF2 α /ATF4 pathway plays a crucial role in the adaptation of these cells to various stresses such as the transcriptional regulation of many specific target genes.

The aim of this work was to identify the role of the eIF2 α /ATF4 pathway in the stress-regulated transcription of mammalian autophagy genes. Using p62 as a working model, we have shown that the GCN2 eIF2 α -kinase and ATF4 and CHOP transcription factors are required to increase transcription of a set of autophagy genes implicated in the formation, elongation and function of the autophagosome. We also identify three classes of autophagy genes according to their dependence on ATF4 and CHOP and the binding of these factors to specific promoter cis elements. Furthermore, different combinations of CHOP and ATF4 bindings to target promoters allow the trigger of a differential transcriptional response according to the stress intensity. Furthermore, we have demonstrated that the same mechanism can also be activated by ER stress through PERK eIF2 α -kinase activation.

We also show that during the first 6h of starvation, CHOP up-regulates a number of autophagy genes while cell viability is not affected. By contrast, when the amino acid starvation is prolonged (16-48h), we demonstrated that CHOP has a dual role in both limiting autophagy and inducing apoptosis through the transcriptional activation of specific target genes.

Thus, this work establishes that following amino acid starvation, the eIF2 α /ATF4 pathway plays a key role in the cell fate. Depending on the duration and intensity of the stress, the highly coordinated regulation of these molecular mechanisms sequentially will allow the survival of the cell and subsequently apoptosis

Keywords : cellular stress, autophagy, Apoptosis, ATF4, CHOP, transcription