



HAL
open science

Acides aminés et cancer : LAT1, un transporteur essentiel à l'activité mTORC1 et la croissance tumorale

Yann Cormerais

► **To cite this version:**

Yann Cormerais. Acides aminés et cancer : LAT1, un transporteur essentiel à l'activité mTORC1 et la croissance tumorale. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2016. Français. NNT : 2016NICE4047 . tel-01552286v2

HAL Id: tel-01552286

<https://theses.hal.science/tel-01552286v2>

Submitted on 7 Jul 2017

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.

MEMOIRE DE THESE

Présenté pour l'obtention du titre de :

Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Interactions Moléculaires et Cellulaires

Yann CORMERAIS

Acides Aminés et Cancer

**LAT1, un transporteur essentiel à l'activité de
mTORC1 et la croissance tumorale**



Thèse soutenue publiquement le 22 juillet 2016 à 14h30,
au Centre Scientifique de Monaco, devant un jury composé de :

Pr. Denis ALLEMAND

Président

Dr. Pierre FAFOURNOUX

Rapporteur

Pr. François VERREY

Rapporteur

Dr. George THOMAS

Examineur

Dr. Nathalie MAZURE

Directeur de thèse

Dr. Jacques POUYSSEGUR

Directeur de thèse

Table des matières

INTRODUCTION	1
Chapitre I : mTOR le chef d'orchestre de la croissance cellulaire	1
1. Rapamycine et mTOR.....	2
2. mTOR : une kinase, deux complexes	3
2.1. Le complexe mTORC1	3
2.2. Le complexe mTORC2	4
3. Régulation de la voie mTOR	5
3.1. Régulation de mTORC1	6
3.1.1. Le complexe TSC, carrefour sensitif de la voie mTORC1	6
3.1.2. Acides aminés et lysosome	6
3.1.3. Les facteurs de croissance.....	11
3.1.4. AMPK et le statut énergétique	12
3.1.5. REDD1 et stress cellulaire	13
3.2. Régulation de mTORC2	14
4. Fonctions cellulaires de la voie mTOR.....	15
4.1. Rôles de mTORC1	15
4.1.1. Régulation de la synthèse protéique.....	15
4.1.2. Régulation de la lipogenèse	17
4.1.3. Régulation de la synthèse nucléotidique	19
4.1.4. Régulation du métabolisme énergétique.....	20
4.1.5. Régulation du catabolisme.....	21
4.2. Rôles de mTORC2	24
4.2.1. Régulation de la survie et de la prolifération cellulaire	24
4.2.2. Remodelage du cytosquelette.....	25
4.2.3. Régulation de la synthèse lipidique	25
4.2.4. Régulation de la « <i>Chaperone-Mediated-Autophagy</i> ».....	26
5. mTOR et Cancer	26
5.1. Activation oncogénique de la voie mTOR.....	26
5.2. mTOR et progression tumorale	28
5.3. mTOR en tant que cible thérapeutique	28

Chapitre II : Homéostasie de acides aminés et développement tumoral.....	32
1. Acides aminés et développement tumoral.....	33
1.1. Généralités	33
2. Transporteurs d'acides aminés surexprimés dans les cancers	34
2.1. ASCT2 (SLC1A5).....	34
2.2. LAT1 (SLC7A5)	37
2.3. xCT (SLC7A11)	39
2.4. Le transport des acides aminés : une action collaborative	43
2.5. Utilisation des transporteurs d'acides aminés comme transporteurs de molécules thérapeutiques.....	44
3. Adaptation tumorale à une carence en acides aminés	45
3.1. L'ISR (<i>Integrated Stress Response</i>).....	45
3.1.1. GCN2 et homéostasie des acides aminés.....	46
3.1.2. eIF2 et régulation de la traduction	47
3.1.3. eIF2 et traduction spécifique des protéines de stress.....	48
3.1.3.1. ATF4.....	45
3.1.3.2. CHOP et GADD34.....	50
3.1.4. GCN2 et développement tumoral	51
3.2. mTORC1 et carence en acides aminés.....	53
3.3. Interaction entre GCN2 et mTORC1.....	54
RESULTATS	58
Publication	59
Contexte et objectif de la recherche.....	59
Résultats et conclusions	60
Projet en cours	62
Contexte et objectif de la recherche.....	62
Matériels et Méthodes.....	62
Résultats et conclusions	63
DISCUSSION & PERSPECTIVES	68
REFERENCES	78

ANNEXES 115

1. Resistance to sunitinib in renal clear cell carcinoma results from sequestration in lysosomes and inhibition of the autophagic flux.
2. Hypoxia optimizes tumour growth by controlling nutrient import and acidic metabolite export
3. An evolutionarily conserved role for the MAP Kinase JNK in the prevention of adverse ROS production in early response to UV and thermal stresses

Liste des Abréviations

A

αKG: *α-KetoGlutarate*

AMPK: *AMP-dependent protein Kinase*

ARE: *Antioxidant Response Element*

ASCT2: *Alanine Serine Cystéine Transporter 2*

ASNS: *Asparagine Synthetase*

ATF4: *Activating Transcription Factor 4*

ATGL: *Adipose triglyceride lipase*

ATM: *Ataxia Telangiectasia Mutated*

ATR: *Ataxia Telangiectasia and Rad3 related*

ATP: *Adénosine Triphosphate*

C

CAD: *Carbamoyl-phosphate synthetase 2, Aspartate transcarbamylase and Dihydro-
orotase*

CARE: *C/EBP-ATF Response Element*

CHOP: *C/EBP homology protein*

CMA: *Chaperone-Mediated-Autophagy*

CREB: *Cyclic AMP response Element Binding protein*

CTD: *Carboxy-Terminal Domain*

D

DAP1: *Death-Associated Protein 1*

Deptor: *Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin interacted with mTOR*

DNA-PKcs: *DNA dependent Protein Kinase catalytic subunit*

E

4E-BP1: *eiF4E-Binding Protein 1*

EGF: *Epithelial Growth Factor*

eiF: *Eukaryotic Initiation Factor*

Egr1: *Early Growth Respons 1*

ERK: *Extracellular signal Regulated Kinase*

Ets-1: *oncogene homolog-1*

F

FAT: *Focal Adhesion Targeting domain*

FATC: *FRAP, ATM, TRRAP C-terminal domain*

FDA: *Food and drug administration*

FoxO: *Forkhead box O transcription factors*

FRB: *FKBP12-Rapamycine Binding domain*

G

GAP: *Guanine triphosphate GTPase Activating Protein*

GCN2: *General Controlled Non-repressed 2*

GDH: *Glutamate DesHydrogenase*

GEF: *Guanine nucleotide Exchange Factor*

GFAP: *Glial Fibrillary Acidic Protein*

GLUT-1: *GLUcose Transporter 1*

G6PD: *Glucose 6 Phosphate Deshydrogénase*

GSK3 β : *Glycogen Synthase Kinase 3 β*

H

HEAT: *Huntingtin, elongation factor 3 (EF3), protein phosphatase 2A (PP2A), and the yeast kinase TOR1*

HIF1 α : *Hypoxia Inducible Factor 1 α*

HisRS-like: *Histidyl-tRNA Synthetase*

HO-1: *Heme Oxygenase-1*

HRI: *Heme-Regulated Inhibitor*

Hsc70: *Heat shock 70 kDa protein*

HSL: *Hormone Sensitive Lipase*

I

INSIG: *INSulin-Induced Gene protein*

ISR: *Integrated Stress Response*

J

JPC: *Jours Post-Coïtum*

K

KEAP1: *Kelch-like ECH-associated protein 1*

L

LAMP2A: *Lysosome-Associated Membrane Protein 2*

LAPTM4b: *Lysosomal Protein Transmembrane 4 Beta*

LAMTOR: *Lysosomal Adaptor and Mitogen-activated protein kinase and mammalian target of rapamycin [mTOR] activator/regulator*

LAT1: *L-type amino acid transporter 1*

LKB1: *Liver kinase B1*

LRS: *Leucyl-tRNA Synthetase*

M

MDR1: *Multi Drug Resistance 1*

MEF: *Mouse Embryonic Fibroblast*

mLST8: *Mammalian Lethal with sec-13*

mSIN1: *mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1*

mTOR: *Mammalian Target or Rapamycine*

N

NoR1: *Nuclear Receptor Corepressor 1*

NF1: *NeuroFibromatose 1*

NF- κ B: *Nuclear Factor-Kappa B*

NRF1: *Nuclear factor erythroid-derived 2 - Related Factor 1*

P

PABP: *Poly(A) Binding Protein*

PDCD4: *Programmed Cell Death 4*

PDGF: *Platelet Derived Growth Factor*

PDK-1: *Phosphoinositide Kinase 1*

PERK: *PKR-like ER kinase*

PGC1- α : *Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-alpha*

PHD: *ProlylHydroxylase Domain*

PI3K: *PhosphoInositide 3-Kinase*

PIKK: *PhosphoInositide-3-Kinase-related Kinases*

PIP3: *Phosphatidylinositol-3,4,5-bisPhosphate*

PKA: *Protein Kinase A*

PKC: *Protein Kinase C*

PKR: *Protein Kinase double-stranded RNA-dependent*

PP1c: *Protein Phosphatase 1c*

PPAR: *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*

PPP: *Pentoses PhosPhates*

PRAS40: *Proline-rich AKT1 substrate*

Protor-1: *Protein observed with rictor-1*

P90RSK: *p90 Ribosomal S6 Kinase*

PTEN: *Phosphatase and TENSin homolog*

R

RAGs: *Ras related GTPases*

Raptor: *Regulated Associated Protein of mTOR*

REDD1: *REgulated in Development and DNA damage responses*

Rheb: *Ras Homolog Enriched in Brain*

Rictor: *Rapamycin insensitive companion of mTOR*

ROS: *Reactive Oxygen Species*

RTK: *Receptor Tyrosine Kinase*

RWD: *RING finger proteins, WD-repeat-containing proteins, and yeast DEAD-like helicases*

S

SCAP: *SREBP Cleavage-Acting Protein*

(S)-4CPG: *(S)-4-CarboxylPhenyGlycine*

SGK1: *Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1*

S6K: *ribosomal S6 Kinase*

SLC6A14: *SoLute Carrier family 6 member 14*

SMG-1:

SNAT: *Sodium Neutral Amino acid Transporters*

S1P / S2P: *Site-1/2 Protease*

SREBPs: *Sterol Regulatory Element-Binding Proteins*

T

TAZ: *Transcriptional coActivator with PDZ-binding motif*

Tel2: *Telomere maintenance 2*

TFEB: *Transcription Factor EB*

5'TOP: *Terminal OligoPyrimidine tract*

TOS: *TOR Signalling*

TRAP: *Tryptophan-activated RNA binding Attenuation Protein*

TSC: *Tuberous Sclerosis Complex*

Tti1: *Tel Two Interacting protein 1*

U

ULK1: *Unc-51-Like Kinase 1*

X

xCT: *x- C-type transporter*

Y

YAP: *yes-associated protein*

INTRODUCTION

Chapitre I

mTOR : le chef d'orchestre de la croissance cellulaire

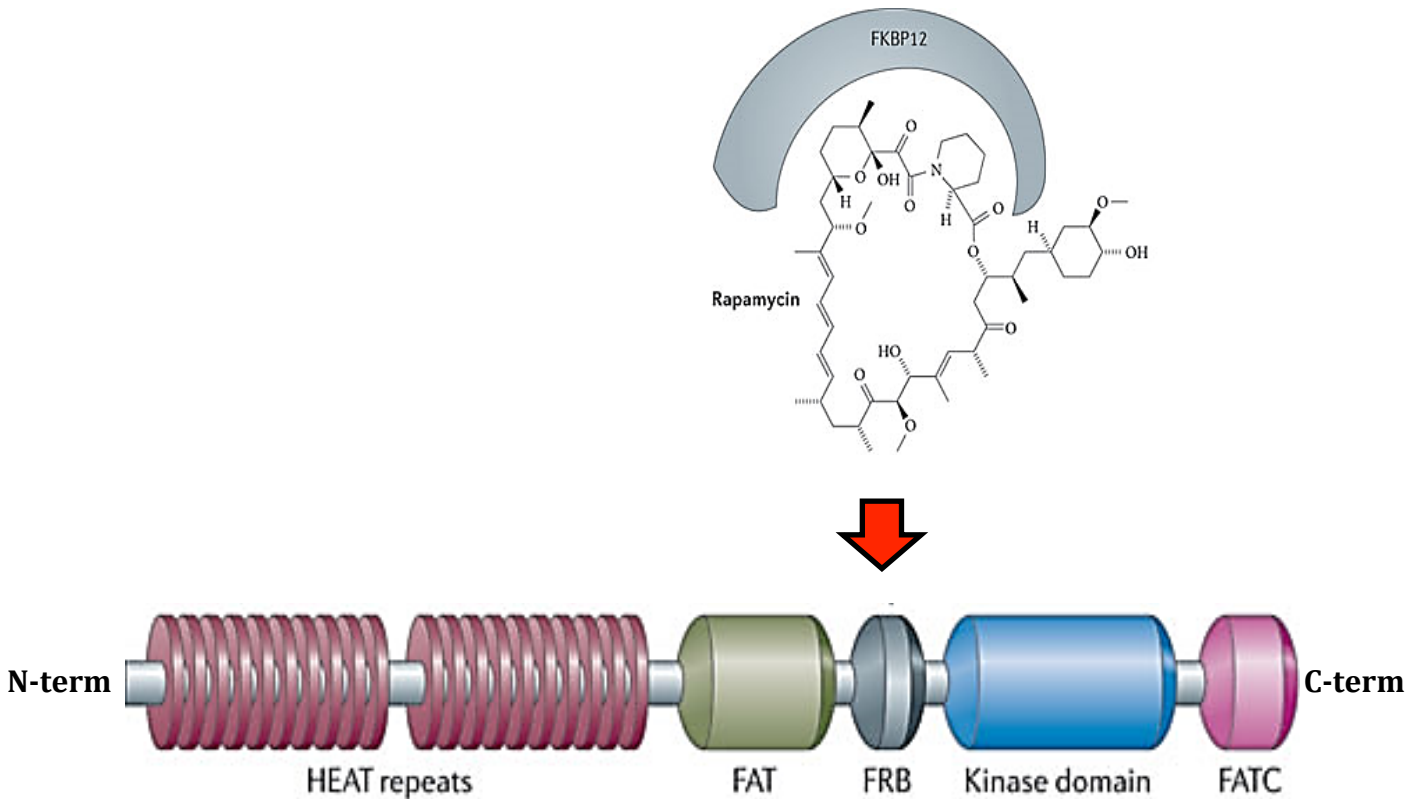


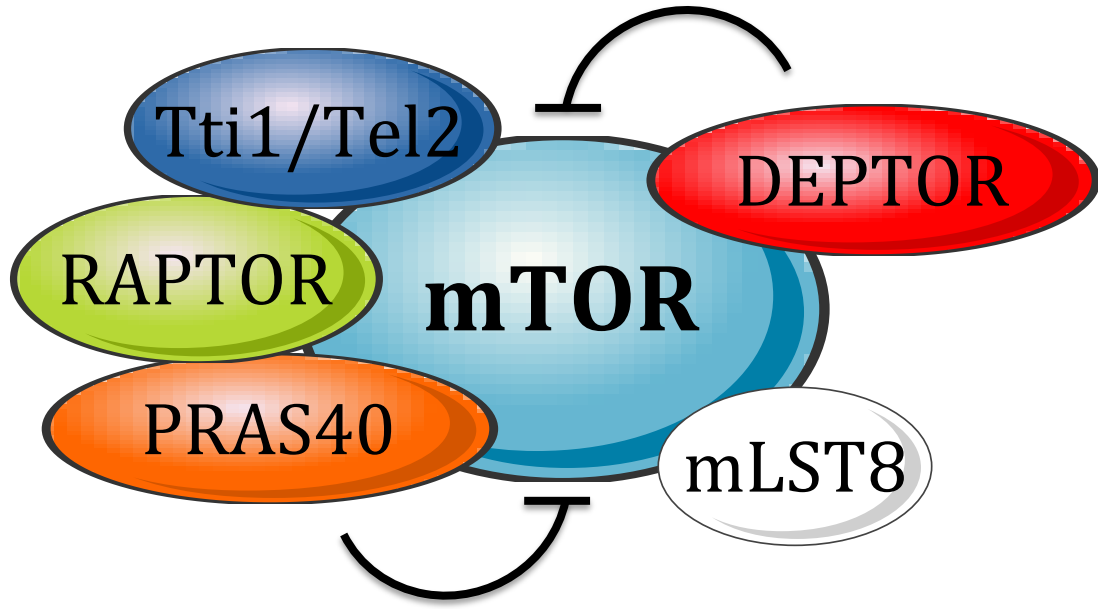
Figure 1: Schématisation des différents domaines de la kinase mTOR

La kinase mTOR est composée d'une répétition en tandem de 20 domaines HEAT (Huntingtin, EF3, A subunit of PP2A and TOR) importants pour l'interaction de mTOR avec ses protéines partenaires, des domaines FAT (FRAP, ATM, TRRAP) et FATC qui modulent l'activité du domaine kinase, ainsi que le domaine FRB qui est le site de fixation du complexe inhibiteur de mTOR composé de la rapamycine et de FKBP12. (Benjamin D. et *al.* Nat. Rev. Drug. Discov. 2011)

1. Rapamycine et mTOR

La rapamycine est un puissant antibiotique produit par une souche de *Streptomyces hygroscopicus* isolée à partir d'un échantillon de sol recueilli à Rapa - Nui (île de Pâques) (**Figure 1**) (Vezina, Kudelski et al. 1975). Au début des années 1990, des études chez la levure ainsi que des cellules de mammifères ont permis d'identifier une protéine d'environ 250 kDa comme cible cellulaire de cette drogue (Koltin, Faucette et al. 1991, Sabatini, Erdjument-Bromage et al. 1994) et fut ainsi nommée chez les mammifères « *Mammalian Target Of Rapamycine* » (mTOR). mTOR est une serine/thréonine kinase de 289 kDa qui appartient à la famille de kinases apparentées aux PI3K (PIKK) et qui est conservée de la levure à l'homme. Les membres de cette famille contiennent un domaine à activité sérine/thréonine kinase ayant une forte homologie avec le domaine catalytique des PI3K (**Figure 1**). mTOR est également composée du domaine FRB (*FKBP12-Rapamycine Binding domain*) dont l'intégrité est indispensable à l'action inhibitrice de la rapamycine. En effet, la rapamycine agit en s'associant avec son récepteur intracellulaire FKBP12 induisant sa fixation sur le domaine FRB de mTOR et par conséquent son inhibition (**Figure 1**). Finalement, mTOR est également composée de plusieurs autres domaines hautement conservés entre les espèces : les répétitions en tandem de plus de 20 motifs HEAT (Huntingtin, EF3, A subunit of PP2A and TOR) permettent les interactions protéine-protéine ainsi que les domaines FAT (FRAP, ATM, TTRAP) et FATC, situés de part et d'autre des domaines FRB et catalytique, respectivement (**Figure 1**). L'utilisation de la rapamycine a facilité l'identification du rôle central de mTOR dans le contrôle de la croissance cellulaire, en régulant notamment des protéines-clés pour la biogénèse des ribosomes (Hannan, Brandenburger et al. 2003) et les synthèses protéique, lipidique et nucléotidique (Howell, Ricoult et al. 2013) ainsi que l'autophagie (Meijer and Codogno 2004). mTOR est une kinase exprimée de façon ubiquitaire dans les cellules humaines sous la forme de deux complexes mutliprotéiques : mTORC1 et mTORC2 (**Figure 2**). Ces deux complexes diffèrent dans leurs compositions, régulations et fonctions (Bhaskar and Hay 2007). De plus, contrairement à mTORC1, la rapamycine n'inhibe pas l'activité de mTORC2 (sauf cas particulier) (Loewith, Jacinto et al. 2002). Chez la souris, l'inactivation de mTOR est létale dès 6,5 jours post-coïtum (jpc) avec un arrêt total du développement dès 5,5 jpc associé à une incapacité des cellules embryonnaires à proliférer, démontrant ainsi l'importance de mTOR pour la croissance embryonnaire (Gangloff, Mueller et al. 2004).

A: mTORC1



B: mTORC2

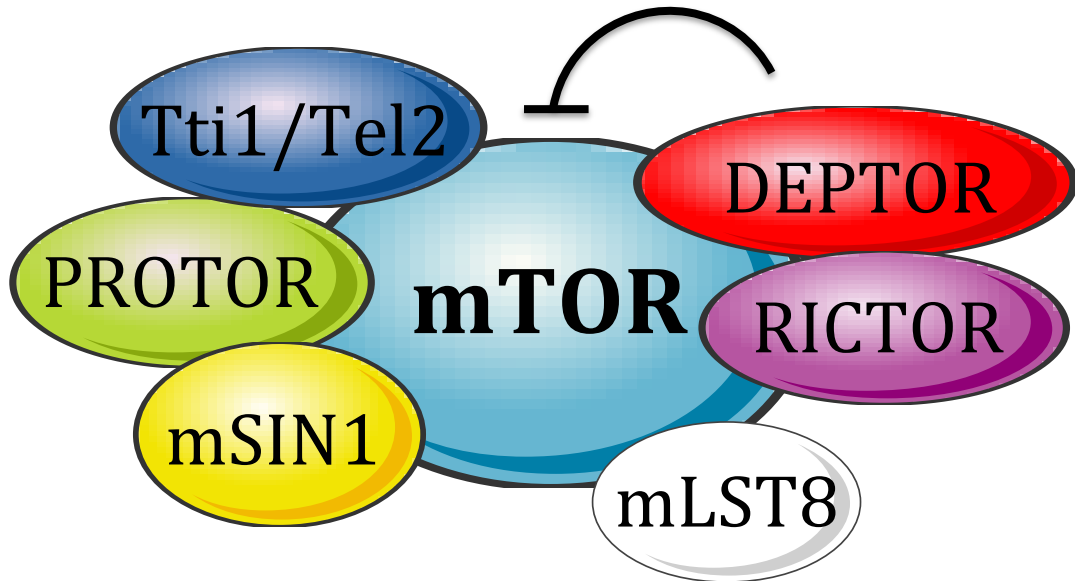


Figure 2 : Composition des deux complexes mTORC1 et mTORC2

A: Le complexe mTORC1 est composé de mTOR, Raptor (regulated associated protein of mTOR), mLST8 (mammalian lethal with sec-13, aussi connue sous le nom de GβL), le complexe Tti1/Tel2 (Tel two interacting protein 1 / Telomere maintenance 2), PRAS40 (proline-rich AKT substrate 40 kDa) et Deptor (Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin interacted with mTOR). PRAS40 et DEPTOR sont des inhibiteurs de l'activité du complexe.

B: Le complexe mTORC2 est composé de mTOR, mLST8, Tti1/Tel2, Deptor, Rictor (rapamycin insensitive companion of mTOR), mSIN1 (mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1) et Protor-1 (Protein observed with rictor-1).

Depuis le début des années 2000 l'intérêt de la communauté scientifique pour mTOR n'a cessé de s'intensifier. En effet, mTOR est dérégulée dans de nombreuses pathologies pour ne citer que le diabète ou le cancer, faisant de cette protéine une cible thérapeutique prometteuse (Laplante and Sabatini 2012).

2. mTOR : une kinase, deux complexes

2.1. Le complexe mTORC1

Le complexe mTORC1 comprend six composantes : mTOR qui est la sous unité catalytique du complexe, Raptor (*Regulated Associated Protein of mTOR*), mLST8 (*Mammalian Lethal with sec-13*, aussi connue sous le nom de GβL), le complexe Tti1/Tel2 (*Tel Two Interacting protein 1 / Telomere maintenance 2*), PRAS40 (*Proline-Rich Akt Substrate 40 kDa*), et Deptor (*Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin interacted with mTOR*) (**Figure 2A**). Ce complexe régule différents processus cellulaires notamment par le contrôle, par phosphorylation, de l'activité des protéines S6Ks (*ribosomal S6 Kinases*) et 4E-BP1 (*eiF4E-Binding Protein 1*) (cf. Introduction Chapitre I Partie 4.1).

Raptor est une protéine de 150 kDa qui possède 7 domaines WD (tryptophane-Aspartate) répétés. Des études antérieures indiquent que Raptor joue un rôle essentiel dans l'assemblage du complexe mTORC1, le recrutement de ses substrats, ainsi que la régulation de l'activité mTORC1 et sa localisation subcellulaire (Hara, Maruki et al. 2002, Kim, Sarbassov et al. 2002, Sancak, Peterson et al. 2008). L'inactivation de Raptor chez la souris entraîne une mort embryonnaire précoce (Guertin, Stevens et al. 2006). Les auteurs de cette étude ont rapporté que les embryons invalidés pour Raptor meurent au même stade que les embryons déficients pour mTOR et avec les mêmes défauts de prolifération (Guertin, Stevens et al. 2006), démontrant ainsi le rôle clé de Raptor pour l'activité de mTORC1.

mLST8/GβL est une protéine de 36 kDa sans activité catalytique, qui interagit notamment avec le domaine kinase de mTOR via ses domaines WD40 répétés. Le rôle de mLST8 dans le complexe mTORC1 reste inconnu, à l'inverse de Raptor et mTOR, l'inactivation de mLST8 n'affectant pas l'activité de mTORC1 *in vivo* et *in vitro* (Guertin, Stevens et al. 2006).

Le complexe Tti1/Tel2 sert d'échafaudage pour les deux complexes mTOR et est essentiel à leur stabilité. L'inactivation *in vitro* de Tti1 supprime l'activité kinase de

mTORC1 et mTORC2. Ce complexe n'est pas spécifique de mTOR puisqu'il est capable d'interagir avec tous les membres de la famille de kinases apparentées aux PI3K (PIKK) (mTOR, ATM, ATR, DNA-PKcs, SMG-1, and TRRAP) (Kaizuka, Hara et al. 2010).

PRAS40 et Deptor ont été caractérisés comme des composantes inhibitrices du complexe mTORC1 (Sancak, Thoreen et al. 2007, Peterson, Laplante et al. 2009). Lorsque l'activité de mTORC1 est réduite, PRAS40 et Deptor sont recrutés au niveau du complexe où ils favorisent l'inhibition de mTORC1. Il a été proposé que PRAS40 régule négativement l'activité kinase de mTORC1 en supprimant l'interaction mTORC1-substrat (Wang, Harris et al. 2007). La surexpression de PRAS40 inhibe les phosphorylations de 4E-BP1 et de S6K1. Inversement, sa déplétion spécifique augmente la phosphorylation de ces mêmes cibles (Fonseca, Smith et al. 2007, Oshiro, Takahashi et al. 2007, Wang, Harris et al. 2007). Des résultats semblables ont été observés lors de la manipulation de l'expression de deptor *in vitro* (Peterson, Laplante et al. 2009). De plus, la phosphorylation mTORC1 dépendante de Deptor entraîne sa dégradation par le protéasome (Gao, Inuzuka et al. 2011, Zhao, Xiong et al. 2011). De façon intéressante, mTORC1 est également capable de réguler directement les protéines PRAS40 et Deptor : lorsque le complexe s'active, il entraîne la phosphorylation de ses deux partenaires réduisant ainsi leur interaction avec le reste du complexe (Wang, Harris et al. 2007, Peterson, Laplante et al. 2009).

2.2. Le complexe mTORC2

Tout comme mTORC1, le complexe mTORC2 est composé de mTOR, mLST8, Tti1/Tel2 et Deptor. A ces trois protéines communes aux deux complexes viennent s'ajouter Rictor (rapamycin insensitive companion of mTOR), mSIN1 (mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1) et Protor-1 (Protein observed with rictor-1) (Figure 2B). A ce jour, les fonctions et la régulation de ce complexe, identifié plus tardivement que mTORC1 restent moins bien identifiées. Cependant, il est clair que mTORC2 régulent différents mécanismes cellulaires notamment en contrôlant, par phosphorylation, l'activité de la famille des kinases AGC (AKT, SGK1, PKC, cf. Introduction Chapitre I Partie 4.2)

Rictor est une protéine de 200 kDa qui n'est pas entièrement caractérisée puisqu'il n'a pas encore été identifié, à ce jour, de domaine fonctionnel connu. Rictor, contrairement aux autres protéines interagissant avec mTOR, est relativement peu conservée entre les

espèces à l'exception de son domaine C-terminal qui est conservé chez tous les vertébrés (Oh and Jacinto 2011). Rictor est nécessaire au maintien de l'intégrité du complexe mTORC2. Chez la souris, l'ablation de Rictor entraîne des anomalies du placenta et de l'angiogenèse, suivies de la mort des embryons entre les 10 et 11ème jours de l'embryogenèse (Guertin, Stevens et al. 2006). Ces différences d'âges et de causes de mort entre les embryons Raptor -/- et Rictor -/- démontrent des rôles indépendants mais essentiels des deux complexes mTORC1 et mTORC2 au cours du développement embryonnaire.

mSIN1 est une protéine de 70 kDa qui interagit directement avec Rictor mais pas avec Raptor. mSIN1 tout comme Rictor est requise pour le maintien de l'intégrité du complexe et son invalidation chez la souris est létale (Frias, Thoreen et al. 2006, Jacinto, Facchinetti et al. 2006). mSIN1 subit un épissage alternatif et génère cinq isoformes. Au moins trois types de complexes mTORC2 indépendants peuvent être formés en interagissant avec trois de ces isoformes (Frias, Thoreen et al. 2006). Cependant, aucune fonction spécifique d'une isoforme n'a été démontrée. mSIN1 est également capable d'interagir et d'inhiber Ras : cependant, il n'est pas encore déterminé si ces interactions influencent l'activité de mTORC2 (Schroder, Buck et al. 2007).

Protor (aussi connu sous le nom PRR5) existe sous deux isoformes, Protor1 et Protor 2 (Pearce, Huang et al. 2007, Thedieck, Polak et al. 2007). Protor interagit avec Rictor, et fonctionne comme un amplificateur de l'activité de mTORC2 en augmentant sa capacité à phosphoryler ses substrats (Pearce, Sommer et al. 2011).

mLST8, Tti1/Tel2 et Deptor sont trois membres conservés entre mTORC1 et mTORC2. De façon intéressante, mLST8 semble jouer un rôle beaucoup plus important au sein du complexe mTORC2. Tandis que l'invalidation de mLST8 n'a pas d'effet sur l'activité mTORC1 *in vivo*, les embryons invalidés pour mLST8 meurent au même stade que les embryons Rictor -/-. Ces résultats suggèrent un rôle plus important au sein de mTORC2 que de mTORC1. Dans ce sens, il a été montré que mLST8 est crucial pour maintenir l'intégrité et la signalisation de mTORC2 dans un modèle de fibroblastes embryonnaires murins. De leurs côtés, Tti1/Tel2 et Deptor gardent les mêmes fonctions dans les deux complexes.

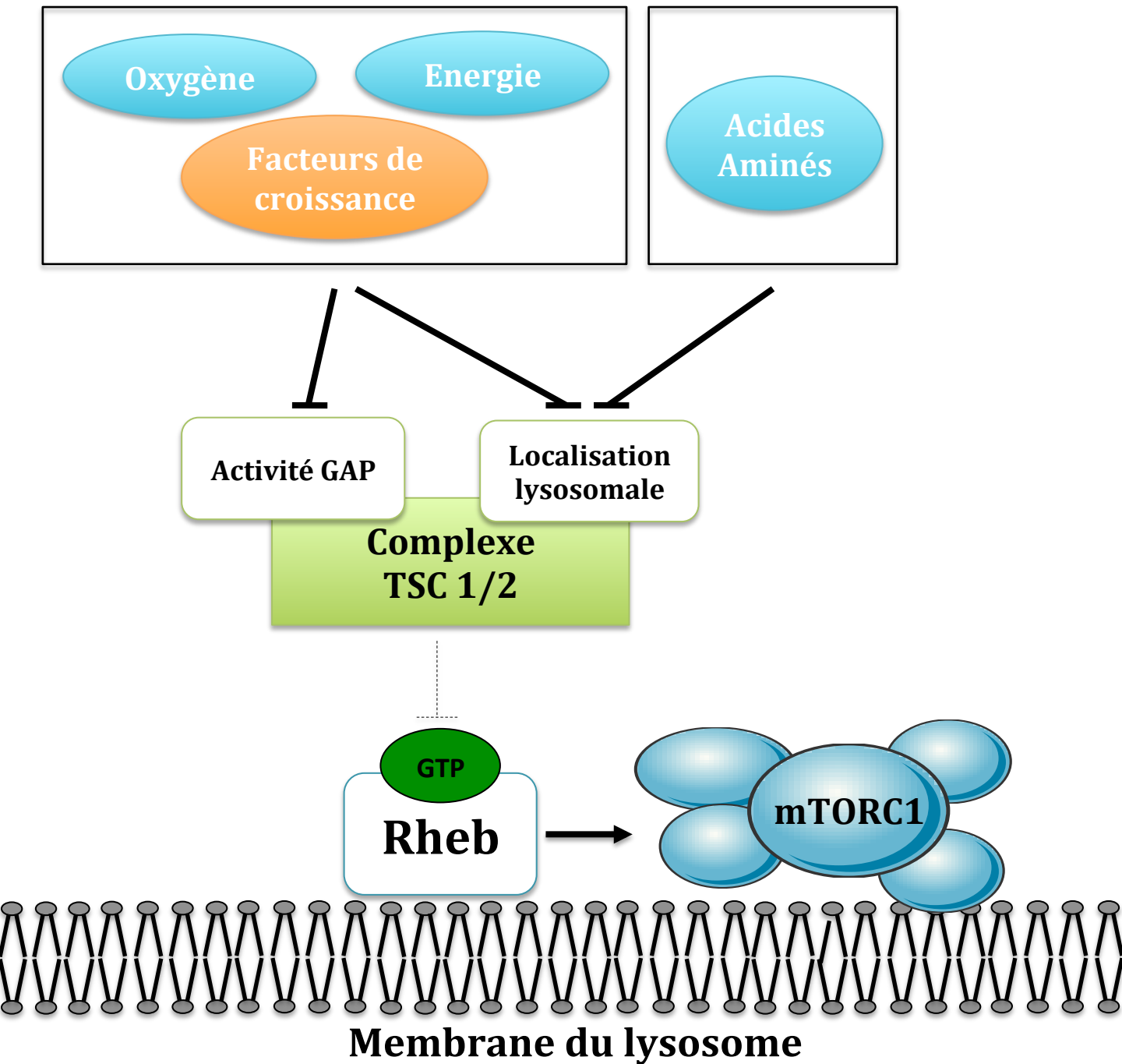


Figure 3 : Le complexe TSC1/2: carrefour sensible du complexe mTORC1

Le complexe TSC1/2 intègre tous les signaux locaux (bleu turquoise) et systémiques (orange). Ces signaux inhibent l'activité GAP ainsi que la localisation lysosomale du complexe TSC1/2. Le complexe TSC régule l'activité de Rheb en contrôlant son statut GDP/GTP. Lorsque le complexe TSC est actif, il hydrolyse le GTP de Rheb en GDP et l'inhibe. En présence des différents signaux, le complexe TSC est inhibé et localisé dans le cytoplasme loin de Rheb ce qui permettra l'activation de cette dernière et donc de mTORC1.

3. Régulation de la voie mTOR

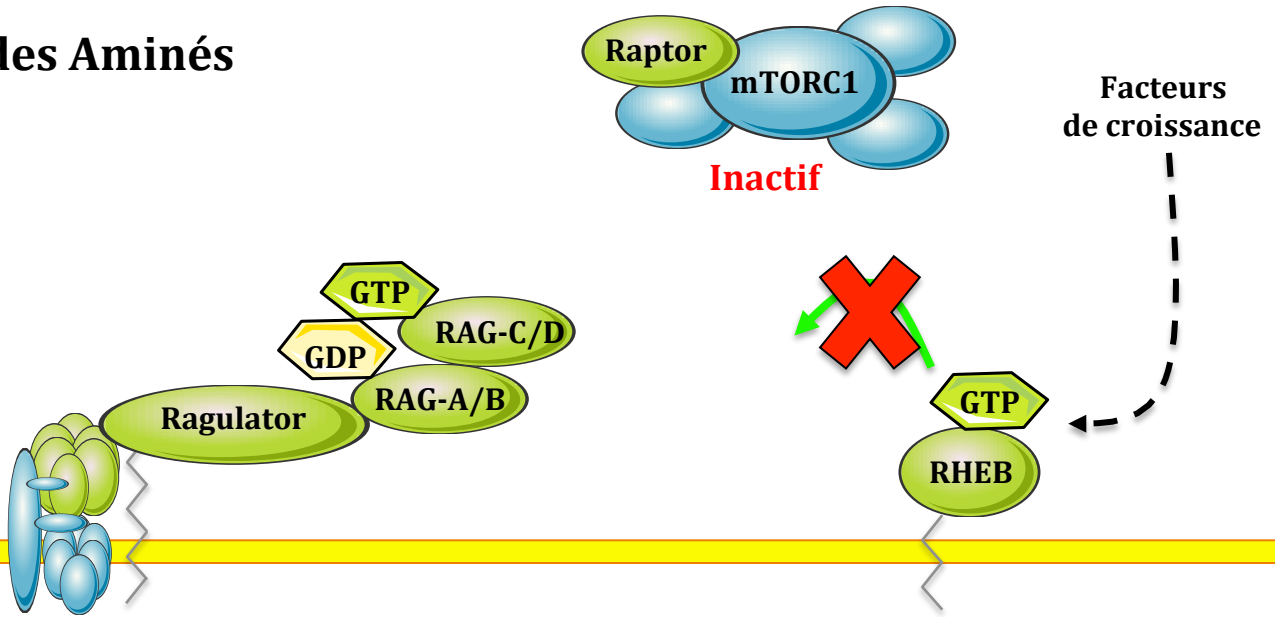
Dans le but de maintenir son homéostasie, une cellule se doit d'adapter son métabolisme et sa croissance en fonction de la disponibilité en nutriments. En tant que chef d'orchestre du métabolisme et de la croissance cellulaire, la voie mTOR joue un rôle essentiel dans l'adaptation cellulaire en étant capable de détecter différents signaux systémiques (facteurs de croissance) et locaux (acides aminés, statut énergétique, oxygène ...) et de moduler son activité en conséquence.

3.1. Régulation de mTORC1

3.1.1. Le complexe TSC, carrefour sensitif de la voie mTORC1

Le complexe TSC (*Tuberous Sclerosis Complex*) est un hétérodimère composé de TSC1 (hamartine) et TSC2 (tubérine). Des mutations du gène *TSC1* ou *TSC2* induisent le syndrome de sclérose tubéreuse de Bourneville, une maladie autosomique dominante qui entraîne des manifestations cutanées, cardiaques, cérébrales et rénales. La maladie se manifeste essentiellement par l'apparition de nombreuses tumeurs bénignes. L'atteinte cutanée et neurologique est systématique, celle des reins ou de la rétine est fréquente (Curatolo, Bombardieri et al. 2008). L'étude du rôle cellulaire de TSC1/2 a démontré que ce complexe régule mTORC1 en contrôlant le statut GTP/GDP de Rheb (*Ras Homolog Enriched in Brain*) par l'intermédiaire de l'activité GAP (*Guanine triphosphate GTPase Activating Protein*) de TSC2. Lorsqu'elle est sous forme GTP, Rheb interagit et active directement mTORC1, tandis que sous l'action de TSC2, Rheb passe sous sa forme GDP et l'interaction Rheb-mTORC1 ne se fait plus, inhibant ainsi ce dernier (Long, Lin et al. 2005). L'importance de TSC1 réside dans sa capacité à stabiliser TSC2 et ainsi éviter sa dégradation. Ce complexe est le « carrefour sensitif » de l'axe mTORC1, tout particulièrement *via* l'action des facteurs de croissance médiée par les voies de signalisation MAP kinases et AKTs. Cet axe facteurs de croissance/hormones/Récepteurs assurant l'activité du complexe mTORC1 convergent au niveau du complexe TSC et contrôlent son activité GAP et donc l'activité de Rheb (cf. Introduction Chapitre I Partie 3.1.3). Il a également été démontré que les facteurs de croissance ainsi que les acides aminés, le glucose et tout les autres facteurs régulant l'activité mTORC1 contrôlent également localisation subcellulaire du complexe TSC (**Figure 3**). En effet, Rheb se situe majoritairement à la surface du lysosome, localisation clé pour l'activation

- Acides Aminés



+ Acides Aminés

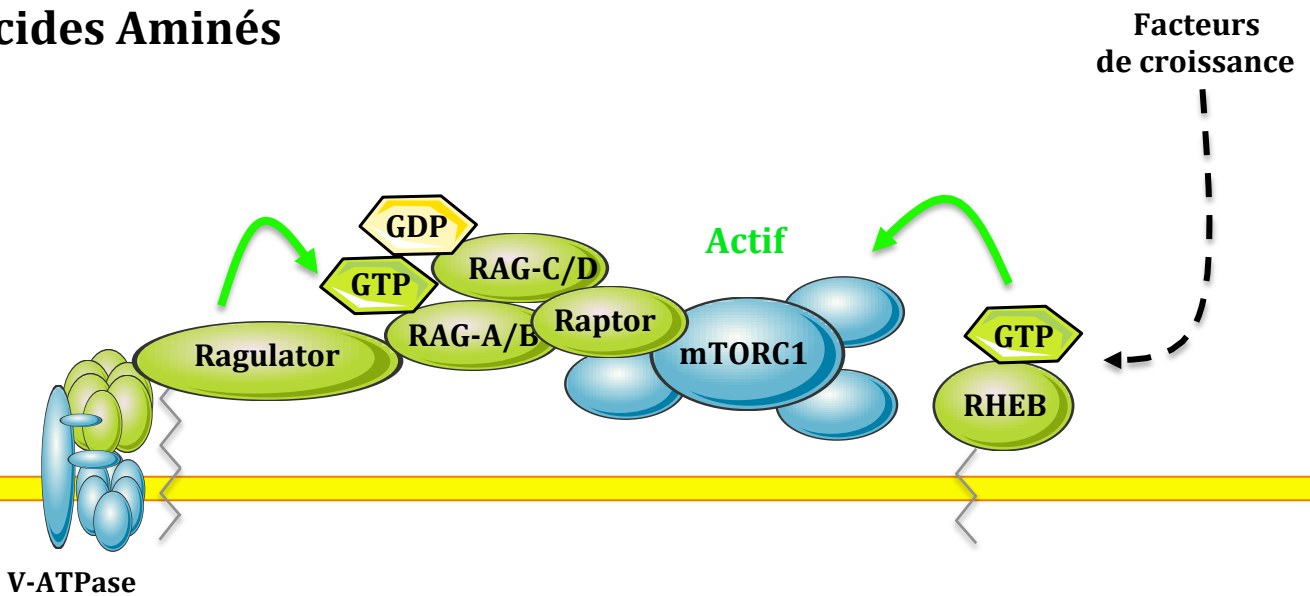


Figure 4 : Régulation de la localisation lysosomale de mTORC1

L'activité mTORC1 est régulée par les facteurs de croissance par l'intermédiaire de Rheb. Les acides aminés favorisent l'activation des protéines RAGs pour recruter mTORC1 à la surface du lysosome où le complexe pourra être activé par Rheb. Le complexe des RAGs est associé au RAGULATOR qui permet son ancrage dans la membrane lysosomale. En absence d'acides aminés, RAG-A/B se trouve sous forme GDP et RAG-C/D sous forme GTP ce qui empêche le recrutement de mTORC1 à la surface du lysosome et donc l'impossibilité pour les facteurs de croissance et Rheb d'activer mTORC1. En présence d'acides aminés, RAG-A/B passe sous forme GTP, RAG-C/D sous forme GDP, ce qui entraîne la relocalisation de mTORC1 au niveau de la membrane du lysosome ce qui permettra son activation par Rheb.

de mTORC1. De ce fait, pour inhiber Rheb, TSC2, sous l'influence des différents facteurs régulant mTORC1, doit également se relocaliser au niveau du lysosome (Demetriades, Plescher et al. 2016). Cependant le mécanisme contrôlant la localisation de TSC2 reste encore méconnu.

3.1.2. Acides aminés et lysosome

La régulation de mTORC1 par les acides aminés est connue depuis la fin des années 90 avec les travaux de Hara *et al.* démontrant qu'une carence en acides aminés, notamment en leucine, supprime la phosphorylation de S6K1 et 4E-BP1 même en présence de facteurs de croissance (Hara, Yonezawa et al. 1998). Le mécanisme moléculaire responsable de cette régulation commence tout juste à être compris. En 2008, deux groupes indépendants identifient les protéines RAGs (*Ras related GTPases*) comme composantes essentielles de la régulation de mTORC1 par les acides aminés dans les cellules de mouches et de mammifères (Kim, Goraksha-Hicks et al. 2008, Sancak, Peterson et al. 2008). Chez les mammifères, quatre protéines RAGs ont été identifiées : Rag A et Rag B sont hautement homologues et s'associent avec Rag C ou Rag D pour former un hétérodimère fonctionnel RagA/B – RagC/D (Schurmann, Brauers et al. 1995, Sekiguchi, Hirose et al. 2001). La présence d'acides aminés convertie l'hétérodimère Rag dans sa forme active avec Rag A ou Rag B sous forme GTP (Rag A/B-GTP) et Rag C ou Rag D sous forme GDP (Rag C/D-GDP) (**Figure 4**). Cette forme active interagit avec RAPTOR sans affecter l'activité kinase de mTORC1, l'hétérodimère RAG recrutant mTORC1 à la surface du lysosome où se trouve majoritairement la protéine Rheb qui pourra alors activer mTORC1. En absence d'acides aminés, tout ceci n'a plus lieu, l'hétérodimère Rag se retrouvent sous forme inactive RagA/B-GDP, RagC/D-GTP et mTORC1 est alors relocalisé dans le cytoplasme sous forme inactive (Sancak, Peterson et al. 2008) (**Figure 4**). De ce fait, les acides aminés régulent la localisation de mTORC1 ce qui influe directement sur sa capacité à être activé par Rheb.

L'hétérodimère formé par les Rags contrôle la relocalisation de mTORC1 au niveau de la membrane du lysosome en réponse aux acides aminés mais ne possède cependant pas de domaine capable de s'ancrer à celle-ci. Ceci suggère la présence d'une autre protéine ancrée dans la membrane du lysosome et interagissant avec les Rags. Deux études ont démontré la présence d'un complexe nommé RAGULATOR capable d'interagir avec le complexe Rag à la surface du lysosome (Sancak, Bar-Peled et al. 2010,

Bar-Peled, Schweitzer et al. 2012). Ce complexe est composé de p18 (LAMPTOR1), p14 (LAMTOR2, MP1 (LAMTOR3), C7orf59 (LAMTOR4) et HBXIP (LAMTOR5). L'invalidation d'un des membres de ce complexe est suffisante pour supprimer la relocalisation des Rags ainsi que celle de mTORC1 au niveau du lysosome. De plus, LAMTOR1 présente une modification lipidique permettant son insertion dans la membrane du lysosome (Nada, Hondo et al. 2009). De ce fait, le complexe RAGULATOR est responsable de l'ancrage de l'hétérodimère formé par les Rags à la membrane du lysosome (**Figure 4**).

En plus d'être responsable de l'ancrage à la membrane du lysosome, le RAGULATOR exerce une activité GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*) qui permet l'échange d'un GDP avec un GTP pour les Rag A/B (Bar-Peled, Schweitzer et al. 2012). Ainsi, le RAGULATOR est responsable de l'activation du complexe RAG en favorisant l'état GTP du Rag A/B. A l'heure actuelle le mécanisme de régulation de l'activité GEF du RAGULATOR n'est pas connu. Cependant, il est clair que la V-ATPase joue un rôle dans ce procédé. En effet, celle-ci interagit avec le RAGULATOR de façon dépendante des acides aminés et cette interaction est nécessaire au recrutement de mTORC1 à la surface du lysosome (Zoncu, Bar-Peled et al. 2011) (**Figure 4**).

Si le RAGULATOR favorise l'état GTP de Rag A/B en présence d'acides aminés, une autre protéine doit être responsable de l'hydrolyse du GTP en GDP en cas de carence en acides aminés afin d'inhiber le complexe RAG et de ce fait mTORC1. La réponse à cette question a été apportée par différentes études successives. Tout d'abord, une première étude a démontré que le super-complexe composé de GATOR1 et GATOR2 est responsable de cette régulation. GATOR1 est un complexe protéique possédant une activité « *GTPase Activating Protein* » (GAP) permettant l'hydrolyse du GTP en GDP de RagA/B et GATOR2 est un inhibiteur de GATOR1 (Bar-Peled, Chantranupong et al. 2013)(**Figure 5**). Rapidement, deux autres études publiées en 2015 et 2016 ont démontré que la protéine Sestrin2 interagit avec GATOR2 et l'inhibe de façon dépendante de la leucine (Kim, Ro et al. 2015, Wolfson, Chantranupong et al. 2016). En effet, en absence de leucine, Sestrin2 se fixe à GATOR2 et l'inhibe, GATOR1 étant ainsi libre d'inhiber le complexe RAG en hydrolysant le GTP de Rag A/B en GDP, supprimant donc le recrutement lysosomal de mTORC1 (**Figure 5**). En présence de leucine, le complexe Sestrin2-GATOR2 se dissocie, la protéine Sestrin2 fixe la leucine pendant que GATOR2 se fixe à GATOR1 et l'inhibe (Kim, Ro et al. 2015, Wolfson, Chantranupong et al.

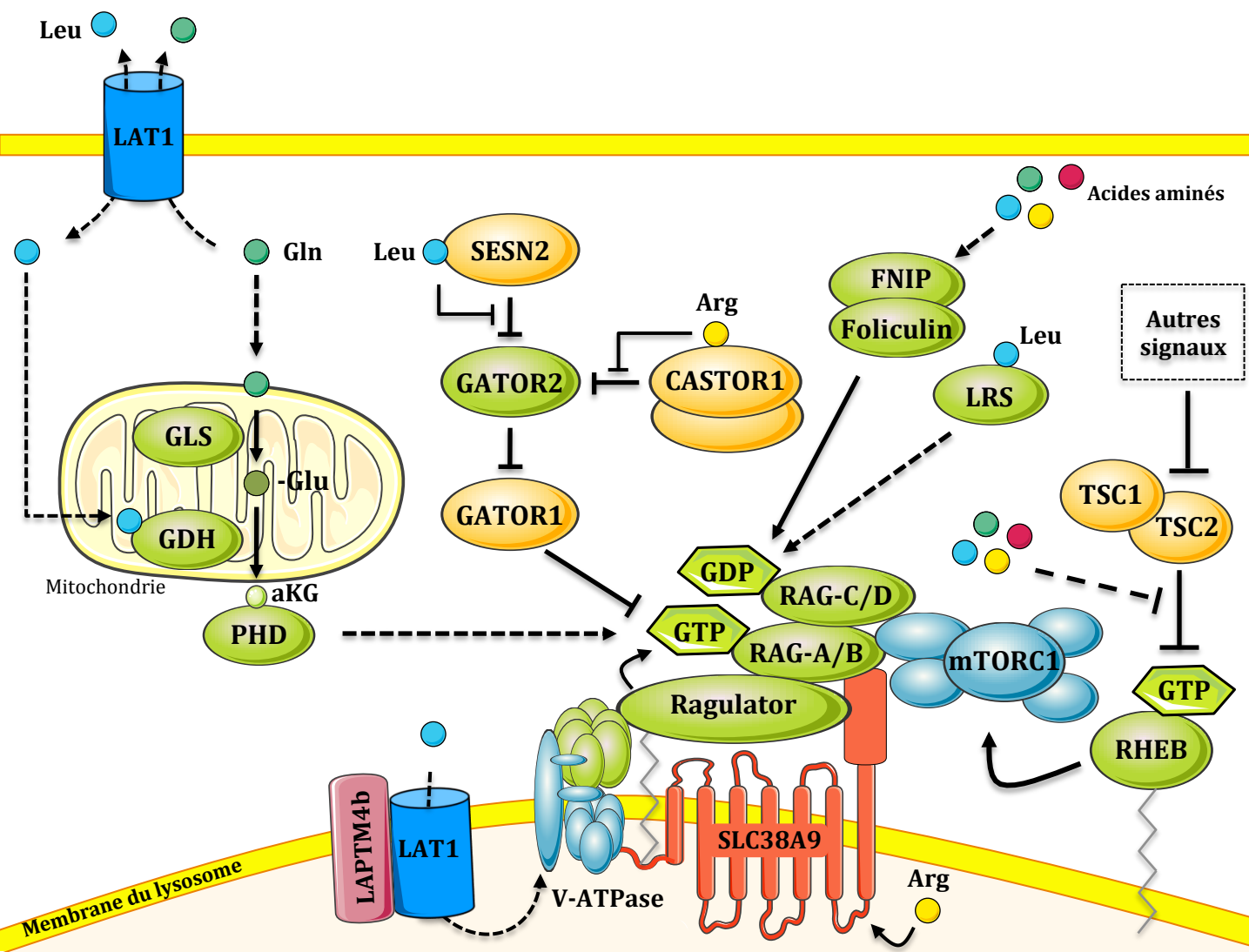


Figure 5 : Régulation de l'activité mTORC1 par les acides aminés

La régulation de mTORC1 par les acides aminés se fait principalement au niveau du ratio GDP/GTP des RAGs (voir figure 4). Sur ce schéma, les inhibiteurs de l'activité mTORC1 sont indiqués en jaune, les activateurs en vert. Le RAGULATOR, par son activité GEF, est responsable du chargement d'un GTP sur RAG-A/B et donc de l'activation des RAGs. GATOR1, par son activité GAP et son inhibiteur GATOR2, sont responsables de l'hydrolyse du GTP de RAG-A/B en absence d'acides aminés. Sestrin2 (SESN2) et CASTOR1 sont les senseurs de leucine et d'arginine respectivement et sont des inhibiteurs de GATOR2. Ces deux senseurs sont inhibés lorsqu'ils fixent leurs acides aminés respectifs, ce qui permet l'activation de GATOR2, l'inhibition de GATOR1 et favorise ainsi la forme GTP de RAG-A/B et donc le recrutement lysosomal de mTORC1. FNIP/Foliculin et potentiellement la leucyl-tRNA synthétase (LRS) favorisent le statut GDP de RAG-C/D avec leur activité GAP en présence d'acides aminés. La glutaminolyse permet aussi l'activation des RAGs en permettant la transformation de la glutamine en α ketoglutarate qui se fixera sur la PHD et favorisera le statut GTP de RAG-A/B. Le transporteur LAT1 permet l'entrée de leucine dans le lysosome et l'activation de mTORC1 par un mécanisme impliquant la V-ATPase. SLC38A9 est un transporteur de glutamine interagissant avec le RAGULATOR et les RAGs et qui est impliqué dans la détection de l'arginine à l'intérieur du lysosome et l'activation de mTORC1. Les acides aminés régulent également l'activité de Rheb en contrôlant la relocalisation du complexe TSC1/2 au niveau du lysosome et donc au niveau de Rheb (voir partie 3.1.1). Adapté de Shimobayashi et *al.* Cell research 2016.

2016). Ainsi, GATOR1 ne peut plus hydrolyser le GTP de RagA/B, entraînant le recrutement de mTORC1 et son activation par Rheb (**Figure 5**). Par la surexpression de protéines Sestrin2 mutantes incapables d'interagir avec la leucine, les auteurs ont également montré que ce mécanisme est essentiel à l'activation de mTORC1 par la leucine. Ces résultats expliquent donc, presque 20 ans après, les premières observations de Hara *et al.* sur la régulation de mTORC1 par la leucine (Hara, Yonezawa et al. 1998).

En parallèle de ce mécanisme Sestrin2-GATOR2/1-Rags, une autre étude a suggéré le rôle d'une autre protéine dans l'activation leucine-dépendante de mTORC1. Les auteurs de cette étude ont démontré que la protéine LRS (*Leucyl-tRNA Synthetase*) répondait aux variations intracellulaires de leucine et était capable de favoriser la localisation lysosomale de mTORC1 (Han, Jeong et al. 2012). Ils ont également démontré que la protéine LRS agissait comme régulateur de l'état GTP/GDP de RagC/D par une activité GAP (**Figure 5**). Cependant, ces résultats sont fortement controversés dans la littérature, une autre étude ayant clairement démontré que la protéine LRS ne possède aucune activité GAP (Tsun, Bar-Peled et al. 2013). De plus, selon cette même étude, le complexe protéique Foliculin/FNIP est responsable de l'activation de RagC/D par son activité GAP et non pas la LRS (Tsun, Bar-Peled et al. 2013). A ce jour, aucune explication n'a permis de mettre en lumière les raisons des divergences entre ces deux études (**Figure 5**).

L'arginine est le second acide aminé capable de réguler l'activité de mTORC1. L'équipe du Dr. Sabatini a très récemment mis en évidence un senseur cytoplasmique d'arginine dont le mode d'action est très proche de Sestrin2 (Chantranupong, Scaria et al. 2016). En effet, ils ont démontré que les protéines CASTOR1 et CASTOR2, deux protéines dont les rôles n'avaient pas été identifiés jusque-là, forment un hétérodimère (CASTOR1 peut également former un homodimère) capable de se complexer avec GATOR1 et de l'inhiber, tout comme le fait Sestrin2 (Chantranupong, Scaria et al. 2016). Ils ont également prouvé que CASTOR1 était capable de fixer l'arginine, empêchant l'interaction CASTOR1/2-GATOR2 (Chantranupong, Scaria et al. 2016) et mimant ainsi la régulation de l'axe Leucine-Sestrin2-GATOR2/1-RAGs-mTORC1 (**Figure 5**).

Bien que l'axe Castor1/Sestrin2-GATOR2/1-Rags donne une explication solide au contrôle de mTORC1 par la leucine et l'arginine cytoplasmiques, une étude de 2011 a suggéré que la détection des acides aminés se faisait par l'intérieur du lysosome et que

les acides aminés doivent s'y accumuler pour pouvoir activer mTORC1 (Zoncu, Bar-Peled et al. 2011). En suivant ce modèle de détection, plusieurs groupes se sont attachés à identifier un transporteur capable d'augmenter et de détecter la concentration lysosomale en acides aminés. Trois études indépendantes ont démontré le rôle du transporteur transmembranaire SLC38A9 dans la détection de l'arginine à l'intérieur du lysosome (Jung, Genau et al. 2015, Rebsamen, Pochini et al. 2015, Wang, Tsun et al. 2015). Ce transporteur/senseur, capable de transporter l'arginine, interagit directement avec le super-complexe Rags-RAGULATOR et son invalidation supprime l'activation de mTORC1 par l'arginine (Rebsamen, Pochini et al. 2015, Wang, Tsun et al. 2015). De façon intéressante, ce transporteur possède une très faible activité de transport comparé aux autres transporteurs d'acides aminés. De plus, la surexpression d'une version tronquée de ce transporteur ne comportant que la partie cytoplasmique N-terminale et non fonctionnelle, d'un point de vue du transport, active mTORC1 de façon indépendante du niveau d'arginine (Rebsamen, Pochini et al. 2015). Ces résultats suggèrent que SLC38A9 possède plus un rôle de senseur (transcepteur) d'arginine plutôt que de transporteur (**Figure 5**). SLC38A9 est également capable de transporter la glutamine, un autre acide aminé régulant l'activité de mTORC1, cependant le rôle de SLC38A9 dans la détection de la concentration intra-lysosomale de glutamine n'a pas été étudié.

Une autre étude a récemment décrit un autre transporteur d'acides aminés pouvant être responsable de l'activation de mTORC1 au niveau du lysosome (Milkereit, Persaud et al. 2015). Le transporteur d'acides aminés LAT1 est un transporteur membranaire d'acides aminés essentiels tels que la leucine (cf. Introduction Chapitre II Partie 2.2). Des études ont déjà montré que ce transporteur participe de façon indirecte à l'activation de mTORC1 en favorisant l'entrée de leucine extracellulaire (Elorza, Soro-Arnaiz et al. 2012, Hansen, Ng et al. 2015). Cependant, l'étude de l'équipe du Dr. Rotin a démontré que ce transporteur, majoritairement exprimé à la membrane plasmique, peut également se complexer avec la protéine lysosomiale LAPTM4b (*Lysosomal-Associated TransMembrane Protein 4b*) entraînant ainsi sa relocalisation au niveau de la membrane du lysosome. Cette relocalisation pourrait augmenter le transport de leucine dans le lysosome et favoriser l'activation de mTORC1 par la leucine. (Milkereit, Persaud et al. 2015) (**Figure 5**). Ces modèles lysosomaux de détection de la leucine et de l'arginine s'ajoutent à ceux régulés par Sestrin2 et CASTOR1. Il est fort probable que ces mécanismes fonctionnent de concert en détectant ces acides aminés dans deux zones

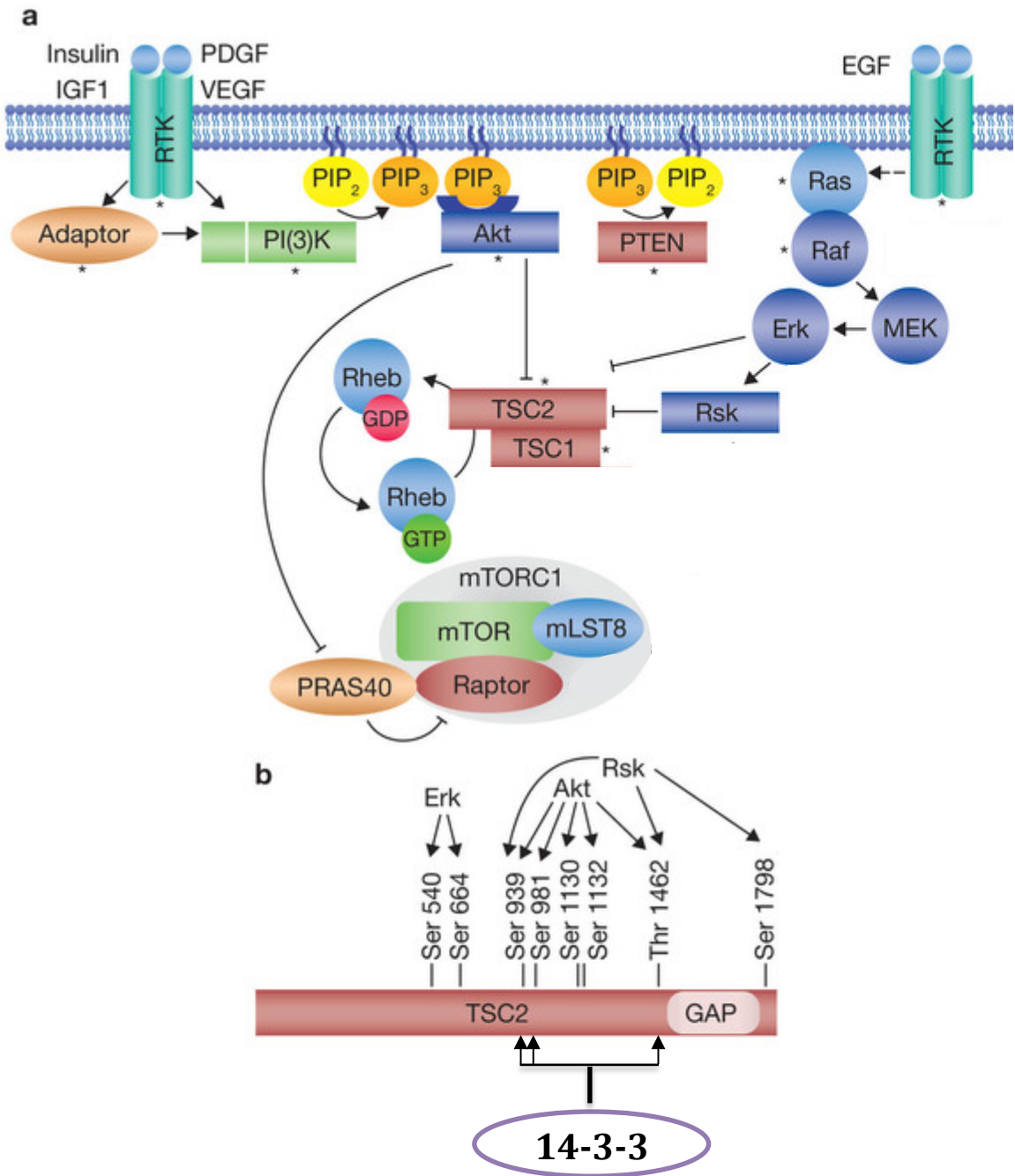


Figure 6 : Contrôle de l'activité mTORC1 par les facteurs de croissance

a: Sous l'action des facteurs de croissance tels que l'insuline, l'EGF (Epithelial Growth Factor) ou le PDGF (Platelet Derived Growth Factor), les récepteurs tyrosine kinase (RTK) activent la PI3K qui convertit le PIP₂ (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) en PIP₃ (phosphatidylinositol-3,4,5-bisphosphate) en découlant l'activation d'AKT. Les facteurs de croissance permettent également l'activation de la voie de signalisation RAS-RAF-ERK-RSK (ERK-p90RSK). Une fois activées, les trois kinases AKT, Erk et RSK vont phosphoryler et inhiber TSC2, favorisant la forme active Rheb-GTP et l'activation de mTORC1. Egalement, AKT est capable de phosphoryler et inhiber PRAS40, un inhibiteur de mTORC1. Erk et RSK sont capables de phosphoryler Raptor et stimuler l'activité mTORC1.

b: Liste des différents sites de phosphorylation de TSC2 par AKT, ERK et RSK. La phosphorylation des sites Ser939, Ser981 et Thr1462 contrôle l'activité de TSC2 notamment en favorisant le recrutement de la protéine inhibitrice 14-3-3. Adapté de Dibble et *al.* Nat Cell Biol 2013

cellulaires stratégiques : **1)** le cytoplasme où a lieu le procédé le plus consommateur en acides aminés : la synthèse protéique et également **2)** le lysosome, organe de dégradation et de recyclage des protéines considéré comme une source intracellulaire d'acides aminés. Ainsi la cellule ressent de façon optimale ses niveaux intracellulaires d'acides aminés, nutriments essentiels à la croissance cellulaire.

A ce jour, aucun senseur lysosomal n'a été décrit pour la glutamine qui est le troisième acide aminé régulant l'activité de mTORC1. Cependant, une étude a suggéré que la glutaminolyse, procédé consistant en la double désamination de la glutamine dans le but de produire de l' α -ketoglutarate (α KG), active mTORC1 par l'intermédiaire de la PHD (prolylhydroxylase) (l' α KG étant un cofacteur de PHD) (Duran, Oppliger et al. 2012, Duran, MacKenzie et al. 2013). De façon intéressante, l'activation de la GDH (glutamate deshydrogenase), enzyme responsable de la deuxième désamination de la glutamine, est dépendante de la fixation d'une leucine, rendant ce modèle d'activation de mTORC1 dépendant de la glutamine ainsi que de la leucine (**Figure 5**).

3.1.3. Les facteurs de croissance

L'activation de la voie mTORC1 par les facteurs de croissance a très vite été corrélée à l'activation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et d'AKT (aussi connu sous le nom de Protéine Kinase B, PKB). Cependant la connexion entre ces deux voies de signalisation est longtemps restée inconnue. Sous l'action des facteurs de croissance tels que l'insuline, l'EGF (*Epithelial Growth Factor*) ou le PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), les récepteurs tyrosine kinase (RTK) activent la PI3K qui convertit le PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-bisphosphate), dont en découle l'activation d'AKT/PKB (Bellacosa, Kumar et al. 2005) (**Figure 6a**). Le lien moléculaire entre mTORC1 et la voie PI3K-AKT a été établi par trois études simultanées ayant démontré pour la première fois que TSC2 était directement phosphorylé et inhibé par AKT (Inoki, Li et al. 2002, Manning, Tee et al. 2002, Potter, Pedraza et al. 2002). Chez l'Homme, AKT phosphoryle TSC2 sur 5 résidus : Ser939, Ser981, Ser1130, Ser1132 et Thr 1462, ce qui diminue son activité GTPase (Manning, Tee et al. 2002, Potter, Pedraza et al. 2002) et de ce fait stabilise Rheb-GTP et l'activation de mTORC1 (**Figure 6a,b**).

De façon intéressante, il a été démontré que la phosphorylation de TSC2 sur les résidus Ser939, Ser981 et Thr 1462 favorise son interaction avec la protéine 14-3-3 (Cai,

Tee et al. 2006, DeYoung, Horak et al. 2008). 14-3-3 est une protéine importante dans le contrôle du métabolisme, se fixant sur des protéines phosphorylées et capable de les activer ou de les inhiber suivant la protéine ciblée (Kleppe, Martinez et al. 2011). Dans le cas de TSC2, la fixation de 14-3-3 entraînera son inhibition (Shumway, Li et al. 2003, Kleppe, Martinez et al. 2011). Il a également été montré que AKT pouvait stimuler l'activité mTORC1 en phosphorylant PRAS40 sur sa Thr246 diminuant ainsi sa capacité à inhiber mTORC1 (**Figure 6a**).

En plus de la voie PI3K -AKT, l'activation de la voie Ras-Raf-MEK-ERK-p90RSK (*Extracellular signal Regulated Kinase* - p90 Ribosomal S6 Kinase) par tous les facteurs de croissance identifiés est également une voie majeure de la stimulation de l'activité mTORC1. Cette activation dépendante de ERK implique la phosphorylation inhibitrice du complexe TSC par ERK ainsi que la p90-RSK (Tee, Anjum et al. 2003) (**Figure 6a**). La p90-RSK phosphoryle TSC2 non seulement sur 2 résidus communs avec AKT : Ser939 et Thr1462, mais également sur un résidu spécifique : la Ser1798 (Roux, Ballif et al. 2004) (**Figure 6b**). La mutation de ces trois sites de phosphorylation supprime l'activation de mTORC1 par ERK. D'autres résidus de TSC2 ont également été identifiés comme étant phosphorylés sous l'activation de la voie ERK-p90RSK : la Ser664 et la Ser540 (Ballif, Roux et al. 2005, Ma, Chen et al. 2005) (**Figure 6b**). Il a été montré que ces sites ne sont pas les cibles de p90-RSK mais sont directement phosphorylés par ERK (**Figure 6a,b**). La phosphorylation de ces deux résidus participe également à l'inhibition du complexe TSC en supprimant l'association TSC1-TSC2 (Ma, Chen et al. 2005). Pour terminer, il a également été montré que ERK et p90-RSK sont capables de phosphoryler directement certains résidus de Raptor ce qui permet de stimuler l'activité de mTORC1 (Carriere, Cargnello et al. 2008, Carriere, Romeo et al. 2011).

3.1.4. AMPK et le statut énergétique

La croissance cellulaire oblige la cellule à utiliser et donc à fabriquer une quantité d'énergie considérable (ATP, adénosine triphosphate) dans le but de maintenir les procédés anaboliques tels que les synthèses nucléique, protéique et lipidique. De ce fait, la cellule a développé des détecteurs lui permettant de connaître son statut énergétique et d'adapter son métabolisme en conséquence, notamment en régulant l'activité de mTORC1 (Dennis, Jaeschke et al. 2001). Le principal mécanisme par lequel mTORC1 est capable de détecter le niveau intracellulaire d'ATP implique la phosphorylation de TSC2

P Phosphorylation inhibitrice **P** Phosphorylation activatrice

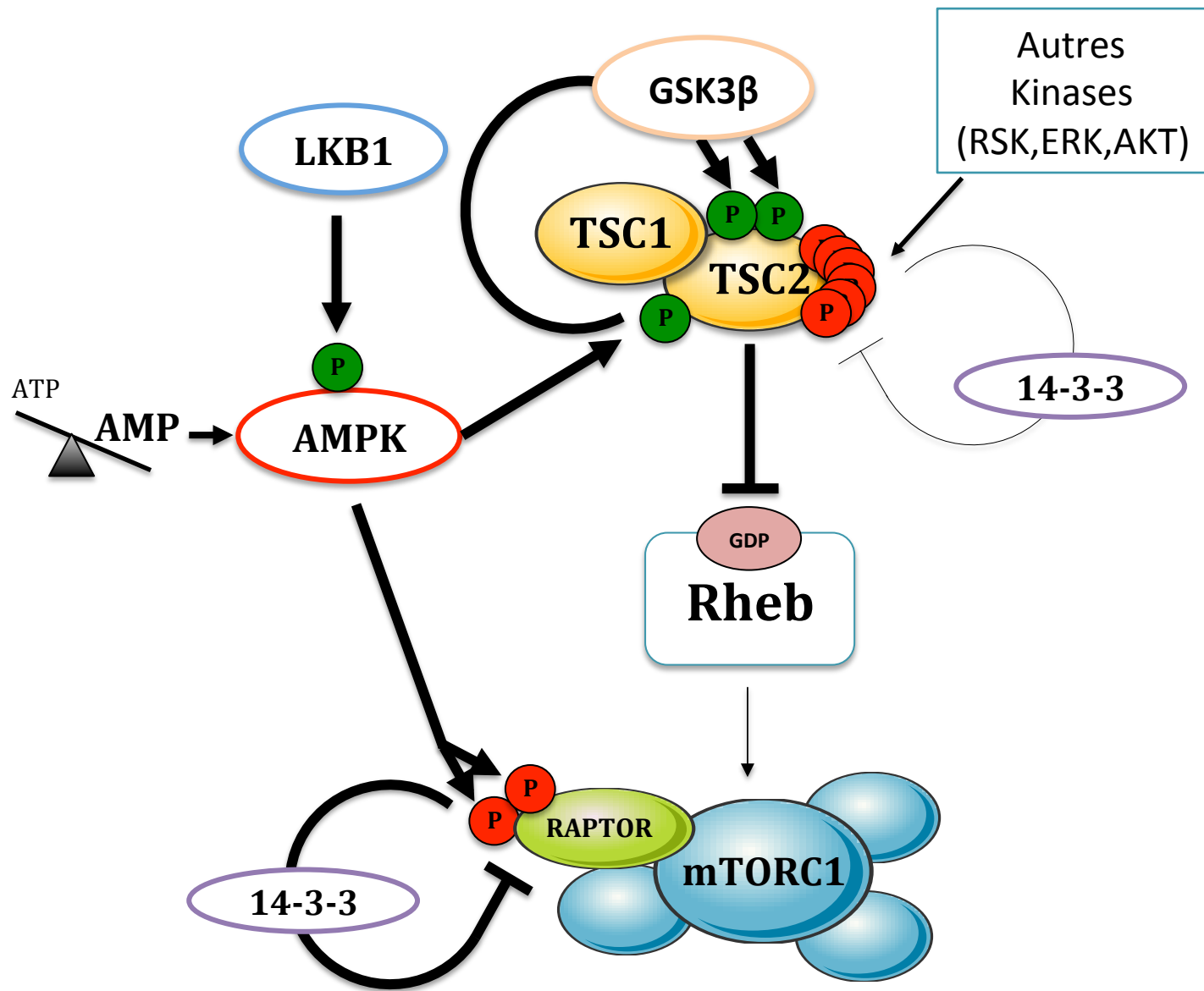


Figure 7 : Contrôle de l'activité mTORC1 par le statut énergétique

En condition de stress énergétique, l'AMP va s'accumuler dans le cytoplasme et se fixer sur l'AMPK entraînant sa phosphorylation et son activation par LKB1. Une fois active, l'AMPK phosphoryle TSC2, ce qui provoque le recrutement de la protéine GSK3β (glycogen synthase kinase 3β) qui phosphoryle à son tour TSC2 sur deux autres résidus. Cela a pour conséquence de renforcer l'activité GAP de TSC2 favorisant la forme GDP de Rheb et l'inhibition de mTORC1. L'AMPK une fois active est capable de phosphoryler Raptor sur deux nouveaux résidus et favorise le recrutement de la protéine inhibitrice 14-3-3.

par l'AMPK (AMP-dependent protein kinase) (**Figure 7**). En condition de stress énergétique, toute élévation d'AMP, forme hydrolysée et non énergétique de l'ATP, active l'AMPK, *via* la protéine kinase amont, LKB1 (Hardie 2005). La forme activée d'AMPK phosphoryle TSC2 sur le résidu Ser1345, provoquant ainsi le recrutement de la protéine GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β) et la phosphorylation des sites Ser1341 et Ser1337 de TSC2. Ce scénario de multiple phosphorylation renforce l'activité GAP de TSC2 et inhibe de ce fait mTORC1 (Inoki, Zhu et al. 2003)(**Figure 7**). L'AMPK est donc, contrairement aux autres kinases en amont du complexe TSC, un activateur de ce complexe et donc un inhibiteur de mTORC1. L'AMPK est également capable de phosphoryler RAPTOR sur la Ser722 et la Ser792 de manière directe. Ces phosphorylations facilitent l'interaction de RAPTOR avec la protéine 14-3-3 et entraînent l'inhibition du complexe mTORC1 (Gwinn, Shackelford et al. 2008)(**Figure 7**). Il a aussi été montré qu'une chute du niveau d'oxygène (hypoxie) pouvait entraîner une chute de production d'ATP par la mitochondrie, entraînant l'activation de l'AMPK et donc l'inhibition de mTORC1 (Liu, Cash et al. 2006).

3.1.5. REDD1 et stress cellulaire

En plus de son impact sur la production d'ATP, il a été montré que l'hypoxie pouvait entraîner une inhibition de mTORC1 indépendamment de l'AMPK. Ce mécanisme implique la cible transcriptionnelle de HIF-1 α (*Hypoxia Inducible Factor-1* α): REDD1. La protéine REDD1 ne possède pas de domaine fonctionnel apparent. Cependant, REDD1 peut se lier aux protéines 14-3-3, en partie grâce à un motif entourant le résidu Ser137 (DeYoung, Horak et al. 2008). Cette étude suggère que REDD1 inhibe mTORC1 en captant les protéines 14-3-3 inhibant originellement TSC2 (cf. Introduction Chapitre I Partie 3.1.3), conduisant à la libération et la réactivation de TSC2, et entraînant l'inhibition de mTORC1 (DeYoung, Horak et al. 2008)(**Figure 8**).

L'ISR (*Integrated Stress Response*) est une voie de signalisation capable de détecter et de répondre à de nombreux stress cellulaires. Cette voie implique quatre kinases 'senseurs', chacune étant capable de détecter certains stress spécifiques et de s'auto-activer en réponse à ceux-ci (cf. Introduction Chapitre II Partie 3.1). Cette activation entraînera la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α (*Eukaryotic Initiation Factor 2* α), supprimant l'initiation de la synthèse protéique globale et favorisant la traduction spécifique de ATF4 (*Activating Transcription Factor*

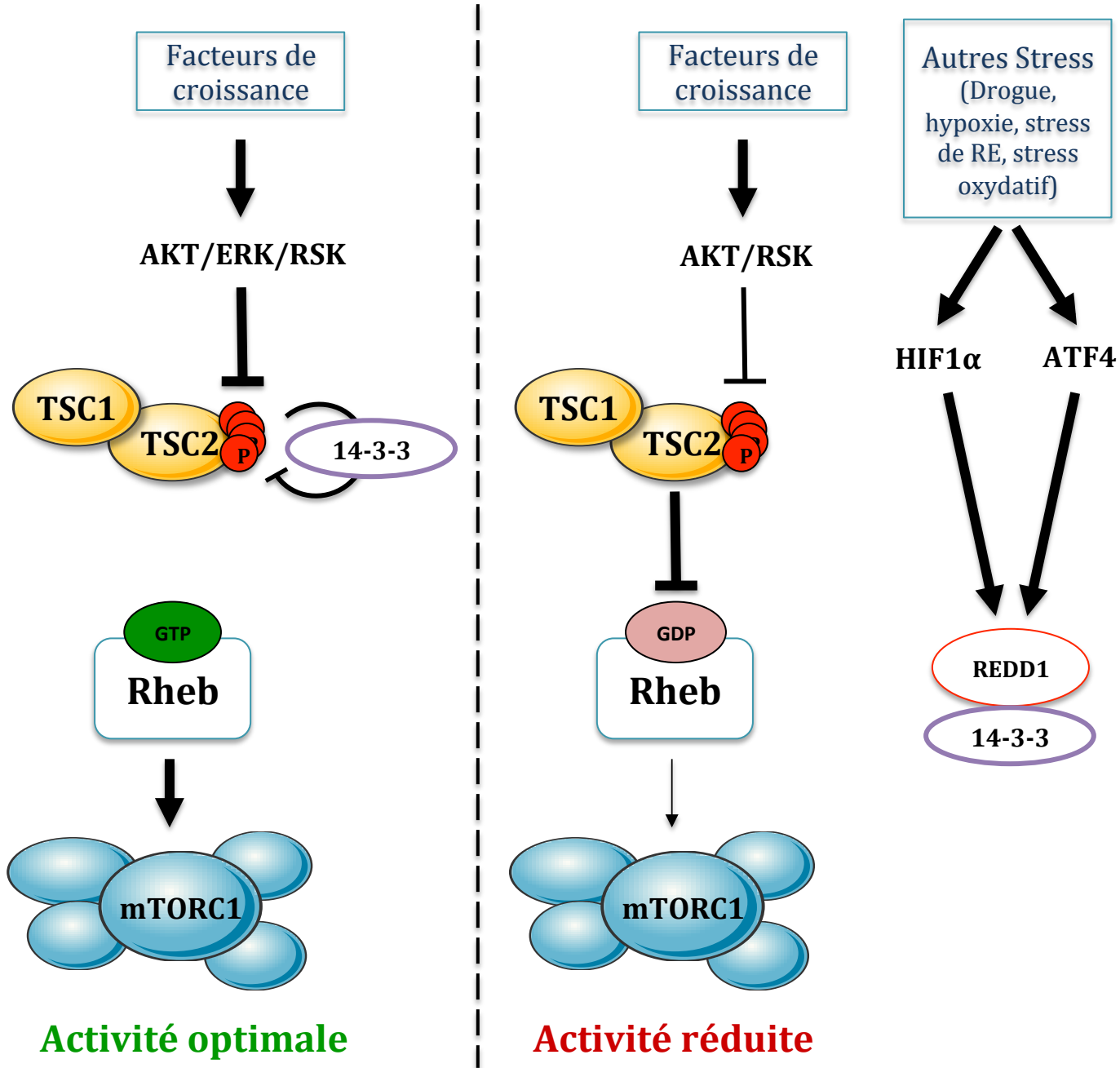


Figure 8 : Contrôle de mTORC1 par REDD1

En absence de stress cellulaire et en présence de facteurs de croissance, TSC2 est phosphorylé et inhibé par les kinases AKT, ERK et RSK notamment en favorisant le recrutement de 14-3-3 (voir figure 6) et mTORC1 est activé par Rheb-GTP. Sous différents stress cellulaires tels que l'hypoxie, un stress oxydatif ou un stress du réticulum endoplasmique, les facteurs de transcription HIF1 et ATF4 sont activés et favorisent l'expression de la protéine REDD1. REDD1 permettra la fixation des protéines 14-3-3 qui ne pourront plus inhiber le complexe TSC. Cette séquestration des protéines 14-3-3 par REDD1 diminue l'effet inhibiteur des différentes phosphorylations de TSC2 par AKT, ERK et RSK favorisant ainsi l'inhibition de Rheb et l'inactivation de mTORC1.

4). ATF4 déclenche un programme transcriptionnel visant à adapter ou à éliminer (apoptose) la cellule stressée en fonction de l'intensité du stress (Donnelly, Gorman et al. 2013). Il a été démontré que REDD1 était également induit via l'ISR, permettant l'inhibition de mTORC1 en réponse à de nombreux stress cellulaires autres que l'hypoxie tels qu'une carence en glucose (Jin, Seo et al. 2011), un stress du réticulum endoplasmique ainsi qu'un stress oxydatif (Jin, Seo et al. 2009, Whitney, Jefferson et al. 2009) et en réponse à certaines drogues (Jin, Seo et al. 2009, Ben Sahra, Regazzetti et al. 2011) (**Figure 8**).

En résumé, bien que mTORC1 soit principalement régulé par les facteurs de croissance, les acides aminés, le statut énergétique, de nombreux autres stress cellulaires potentiellement délétères entraîneront un '*quality control*' de l'activité mTORC1 via l'expression de REDD1 ; cette réduction limitant ainsi la consommation d'énergie et de nutriments dans le but de maintenir l'homéostasie et la survie cellulaire.

3.2. Régulation de mTORC2

Comparé à mTORC1, beaucoup moins de données sont disponibles sur la régulation de mTORC2. Ce complexe est insensible aux nutriments mais répond aux facteurs de croissance tels que l'insuline (**Figure 9**). En effet, l'activation de la voie PI3K par l'insuline entraîne l'activation de mTORC2 qui pourra ensuite phosphoryler ses différentes cibles telles que Akt, PKC et SGK1 (Sarbasov, Ali et al. 2004, Sarbasov, Guertin et al. 2005, Garcia-Martinez and Alessi 2008). Toutefois, le mécanisme connectant la voie PI3K à mTORC2 reste encore inconnu à ce jour. Cependant, il a été montré que le complexe TSC, qui inhibe mTORC1, est à l'inverse un activateur de mTORC2 (Huang, Dibble et al. 2008). En effet, des cellules fibroblastiques embryonnaires de souris invalidées pour TSC2 présentent une diminution d'activité mTORC2 *in vitro* (Huang, Dibble et al. 2008)(**Figure 9**). Il a également été montré que le complexe TSC était capable d'interagir physiquement avec mTORC2 pour favoriser son activation, un mécanisme totalement différent de mTORC1 où le complexe TSC inhibe mTORC1 par l'intermédiaire de l'inhibition de Rheb (Huang, Dibble et al. 2008).

D'autres études ont démontré que mTORC2 s'associe aux ribosomes en réponse aux facteurs de croissance. Les ribosomes sont nécessaires pour l'activité kinase de mTORC2 *in silico* et *in vitro* (Zinzalla, Stracka et al. 2011) démontrant que ceux-ci jouent un rôle important dans l'activation de mTORC2 par l'insuline (**Figure 9**).

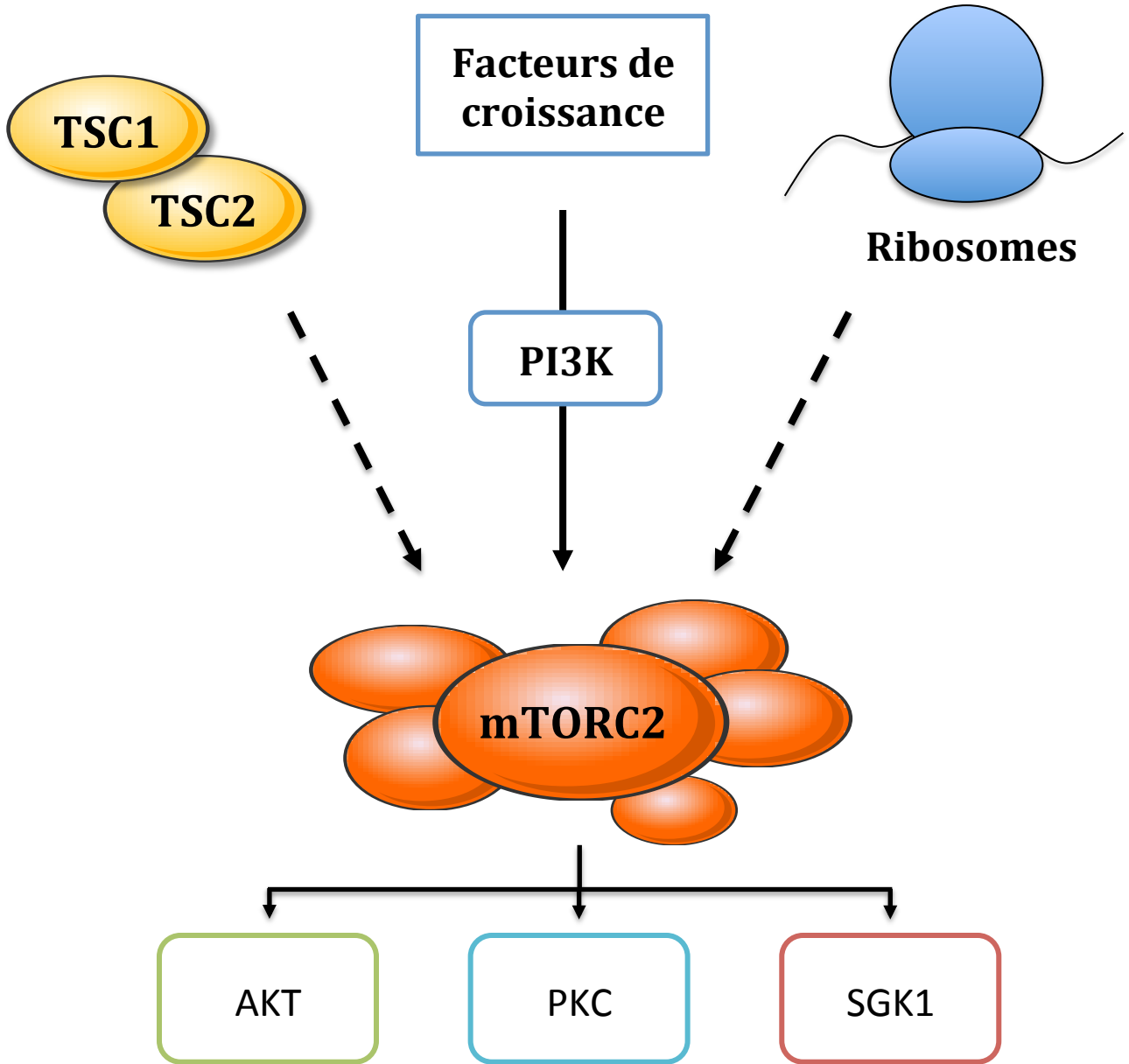


Figure 9 : Contrôle de l'activité de mTORC2

mTORC2 est activé par les facteurs de croissance par l'intermédiaire de la PI3K. Différentes études ont également suggéré que mTORC2 était activé par une interaction physique avec le complexe TSC ainsi que les ribosomes. Cependant les mécanismes moléculaires ne sont pas connus.

Le complexe mTORC2 régule l'activité des kinases AKT, PKC et SGK.

A l'heure actuelle, le contrôle de l'activité mTORC2 reste un champ de recherche sous-exploité. Cependant, suite à l'implication de mTORC2 dans certains types de cancers (Guertin, Stevens et al. 2009, Wu, Bi et al. 2014), nul doute que cette inconnue fera bientôt l'objet de découvertes fondamentales.

4. Fonctions cellulaires de la voie mTOR

4.1. Rôles de mTORC1

4.1.1. Régulation de la synthèse protéique

La synthèse protéique est un processus complexe essentiel au développement de toute vie sur cette planète. Lorsqu'un embryon ou une tumeur se trouve stimulé, la croissance (production de biomasse) devient un enjeu coûteux en énergie, tout particulièrement la biogénèse des ribosomes, structures essentielles à la synthèse des protéines. mTORC1 joue un rôle majeur dans ce mécanisme en coordonnant la synthèse des ribosomes et la traduction avec le statut énergétique ainsi que la disponibilité en nutriments. mTORC1 régule la synthèse protéique en contrôlant de manière directe ou indirecte l'activité de différents composants de la machinerie d'initiation de la traduction et notamment les protéines de la famille eIF4 (*Eukaryotic Initiation Factor 4*). Parmi les membres de cette famille, eIF4E est responsable du recrutement du complexe d'initiation au niveau de la coiffe des ARNm (structure : m⁷GpppN où le "m" représente un groupement méthyle, et le "N" désigne un nucléotide). mTORC1 contrôle l'activité d'eIF4E en phosphorylant sa protéine inhibitrice 4E-BP1 (Gingras, Raught et al. 2001, Hay and Sonenberg 2004). En effet, 4E-BP1 se lie étroitement à eIF4E. Comme 4E-BP1 est en concurrence avec eIF4G pour le même site de liaison sur eIF4E, 4E-BP1 empêche eIF4G d'interagir avec eIF4E (**Figure 10**). Lors de l'activation de mTORC1, 4E-BP1 est phosphorylé et se désolidarise de eIF4E, permettant le recrutement de eIF4G et par incidence de eIF4A à l'extrémité 5' d'un ARNm. Enfin, eIF3, la petite sous-unité ribosomique et le complexe ternaire (comprenant eIF2, Met-ARNt et GTP) sont recrutés sur la coiffe de l'ARNm, ce qui entraîne la formation du complexe ribosomal 48S et à terme l'initiation de la traduction (Gingras, Raught et al. 2001, Hay and Sonenberg 2004)(**Figure 10**). Si sept sites de phosphorylation par mTORC1 ont été décrits pour 4E-BP1, il n'existe pas de modèle consensus sur le rôle individuel de ces différentes phosphorylations de 4E-BP1. Cependant, il paraît clair que 4 de ces sites de

P Phosphorylation inhibitrice

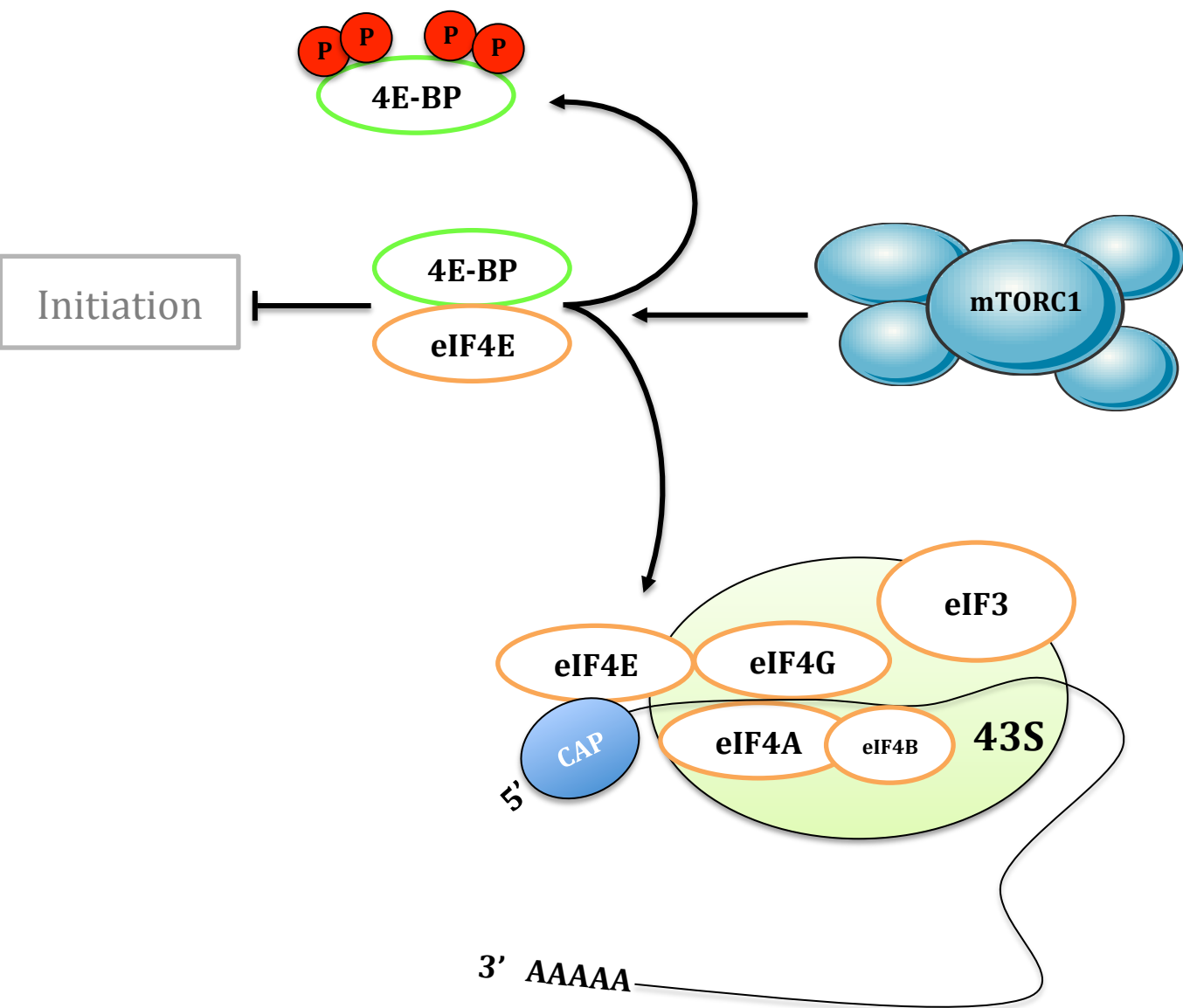


Figure 10 : Contrôle de la synthèse protéique par mTORC1 (1/2)

Lorsque mTORC1 est inactif, 4E-BP1 se lie étroitement à eIF4E inhibant ainsi l'initiation de la traduction. Lorsque mTORC1 est activé, 4E-BP est phosphorylé et relargue eIF4E permettant ainsi le recrutement de eIF4G, eIF4A, eIF4B ainsi que que le complexe de pré-initiation 43S au niveau de la coiffe de l'ARN messenger formant ainsi le complexe 48S et entraînant l'initiation de la traduction.

phosphorylations (Thr 37, Thr 46, Ser 65 et Thr 70) qui apparaissent de façon hiérarchique sont essentiels au mécanisme de relargage de eIF4E (Hay and Sonenberg 2004).

Deux autres cibles essentielles de mTORC1 dans la régulation de la synthèse protéique sont les protéines S6K1 et S6K2. Ces protéines, codées par deux gènes différents (Shima, Pende et al. 1998), sont des cibles directes de mTORC1 et favorisent la croissance cellulaire. De façon intéressante, tous les sites de phosphorylation sont conservés entre ces deux protéines qui semblent ainsi avoir une certaine redondance (Shima, Pende et al. 1998). Raptor (membre du complexe mTORC1) interagit avec le motif TOS (*TOR Signalling*) situé dans le domaine amino-terminal des protéines S6Ks et permet leur phosphorylation directe par mTORC1 sur le résidu Thr 389. Cette phosphorylation sert ensuite de site de fixation à PDK-1 (*Phosphoinositide Kinase 1*) qui phosphoryle à son tour les S6Ks sur leur résidu Thr 229, permettant ainsi l'activation totale de ces dernières (Pullen, Dennis et al. 1998, Biondi, Kieloch et al. 2001)(**Figure 11**). S6K2 a été découvert plus tard que S6K1 (Shima, Pende et al. 1998) : par conséquent, beaucoup plus de données sont disponibles sur l'impact de la phosphorylation de S6K1 que sur celle de S6K2. Toutefois, un rapport récent suggère que S6K2 semble avoir une plus grande activité kinase que S6K1 dans plusieurs tissus chez les souris adultes. En effet, le niveau de phosphorylation de la protéine S6 ribosomale (cible des S6Ks) est plus faible dans le foie et les muscles de souris invalidées pour la protéine S6K2 que dans ceux de souris KO pour la S6K1 (Pende, Um et al. 2004).

Le rôle des protéines S6K dans la croissance cellulaire a été attribué au fait que ces protéines favoriseraient de manière indirecte la traduction des ARNm de type 5'TOP (*Terminal OligoPyrimidine tract*). Ces ARNm, contenant une courte séquence de polypyrimidine adjacente à la coiffe de l'extrémité 5' (Hornstein, Tang et al. 2001), codent exclusivement pour des composants de la machinerie traductionnelle tels que les protéines ribosomales, les facteurs d'élongations et la PABP (*Poly(A) Binding Protein*). De nombreuses cibles des S6Ks ont été décrites telles que la protéine ribosomale S6 qui est la plus étudiée à ce jour. Il existe une hypothèse selon laquelle la régulation de la traduction par les S6Ks se fait par l'intermédiaire de la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 et que celle-ci est nécessaire au recrutement des ARNm de type 5'TOP au

P Phosphorylation inhibitrice **P** Phosphorylation activatrice

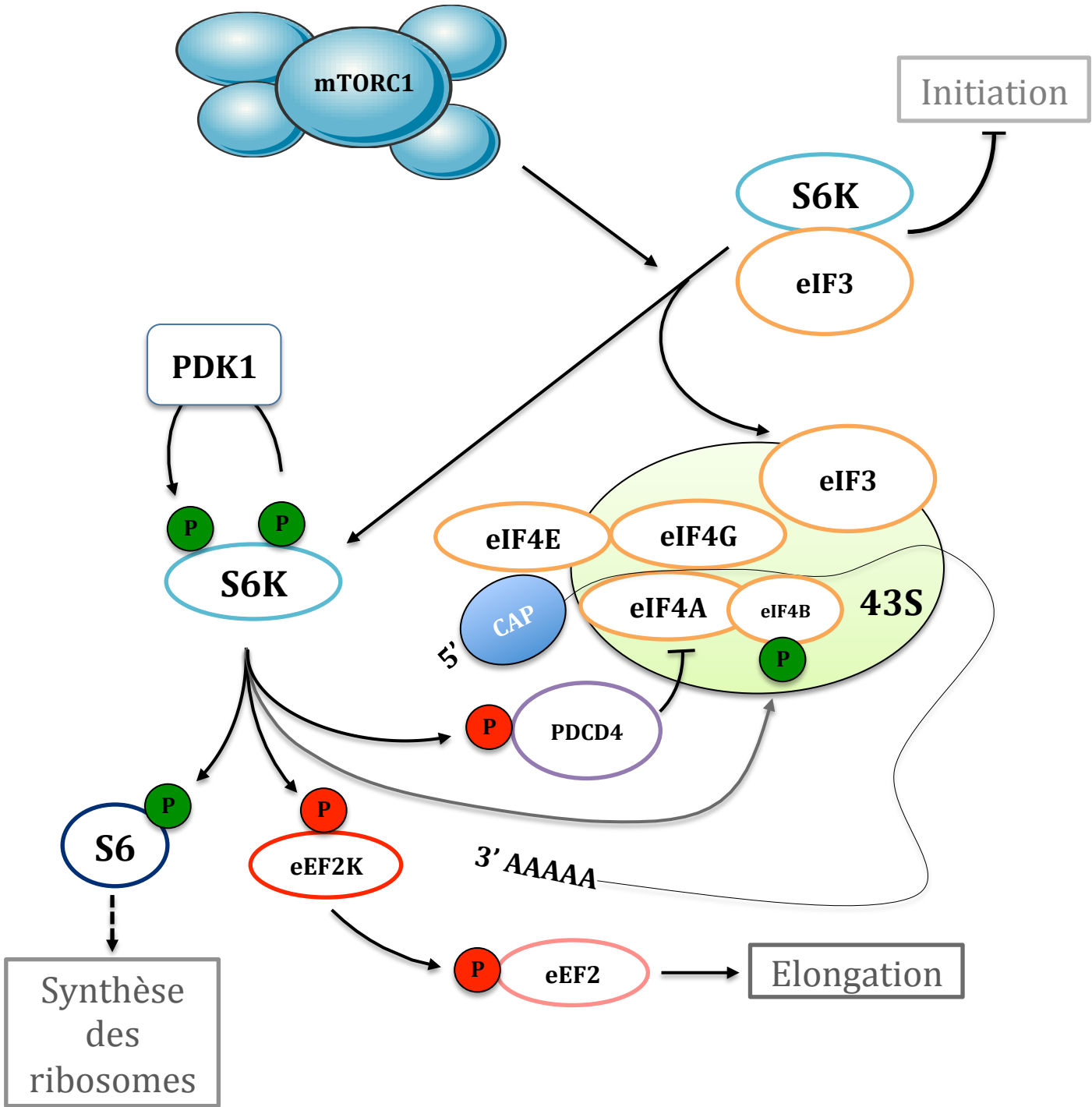


Figure 11 : Contrôle de la synthèse protéique par mTORC1 (2/2)

Lorsque mTORC1 est inactif, S6K interagit et inhibe eIF3 bloquant ainsi l'initiation de la transcription. Une fois activé, mTORC1 phosphoryle la S6K et entraîne le relargage de eIF3. La phosphorylation de S6K par mTORC1 favorise une seconde phosphorylation de S6K par PDK1 ce qui active S6K de façon optimale. Une fois activée, S6K phosphoryle et régule l'activité de eIF4B, PDCD4, eEF2K et S6 favorisant ainsi l'initiation et l'élongation de la traduction ainsi que la synthèse des ribosomes.

niveau des ribosomes (Thomas 2000). Cependant, cette hypothèse est très controversée dans la littérature. En effet, la traduction des ARNm de type 5'TOP est maintenue dans des cellules invalidées pour la S6K1 où la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 est indétectable (Tang, Hornstein et al. 2001, Stolovich, Tang et al. 2002). De plus, il a été démontré que cette synthèse de protéines spécifiques reste fonctionnelle dans des cellules souches embryonnaires invalidées pour les protéines S6K1 et 2 tout en restant sensible à la rapamycine, démontrant qu'un autre substrat du complexe mTORC1 régule ce mécanisme (Pende, Um et al. 2004). Cette controverse a été élucidée récemment par une étude démontrant que l'activation de la traduction des ARNm 5'TOP par mTORC1 était due à la phosphorylation de 4E-BP1 et de ce fait à la libération de eIF4E (voir ci-dessus et **Figure 10**). En effet, ce travail a démontré que la suppression de 4E-BP1 était suffisante pour rendre la traduction des ARNm 5'TOP insensible à l'inhibition de mTORC1 (Thoreen, Chantranupong et al. 2012).

Bien qu'elles ne régulent pas la traduction des ARNm 5'TOP, d'autres mécanismes peuvent expliquer le rôle des S6Ks dans la synthèse protéique et la croissance cellulaire. Tout d'abord, lorsqu'elle n'est pas phosphorylée, la S6K se fixe et inhibe le complexe avec eIF3 (**Figure 11**). Ce n'est qu'une fois activée par mTORC1 que la S6K se sépare de eIF3 lui permettant de se fixer au complexe d'initiation (Holz, Ballif et al. 2005) (**Figure 11**). De plus, après leur activation, les S6Ks vont phosphoryler et réguler de nombreuses autres protéines impliquées dans la synthèse protéique telles que eIF4B (Shahbazian, Roux et al. 2006), PDCD4 (programmed cell death 4) (Dorrello, Peschiaroli et al. 2006) et eEF2K (eukaryot elongation factor 2 kinase) (Wang, Li et al. 2001) (**Figure 11**). La phosphorylation de eIF4B par S6K1 augmente son activité, favorisant son interaction avec l'hélicase eIF4A et la traduction d'ARNm possédant une structure secondaire complexe (Shahbazian, Roux et al. 2006). PDCD4 est un inhibiteur de eIF4A, sa phosphorylation par la S6K1 entraînant sa dégradation et donc l'activation de eIF4A (Dorrello, Peschiaroli et al. 2006). Finalement, eEF2K est une kinase inhibitrice de eEF2, un facteur essentiel à l'élongation de la traduction. En phosphorylant eEF2K, la S6K1 l'inhibe et favorise de ce fait la synthèse protéique (Wang, Li et al. 2001) (**Figure 11**). Une étude récente a également suggéré que les protéines S6Ks, notamment *via* la phosphorylation activatrice de la protéine ribosomale S6, contrôlent la biogénèse des ribosomes (Chauvin, Koka et al. 2014) (**Figure 11**).

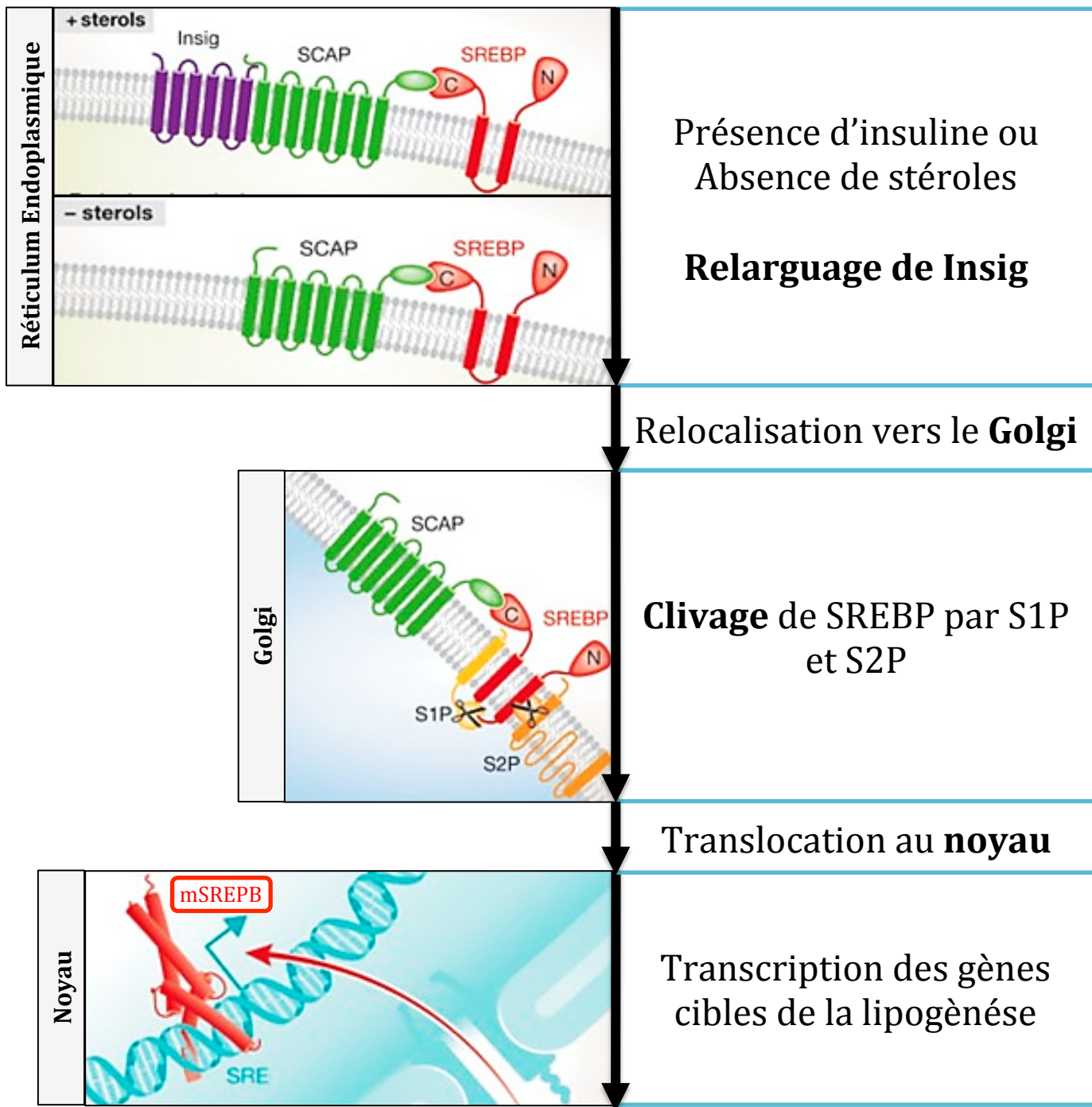


Figure 12 : Mécanisme d'activation des protéines SREBP

En l'absence de signaux d'activation, les protéines de type SREBP sont sous forme inactive et sont séquestrées au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique par un complexe formé de la protéine SCAP et INSIG. En réponse à l'insuline ou une carence en stérol, INSIG se dissocie de SREBP et SCAP, les SREBPs se relocalisent dans le Golgi où elles sont clivées par les protéines S1P et S2P (site-1/2 protéase) et transformées en leur forme active (mSREBP). Ensuite, les protéines mSREBP entrent dans le noyau où elles contrôleront l'expression de différents gènes cibles dont ceux de la lipogénèse. Adapté de Ricoult et *al.* EMBO rep. 2013

4.1.2. Régulation de la lipogenèse

Un autre rôle important de mTORC1 pour la croissance cellulaire est la régulation de la synthèse lipidique. Les lipides sont des composants essentiels à la construction et au maintien des membranes cellulaires. mTORC1 régule la biogénèse lipidique, notamment en contrôlant l'activité des protéines de la famille des SREBPs (*Sterol Regulatory Element-Binding Proteins*). Ces protéines sont des facteurs de transcription de type « *basic helix-loop-helix leucine zipper* » et régulent l'expression de nombreux gènes impliqués dans la lipogenèse (Horton, Goldstein et al. 2002). Trois membres de cette famille ont été étudiés : SREBP1a, SREBP1c et SREBP2. Les deux premières sont codées par le même gène (*SREBF1*) mais diffèrent au niveau du premier exon, alors que la dernière est codée par un gène indépendant. Les protéines SREBP1s sont impliquées dans la régulation de la synthèse des acides gras induite par l'insuline (lipogenèse *de novo*), alors que la protéine SREBP2 contrôle quant à elle la synthèse des stérols (Horton, Goldstein et al. 2002). En l'absence de signaux d'activation, les protéines de type SREBP sont sous formes inactives et séquestrées au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) par un complexe formé de la protéine SCAP (SREBP cleavage-acting protein) et INSIG (insulin-induced gene protein) (**Figure 12**). En réponse à l'insuline ou une carence en stérol, INSIG se dissocie de SREBP et de SCAP, ce qui induit la relocalisation des SREBPs dans l'appareil de Golgi où elles sont clivées par les protéines S1P et S2P (*site-1/2 protease*) et transformées en leurs formes matures et actives (appelées mSREBPs) (Horton, Goldstein et al. 2002). Une fois activées, ces protéines transitent vers le noyau et activent l'expression de différents gènes lipogéniques (**Figure 12**).

Le rôle de mTORC1 dans l'activation et la relocalisation nucléaire des SREBPs a été suggéré pour la première fois en 2008. Une étude a montré que l'accumulation de mSREBP1 dans le noyau de cellules épithéliales en réponse à une activation d'AKT était bloquée par un traitement à la rapamycine (Porstmann, Santos et al. 2008). Ces résultats concordent avec une étude antérieure qui a démontré que la rapamycine réduisait l'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse (Mauvoisin, Rocque et al. 2007). L'importance de mTORC1 dans l'activation de SREBP1 a également été confirmée *in vivo*. Des souris traitées à la rapamycine présentent une plus faible activation hépatique de SREBP1, associée à une chute d'expression des gènes essentiels à la synthèse des lipides (Yecies, Zhang et al. 2011). Cependant, malgré ce rôle confirmé de mTORC1 dans

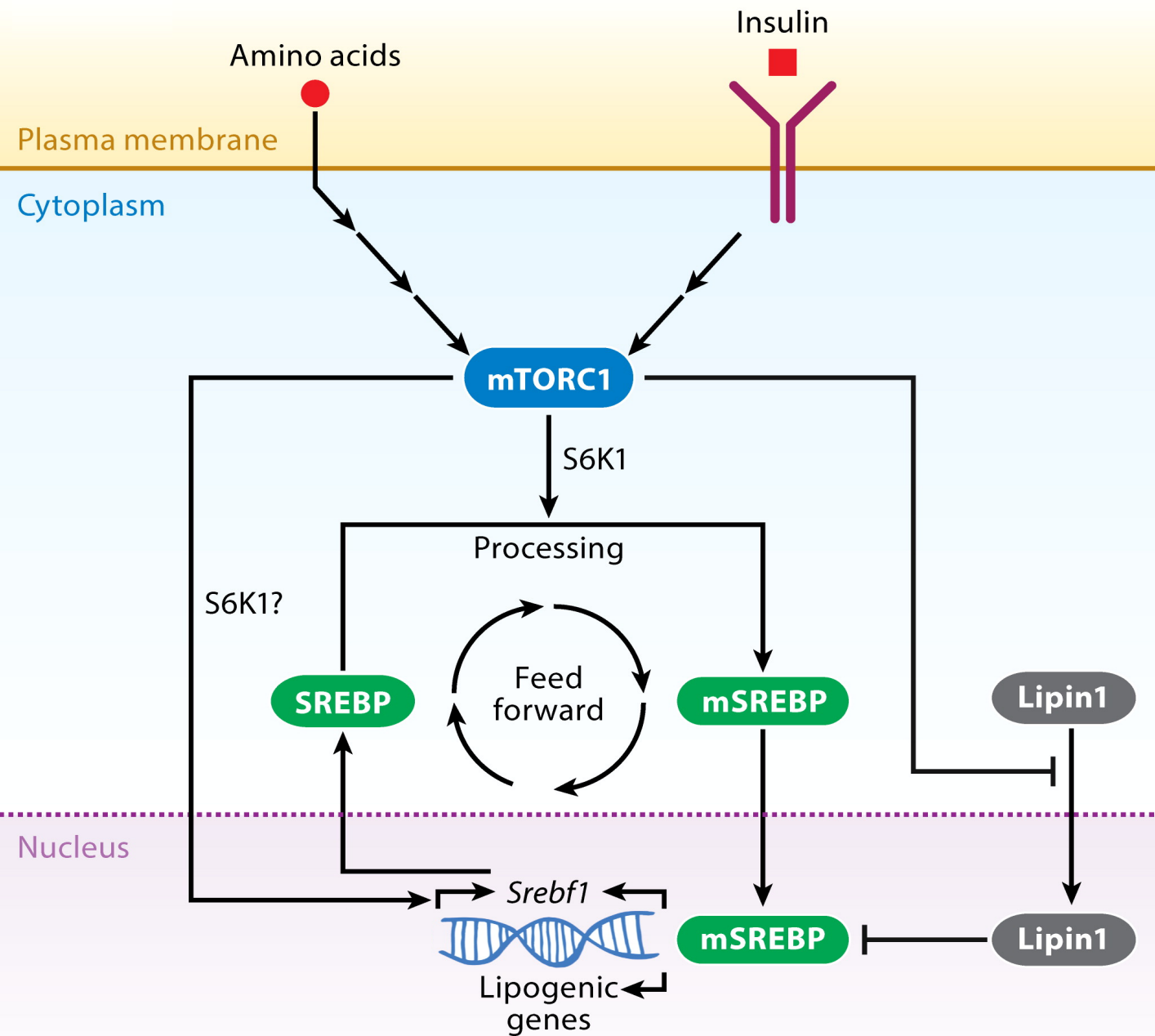


Figure 13 : Rôle de mTORC1 dans le contrôle de la lipogénèse.

Lorsqu'il est activé par les acides aminés et l'insuline, mTORC1 favorise la lipogénèse en favorisant la transcription et l'activation des SREBPs via S6K ainsi qu'en inhibant lipin 1, un régulateur négatif des mSREBPs. (Caron et al. Annu. Rev. Nutr. 2015)

l'activation des SREBPs, le mécanisme moléculaire reste encore mal connu. Des études ont révélé que la S6K1 (substrat de mTORC1) était essentielle à ce mécanisme, sans déterminer clairement le processus (El-Chaar, Gagnon et al. 2004, Li, Brown et al. 2010, Owen, Zhang et al. 2012) (**Figure 13**). Un autre mécanisme important par lequel mTORC1 régule les SREBPs passe par la LIPIN-1, une protéine nécessaire à la biosynthèse glycérolipide (Reue 2009). LIPIN-1 sert également de co-activateur transcriptionnel et régule l'expression des gènes de la lipogenèse (Reue 2009). Lorsque mTORC1 est inhibé, LIPIN-1 est accumulé dans le noyau où il s'associe aux mSREBPs et limite leur capacité à se fixer sur leurs gènes cibles. Lorsque mTORC1 est activé, il phosphoryle LIPIN-1 et entraîne son exclusion du noyau, laissant ainsi les mSREBPs agir (Peterson, Sengupta et al. 2011) (**Figure 13**). Enfin, mTORC1 contrôle également l'expression du gène *SREBF1* responsable de l'expression de SREBP1a et SREBP1c (**Figure 13**). En effet, plusieurs équipes de recherche ont observé, dans diverses conditions expérimentales, que l'induction de *SREBF1* sous traitement insuline est significativement réduite par l'inhibition pharmacologique ou génétique de mTORC1. Cependant le mécanisme sous-jacent n'est toujours pas clairement déterminé.

4.1.3. Régulation de la synthèse nucléotidique

Les nucléotides sont les éléments de base de la synthèse d'ADN et d'ARN, ils sont de ce fait absolument nécessaires à la croissance cellulaire. Un nucléotide est composé d'une base azotée (purine ou pyrimidine) liée par une liaison osidique à un sucre (ribose ou désoxyribose), lui-même lié par une liaison ester avec un phosphate. Une voie métabolique essentielle à la synthèse des nucléotides est la voie des pentoses phosphates (PPP), seule source cellulaire connue pour la synthèse du ribose. Le contrôle de mTORC1 sur la voie des pentoses phosphates se fait au niveau de l'expression d'enzymes-clés telles que la G6PD (*Glucose 6 Phosphate Deshydrogénase*) (Duvet, Yecies et al. 2010). En effet, l'expression de cette enzyme est augmentée lorsque mTORC1 est activé, cette augmentation étant sensible à la rapamycine. De plus, il semblerait que le contrôle de mTOR passe, comme pour la lipogenèse, par SREBP1 puisque l'utilisation d'un siRNA dirigé contre SREBP1 diminue fortement l'augmentation d'expression de la G6PD par mTORC1 (**Figure 14**) (Duvet, Yecies et al. 2010).

Associé à ce contrôle de la synthèse du ribose, mTORC1 régule également la synthèse des bases azotées. L'activation de mTORC1 augmente la production *de novo* de

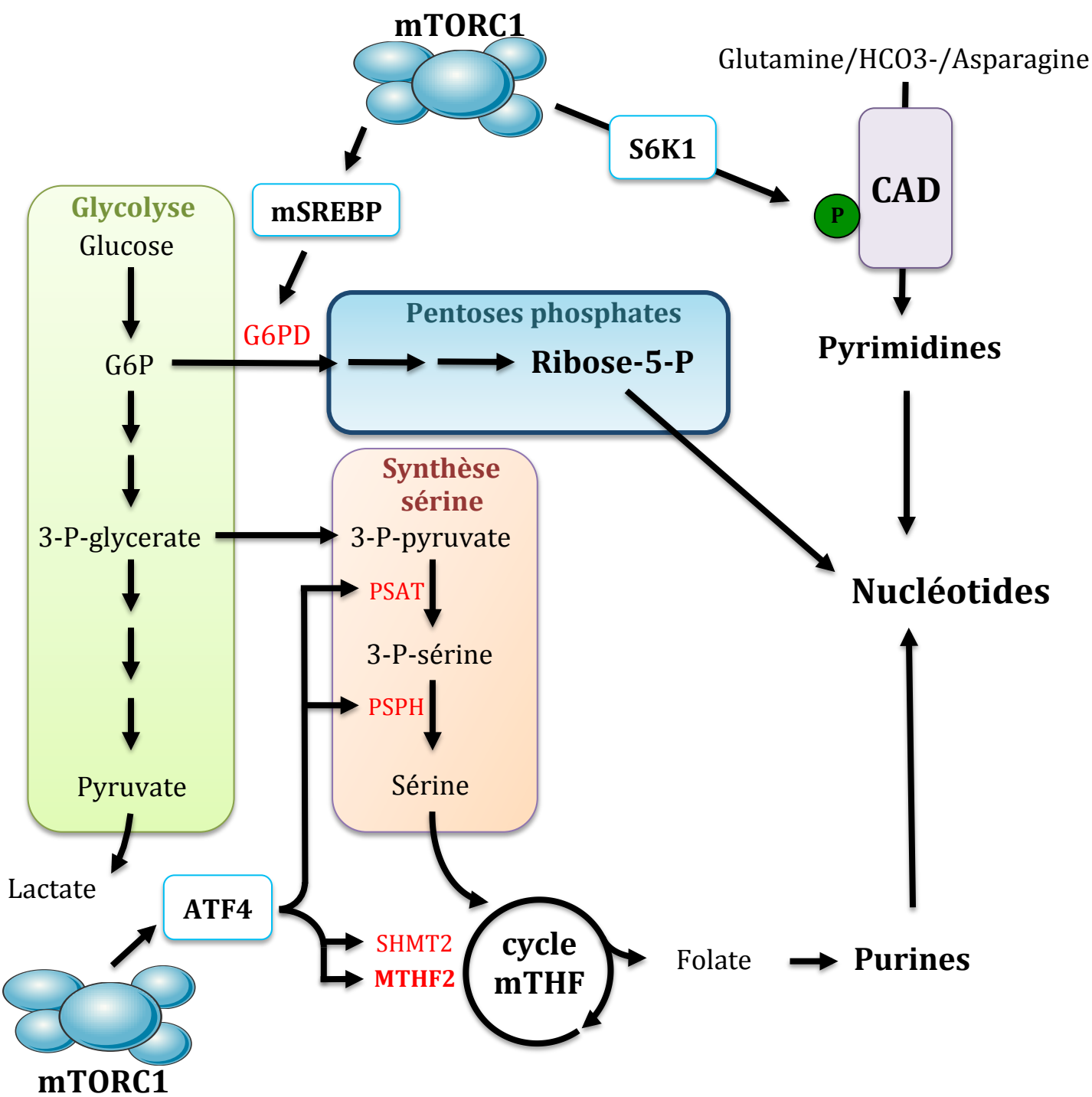


Figure 14 : Rôle de mTORC1 dans le contrôle de la synthèse nucléotidique

Lorsque le complexe mTORC1 est activé il favorise la synthèse nucléotidique en contrôlant l'activité de mSREBP et ATF4. mSREBP favorise l'expression de la G6PD ce qui augmentera l'entrée de G6P dans la voie des pentoses phosphates et la production de ribose. ATF4 va induire l'expression de certaines enzymes clés de la voie de synthèse de la sérine (PSAT, PSPH) et du cycle mTHF (Mitochondrial tetrahydrofolate) permettant la synthèse de formate et de purine. mTORC1 stimule également la synthèse de pyrimidine en phosphorylant et augmentant l'activité du complexe enzymatique CAD (carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydro-orotase) via S6K1.

purine et cette augmentation est sensible à l'utilisation d'inhibiteur de mTORC1 ou de S6K1 (Ben-Sahra, Howell et al. 2013, Robitaille, Christen et al. 2013). Cette induction est due au fait que la protéine S6K1 est capable de phosphoryler le complexe enzymatique CAD (*Carbamoyl-phosphate synthetase 2, Aspartate transcarbamylase and Dihydro-orotase*) en réponse à l'activation de mTORC1 (Ben-Sahra, Howell et al. 2013). Cette phosphorylation va activer le CAD en augmentant l'oligomérisation des membres de ce complexe, favorisant l'accessibilité à ses substrats (Robitaille, Christen et al. 2013). Une fois activé, ce complexe est capable de catalyser les trois premières étapes de la synthèse de la pyrimidine et de ce fait d'en augmenter la production (**Figure 14**). En plus de la pyrimidine, un article publié début 2016 par le groupe du Dr. Brendan Manning a démontré que mTORC1 contrôle également la synthèse de purine. Cette étude montre que l'activation de mTORC1 dans des cellules fibroblastiques embryonnaires de souris (MEF) augmente la synthèse de purine et que cette augmentation est sensible à un traitement rapamycine (Ben-Sahra, Hoxhaj et al. 2016). D'après ce travail, l'activation de mTORC1 entraîne la traduction du facteur de transcription ATF4 indépendamment de la phosphorylation de eIF2 α (cf. Introduction Chapitre II Partie 4.1.3). Ce facteur va induire l'expression de la MTHFD2 (*MethyleneTetraHydroFolate Deshydrogenase 2*) ainsi que certaines enzymes-clés de la voie de synthèse de la sérine (PSAT, PSPH) et du cycle mTHF (*Mitochondrial TetraHydroFolate SHMT2*). Cette voie va entraîner la production de formate, un élément essentiel de la synthèse de purine (Ben-Sahra, Hoxhaj et al. 2016)(**Figure 14**).

4.1.4. Participation au métabolisme énergétique

L'augmentation du métabolisme énergétique est une caractéristique obligatoire au maintien des différents processus anaboliques nécessaires à la croissance cellulaire. Plusieurs études ont démontré l'implication de mTORC1 dans l'augmentation de la production d'énergie en période de croissance. En effet, le facteur de transcription HIF-1 α , normalement dégradé en présence normale d'oxygène, peut tout de même être induit lorsque mTORC1 est fortement activé (Duvel, Yecies et al. 2010). Ce mécanisme, dû à une augmentation de sa traduction suite à l'inhibition de 4E-BP1 par mTORC1, favorise l'induction d'un programme transcriptionnel augmentant l'expression du transporteur de glucose GLUT1 ainsi que de nombreuses enzymes de la glycolyse (Duvel, Yecies et al. 2010) (**Figure 15**), ceci augmentant le flux glycolytique et donc la production d'énergie.

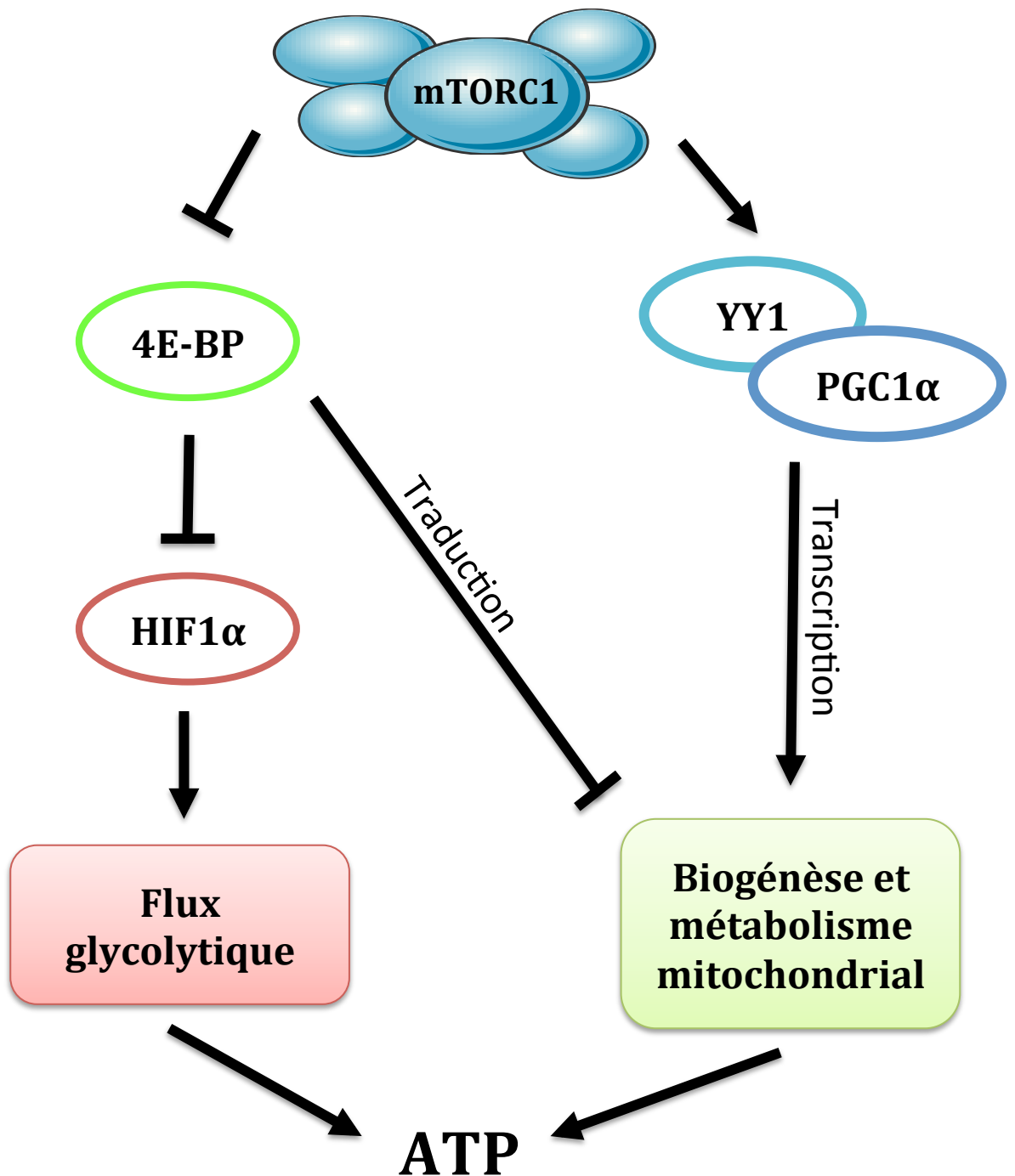


Figure 15 : Rôle de mTORC1 dans le contrôle du métabolisme énergétique

mTORC1 contrôle les deux axes du métabolisme énergétique. Dans un premier temps il favorise la traduction du facteur de transcription HIF1 en inhibant l'activité de 4E-BP1 ce qui favorise une augmentation du flux glycolytique en induisant l'expression de GLUT1 ainsi que de différentes enzymes de la glycolyse. Egalement l'inhibition de 4E-BP1 associée à l'activation de PGC1 α via son association avec YY1 permet la transcription et la traduction de différents gènes responsables de la biogénèse et du métabolisme mitochondrial. Dans l'ensemble, ces mécanismes régulés par mTORC1 favorisent la production d'ATP.

mTORC1 participe également au contrôle du métabolisme et de la biogénèse des mitochondries, organites essentiels à la production d'énergie. Une étude a démontré que l'inhibition de mTORC1 par la rapamycine réduit la consommation d'oxygène et diminue la concentration en ATP intracellulaire. De plus, la rapamycine altère complètement le phosphoprotéome mitochondrial (Schieke, Phillips et al. 2006). Il a également été observé que le nombre de copies de l'ADN mitochondrial, ainsi que l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme oxydatif, sont réduits par la rapamycine et augmentés par l'activation constitutive de mTORC1 (Cunningham, Rodgers et al. 2007). L'étude de Cunningham *et al.* démontre que ces effets sont dus au fait que mTORC1 favorise l'activité transcriptionnelle de PGC1- α (PPAR α *co-activator* 1), un co-facteur nucléaire jouant un rôle clé dans la biogénèse mitochondriale et le métabolisme oxydatif, en modifiant directement son interaction physique avec un autre facteur de transcription : YY1 (*Ying-Yang* 1) (**Figure 15**). Une autre étude plus récente a également mis en avant le rôle de mTORC1 dans le métabolisme mitochondrial. Les auteurs de cette étude ont démontré que mTORC1 contrôle la respiration mitochondriale par l'intermédiaire de l'inhibition de 4E-BP1 qui permet la traduction des ARNm responsables de la biogénèse mitochondriale (Morita, Gravel et al. 2013) (**Figure 15**). Ces études suggèrent donc que mTORC1 participe au contrôle du métabolisme oxydatif en orchestrant simultanément un programme transcriptionnel (PGC1- α) et traductionnel (4E-BP1) favorisant ainsi la production d'ATP.

4.1.5. Régulation du catabolisme

mTORC1 ne contrôle pas uniquement la croissance cellulaire et la prolifération en régulant l'anabolisme cellulaire : mTORC1 est également capable de réguler plusieurs processus cataboliques (**Figure 16**).

L'autophagie est un processus essentiel à la viabilité cellulaire qui se traduit par le ciblage des protéines cellulaires et des organites vers les lysosomes pour dégradation. Cela permet de réguler le renouvellement des organites et des protéines intracellulaires et de supprimer ceux dont la fonction est compromise, ceci dans le but de maintenir l'homéostasie cellulaire (Meijer and Codogno 2004). L'autophagie peut également être considérée comme un mécanisme de survie temporaire pendant des périodes de carence en nutriments (Degenhardt, Mathew et al. 2006). Ce procédé d'auto-digestion

P Phosphorylation inhibitrice

P Phosphorylation activatrice

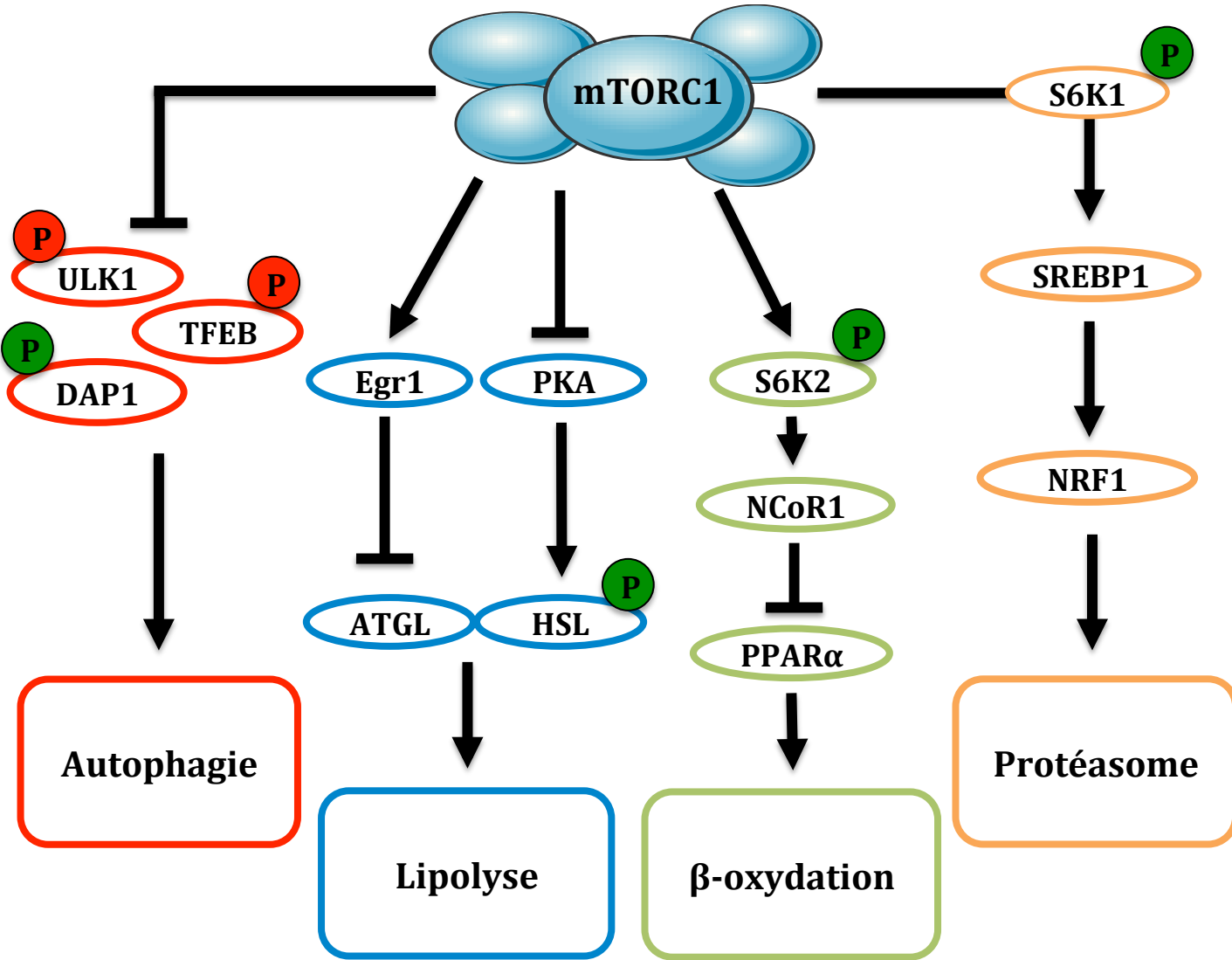


Figure 16 : mTORC1 régule le catabolisme cellulaire

mTORC1 est capable de contrôler différents mécanismes cataboliques. mTORC1 contrôle l'autophagie (en rouge) via la phosphorylation des protéines ULK1, DAP1 et TFEB. mTORC1 régule la lipolyse (en bleu) par l'intermédiaire de deux axes de signalisation : Egr1/ATGL et PKA/HSL. mTORC1 régule également la β -oxydation (en vert) via l'axe S6K2/Egr1/PPAR α . Pour terminer, mTORC1 contrôle l'activité du protéasome (en orange) par l'intermédiaire de l'axe S6K1/SREBP1/NRF1.

cellulaire fournit une source de nutriments et d'énergie alternative à la cellule. Cependant, une forte activation de l'autophagie limite la croissance et la prolifération cellulaire (Degenhardt, Mathew et al. 2006, Young, Narita et al. 2009). Dans les cellules de mammifères, mTORC1 phosphoryle et inhibe ULK1 (*Unc-51-Like Kinase 1*), un complexe requis pour l'initiation de l'autophagie (Ganley, Lam du et al. 2009, Hosokawa, Hara et al. 2009). De plus, mTORC1 est également capable de phosphoryler et d'activer DAP1 (*Death-Associated Protein 1*), un inhibiteur du procédé autophagique (Koren, Reem et al. 2010). mTORC1 contrôle aussi indirectement l'autophagie en régulant l'expression de gènes requis pour la biogenèse des lysosomes. En effet, quand il est activé, mTORC1 phosphoryle le facteur de transcription TFEB (*Transcription Factor EB*) ce qui entraînera sa séquestration dans le cytoplasme et donc son inhibition (Martina, Chen et al. 2012, Settembre, Zoncu et al. 2012). A l'inverse, l'inhibition pharmacologique de mTORC1 conduit à la déphosphorylation et à la translocation nucléaire de TFEB. Une fois dans le noyau, TFEB favorise la transcription des gènes codants pour des protéines nécessaires à la biogenèse des lysosomes et à l'autophagie. En résumé, quand l'environnement est riche en nutriments, l'activation de mTORC1 favorise la croissance cellulaire en réduisant de façon directe (ULK1) et indirecte (DAP1 et TFEB) le flux autophagique à son niveau basal. Lorsque les nutriments manquent, l'inhibition de mTORC1 favorise la survie cellulaire en activant ULK1, TFEB, et en inhibant DAP1 ce qui entraînera l'augmentation du flux autophagique et l'utilisation de sources nutritives et énergétiques alternatives afin de survivre à la période de carence (**Figure 16 - en rouge**).

La lipolyse est le procédé qui permet la dégradation et la libération des lipides stockés au préalable sous forme de glycérides par certains types cellulaires (adipocytes) afin d'être réutilisés comme source de carbone et d'énergie dans les tissus périphériques en période de carence nutritive. Le rôle de mTORC1 sur la lipolyse du tissu adipeux a été suggéré par les observations faites dans diverses conditions expérimentales. Tout d'abord, il a été rapporté que les humains et les modèles animaux traités avec de la rapamycine montrent une augmentation significative de la concentration des acides gras dans le sang (Morrisett, Abdel-Fattah et al. 2003, Aggarwal, Fernandez et al. 2006, Houde, Brule et al. 2010). Egalement, des études *in vitro* sur des adipocytes primaires ont démontré que la rapamycine augmentait le niveau de lipolyse dans ces cellules (Chakrabarti, English et al. 2010, Pereira, Palming et al. 2013). A l'inverse, l'activation de

mTORC1 dans des cellules 3T3-L1 inhibe la lipolyse (Chakrabarti, English et al. 2010), suggérant ainsi que mTORC1 contrôle négativement ce procédé. Différents mécanismes moléculaires ont été proposés pour expliquer la régulation de la lipolyse par mTORC1. Une première étude a démontré que l'activation de mTORC1 par l'insuline augmente le niveau d'expression de Egr1 (*Early Growth Respons 1*), un facteur de transcription capable d'inhiber, en se fixant sur son promoteur, l'expression de ATGL, l'enzyme responsable de la première étape du procédé lipolytique (Chakrabarti, Kim et al. 2013) **(Figure 16 – en bleu)**. Une seconde étude a démontré un autre mécanisme indépendant de Egr1 et ATGL. Les auteurs ont découvert que l'inhibition de mTORC1 avec de la rapamycine augmente le niveau la phosphorylation de la protéine HSL (*Hormone Sensitive Lipase*) par l'intermédiaire de la protéine kinase A (PKA) (Soliman, Acosta-Jaquez et al. 2010). Cette phosphorylation qui a lieu sur le résidu Ser563 favorise l'activité de cette lipase, nécessaire à la dégradation complète des triglycérides lors de la lipolyse (Shen, Patel et al. 1998) (Figure 16 – en bleu). Cependant, la connexion entre l'inhibition de mTORC1 et la PKA reste inconnue.

La β -oxydation est un procédé qui permet la dégradation et l'utilisation des acides gras comme source de carbone et d'énergie. Lors d'un jeûne prolongé en glucose, les cellules adipocytaires relarguent dans la circulation sanguine les acides gras qu'elles avaient stockés au préalable. Ces nutriments seront ensuite utilisés par les cellules des tissus périphériques comme source de carbone et d'énergie alternative au glucose grâce à la β -oxydation. Différentes études ont impliqué mTORC1 dans la régulation de la β -oxydation *in vitro* (Peng, Golub et al. 2002) et *in vivo* (Sipula, Brown et al. 2006). La confirmation du rôle clé de mTORC1 dans le contrôle de la β -oxydation a été mise en évidence par l'utilisation de souris transgéniques ayant une activation constitutive de mTORC1 dans le foie. En effet, l'activation constitutive de mTORC1 dans le foie de souris réduit considérablement la capacité des hépatocytes à activer la β -oxydation en réponse au jeûne (Sengupta, Peterson et al. 2010). De plus, cet effet est corrélé à un sévère défaut dans l'expression des gènes favorisant le catabolisme des acides gras. A l'inverse, la suppression de Raptor (composant essentiel de mTORC1) augmente l'expression de ces mêmes gènes, confirmant ainsi le rôle central de mTORC1 dans le contrôle de la β -oxydation (Sengupta, Peterson et al. 2010). Cependant, le contrôle exercé par mTORC1 est indirect et passe par le contrôle de NCoR1 (*Nuclear Receptor Corepressor 1*). NCoR1 est un régulateur de la transcription se fixant sur différents récepteurs nucléaires et

supprimant leur activité. Par un mécanisme encore inconnu, la S6K2 est capable d'activer et de relocaliser NCoR1 dans le noyau où ce dernier inhibera PPAR α , un facteur de transcription contrôlant l'expression de gènes impliqués dans la β -oxydation (Kim, Pyo et al. 2012) (**Figure 16 – en vert**). Cependant, ce mécanisme reste encore mal compris et des études supplémentaires sont nécessaires.

Le protéasome est un complexe enzymatique multi-protéique responsable de la dégradation et du recyclage des protéines mal repliées dans le cytoplasme. L'activation constitutive de mTORC1 induit une augmentation de la synthèse protéique et peut entraîner l'apparition de protéines mal repliées, conduisant à un stress du réticulum endoplasmique pouvant mener à la mort cellulaire (Kim, Pyo et al. 2012). Une étude récente a démontré que mTORC1 était capable de contre-balancer lui-même la production de protéines mal formées. En effet, l'activation de mTORC1 dans des cellules de souris et humaines augmente la dégradation protéique et est corrélée à une accumulation du nombre de protéasomes intacts et actifs dans la cellule, ceci étant dû à une augmentation globale de l'expression des gènes codant pour des sous-unités du protéasome (Zhang, Nicholatos et al. 2014). Les auteurs de cette étude ont démontré que mTORC1 active SREBP1 (voir partie 4.1.2) qui favorisera l'activation de NRF1 (*Nuclear factor erythroid-derived 2 - Related Factor 1*), un facteur de transcription contrôlant l'expression des gènes du protéasome (**Figure 16 – en orange**). De ce fait, mTORC1 est capable d'optimiser la synthèse protéique tout en contrôlant l'apparition de protéines mal repliées pouvant avoir un effet délétère pour la viabilité cellulaire.

4.2. Rôles de mTORC2

4.2.1. Régulation de la survie et de la prolifération cellulaire

Tout comme pour sa régulation, les fonctions cellulaires de mTORC2 restent encore méconnues comparées à celles de mTORC1 et le manque d'inhibiteurs spécifiques de mTORC2 en est la principale raison. Cependant, il est clair que ce complexe est essentiel au développement cellulaire puisque son invalidation entraîne la mort précoce d'embryons de souris (Guertin, Stevens et al. 2006) et diverses approches génétiques ont démontré le rôle-clé de mTORC2 dans différents procédés biologiques. mTORC2 contrôle différents membres de la famille des kinases AGC et notamment AKT et SGK1 (*Serum and Glucocorticoid-induced protein Kinase 1*). AKT régule de nombreux processus cellulaires tels que le métabolisme, la survie, l'apoptose, la croissance et la

P Phosphorylation inhibitrice

P Phosphorylation activatrice

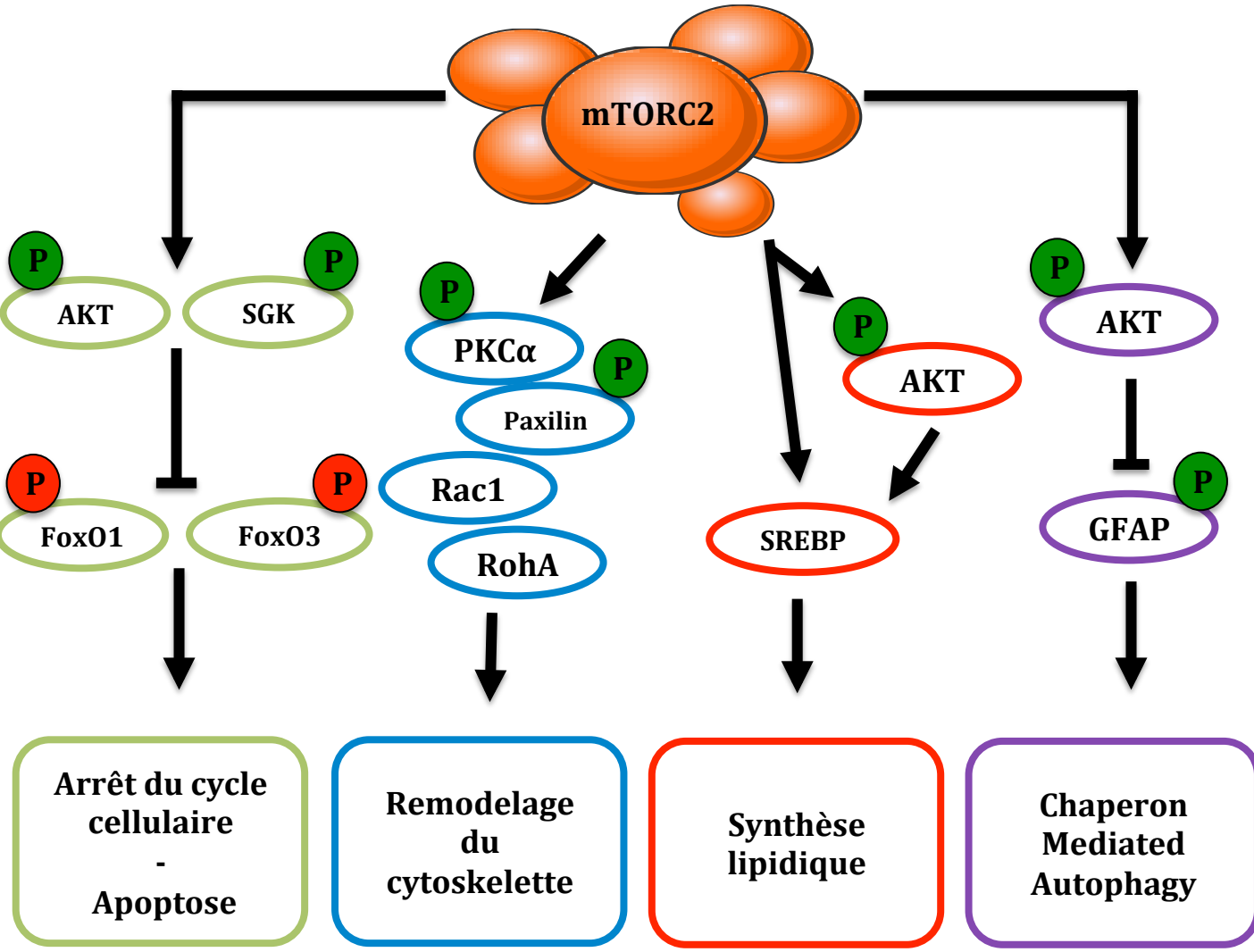


Figure 17 : Rôles cellulaires du complexe mTORC2

mTORC2 contrôle de multiples procédés cellulaires principalement via la phosphorylation activatrice des protéines AKT et SGK et PKCα. Ces trois protéines sont capables de contrôler l'activité de nombreuses cibles impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose (en vert), du remodelage du cytosquelette (en bleu), de la synthèse lipidique (en rouge) ainsi que de la « Chaperon Mediated Autophagy » (en violet).

prolifération à travers la phosphorylation de plusieurs effecteurs (voir revue (Manning and Cantley 2007)). En réponse aux facteurs de croissance, mTORC2 active directement AKT par phosphorylation sur la Ser473 située dans son motif hydrophobe (Sarbasov, Guertin et al. 2005). Cette phosphorylation, associée à la phosphorylation de la thr308 par PDK1, est nécessaire à l'activité maximale d'AKT, qui peut ainsi réguler divers processus cellulaires (Manning and Cantley 2007). Toutefois, plusieurs travaux ont montré qu'en fonction de son statut de phosphorylation, AKT régule différemment ses substrats. L'inhibition de la phosphorylation d'AKT sur la ser473 par ablation de mTORC2 bloque la phosphorylation des facteurs de transcription FoxO, 1 et 3 (*Forkhead O*) alors qu'elle n'a aucun effet sur d'autres cibles d'AKT telles que GSK3- β et TSC2 (Jacinto, Loewith et al. 2004, Guertin, Stevens et al. 2006). mTORC2 régule également la phosphorylation des protéines FoxO en contrôlant l'activité de SGK1. En effet, l'ablation de mTORC2 supprime l'activation de SGK1 (Garcia-Martinez and Alessi 2008). Les facteurs de transcription FoxO favorisent l'expression de protéines entraînant l'apoptose et l'inhibition du cycle cellulaire. Ces protéines sont inhibées lorsqu'elles sont phosphorylées par AKT ou SGK1 (Calnan and Brunet 2008) (**Figure 17 – en vert**). Ainsi, l'activation de mTORC2 par les facteurs de croissance va favoriser la survie et la prolifération cellulaire en phosphorylant AKT et SGK1 qui inhiberont à leur tour les facteurs de transcription FoxO 1 et 3.

4.2.2. Remodelage du cytosquelette

De nombreux groupes indépendants ont observé que la délétion des composants de mTORC2 perturbe la polymérisation de l'actine et affecte la morphologie cellulaire (Jacinto, Loewith et al. 2004, Sarbasov, Ali et al. 2004). Ces études ont suggéré que mTORC2 contrôle le cytosquelette d'actine par plusieurs mécanismes : **1**) en activant par phosphorylation d'une autre protéine de la famille des kinases AGC : la protéine kinase C α (PKC α), **2**) en phosphorylant et en entraînant la relocalisation de paxillin sur le site d'adhésion focal ou encore **3**) en favorisant la forme GTP des protéines RhoA et Rac1 (**Figure 17 – en bleu**). Cependant, le mécanisme moléculaire impliquant mTORC2 dans ces mécanismes reste encore inconnu.

4.2.3. Régulation de la synthèse lipidique

Bien que le contrôle de la lipogenèse fût principalement étudié par rapport à mTORC1, des études récentes indiquent que mTORC2 joue également un rôle important

dans la régulation de la synthèse des lipides. En effet, la délétion de Rictor dans le foie ainsi que le tissu adipeux brun perturbe fortement la biogénèse lipidique dans ces deux organes (Hagiwara, Cornu et al. 2012, Hung, Calejman et al. 2014). Le contrôle de mTORC2 sur la lipogénèse se fait comme pour mTORC1 par l'intermédiaire de SREBP1, cependant le mécanisme d'activation n'est pas encore élucidé. Une étude a rapporté que l'inhibition de mTORC2 cause une chute d'activité d'AKT qui entraîne l'inhibition de SREBP1 et donc de la lipogénèse (Hung, Calejman et al. 2014) (**Figure 17 - en rouge**). Cependant, ces résultats sont contradictoires avec une autre étude qui défend l'idée que la régulation de SREBP1 par mTORC2 est indépendante d'AKT puisque la surexpression de ce dernier n'a aucun effet sur la régulation entre mTORC2 et SREBP1 (Yuan, Pino et al. 2012). Cette étude avance que l'inactivation de mTORC2 est associée à une importante réduction de l'activité mTORC1, expliquant une diminution de l'activation de SREBP et de la lipogénèse (Yuan, Pino et al. 2012). Les raisons des différences entre ces deux études sur la régulation de SREBP1 par mTORC2 ne sont pas connues et des travaux complémentaires sont nécessaires afin d'élucider complètement le rôle de mTORC2 dans la synthèse lipidique.

4.2.4. Régulation de la « *Chaperone-Mediated-Autophagy* »

La « *Chaperone-Mediated-Autophagy* » (CMA) est une forme sélective de l'autophagie qui participe à la dégradation de certaines protéines cytoplasmiques cibles dans les lysosomes. La CMA contribue au maintien de l'homéostasie protéique et à l'adaptation cellulaire aux stress tels qu'une carence en nutriments ou l'accumulation de protéines mal repliées. Brièvement, les substrats de la CMA (protéines comprenant le motif KFERQ) sont pris en charge dans le cytoplasme par la protéine chaperonne Hsc70 qui relocalisera la protéine cible au niveau de la surface du lysosome où elle sera internalisée par un complexe de translocation membranaire contenant la protéine LAMP-2A (Kaushik and Cuervo 2012).

Une étude récente a démontré le rôle inhibiteur de mTORC2 sur ce procédé (Arias, Koga et al. 2015). Les auteurs ont démontré que mTORC2 ainsi que sa protéine substrat AKT se relocalisent au niveau de la surface d'un type spécifique de lysosome dédié à la CMA. Lorsque mTORC2 est actif, il phosphoryle et active AKT qui phosphorylera à son tour la protéine GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) (Arias, Koga et al. 2015), possédant un rôle modulateur essentiel à l'assemblage du complexe de

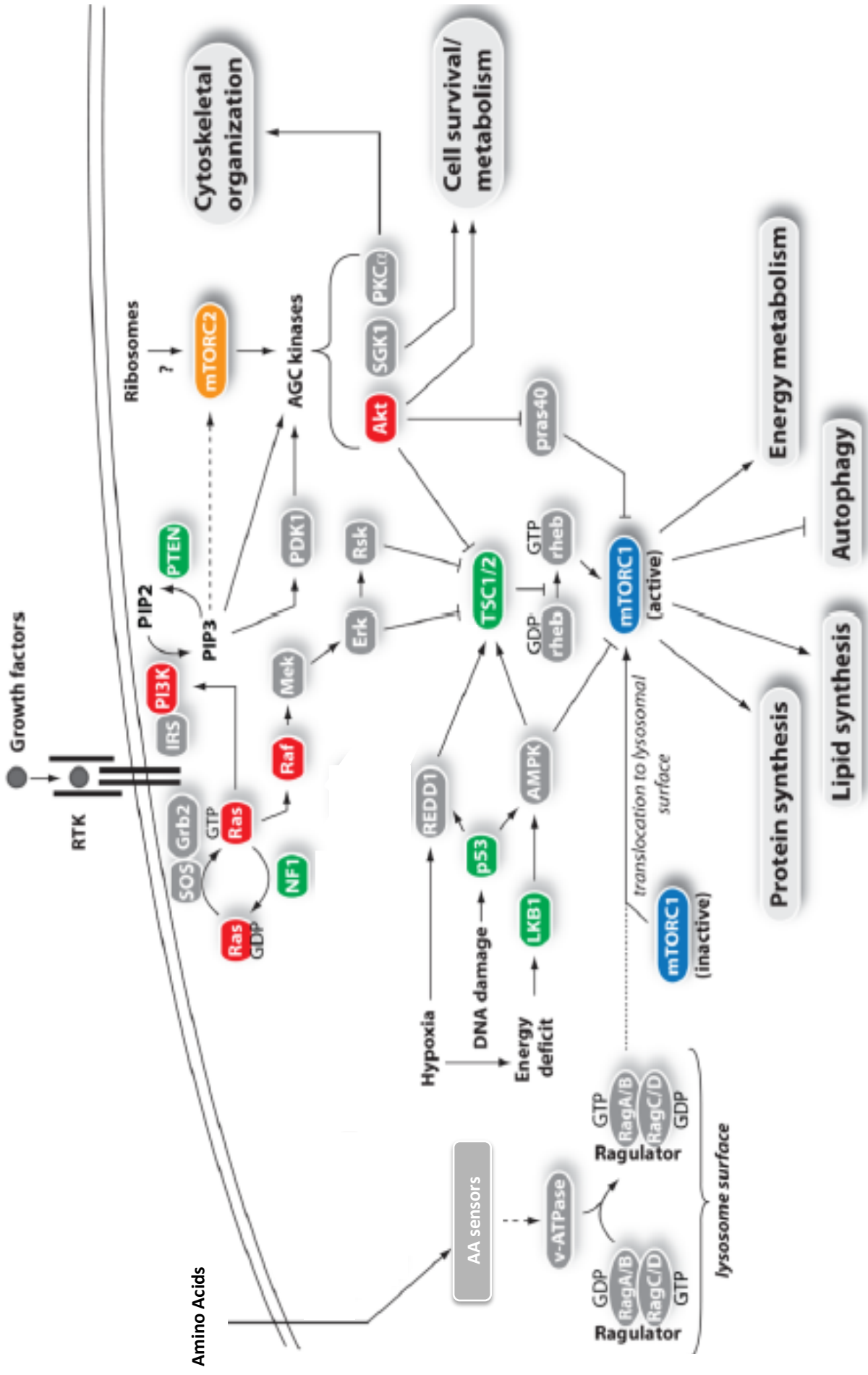


Figure 18 : Activation oncogénique de la voie mTOR

Sur ce schéma, résumant la régulation et les rôles cellulaires des deux complexes mTORC1 (bleu) et mTORC2 (orange), sont représentés les différents régulateurs fréquemment mutés en aval de ces deux complexes et qui conduisent à leur activation aberrante dans les cancers. Les oncogènes sont représentés en rouges et les suppresseurs de tumeurs en vert. (Laplante *et al.* Cell 2012)

translocation (Bandyopadhyay, Sridhar et al. 2010). Lorsqu'il n'est pas phosphorylé, GFAP se lie à LAMP-2A dans le complexe de translocation et contribue à sa stabilisation. La phosphorylation de GFAP, en revanche, diminue son affinité pour LAMP-2A et inhibe son action de stabilisation du complexe de translocation et de ce fait la CMA (Bandyopadhyay, Sridhar et al. 2010) (**Figure 17 – en violet**). Ainsi, mTORC2, par l'intermédiaire d'AKT et GFAP, régule négativement la CMA (Arias, Koga et al. 2015). mTORC1 et mTORC2 agissent donc de concert pour réguler les différents types d'autophagie et pour favoriser la croissance cellulaire quand les conditions environnementales sont favorables.

5. mTOR et Cancer

5.1. Activation oncogénique de la voie mTOR

Une cellule tumorale est majoritairement caractérisée par sa capacité à proliférer de façon non-contrôlée indépendamment de la présence ou non des facteurs de croissance (Hanahan and Weinberg 2000). Cette indépendance envers les facteurs de croissance est majoritairement due à différents événements oncogéniques entraînant une activation 'constitutive' de mTOR dans la majorité des cancers (**Figure 18**) (Menon and Manning 2008). La voie mTOR contrôle la croissance et la prolifération cellulaires en coordonnant différents procédés biosynthétiques avec le statut nutritif local (glucose, acides aminés, énergie...) et systémique (facteurs de croissance). En condition normale, le contrôle de la voie mTOR par les facteurs de croissance s'effectue par l'intermédiaire des voies PI3K-AKT (mTORC1 et mTORC2) et ERK-p90RSK (mTORC1). Ces deux voies de signalisation sont composées en grande partie par des oncogènes tels que les récepteurs tyrosine kinase, Ras, B-RAF, PI3K, AKT ou ERKs (Figure 18). Au cours de la carcinogenèse, leurs mutations ou amplifications géniques sont des événements fréquents, ce qui entraîne une activation constitutive de ces voies et donc une indépendance de la voie mTOR envers les facteurs de croissance (revues : (Engelman, Luo et al. 2006, Shaw and Cantley 2006, Roberts and Der 2007)). En plus des mutations « gain de fonction » de ces oncogènes, certains gènes suppresseurs de tumeurs tels que PTEN et NF1 sont également fréquemment mutés et inactivés au cours du développement tumoral. Ceci provoque ainsi une perte du contrôle des voies associées, PI3K et ERK, conduisant à une activation constitutive de mTORC1 (Manning, Tee et al. 2002, Johannessen, Reczek et al. 2005) (**Figure 18**).

D'autres oncogènes et suppresseurs de tumeur convergent également au niveau de la régulation des mTORC1. Par exemple, le gène suppresseur de tumeur LKB1 est un activateur de l'AMPK essentielle à l'inhibition de mTORC1 dans des conditions de stress de l'énergie. Des mutations induisant une perte d'expression ou d'activité de LKB1 sont fréquemment retrouvées dans le cancer du poumon non à petites cellules. Par conséquent, dans ce type de cancer, la signalisation mTORC1 est augmentée et n'est plus sensible aux perturbations des niveaux de l'ATP intracellulaires (Shaw, Kosmatka et al. 2004) **(Figure 18)**. Aussi, la mutation de P53 un autre gène suppresseur de tumeur, favorise l'activation de mTORC1 (Feng, Zhang et al. 2005, Laplante and Sabatini 2012) **(Figure 18)**.

Enfin, des mutations dans les gènes codant pour les composants du complexe GATOR1 par mTORC1 ont été détectées dans des cancers du rein, foie, cerveau, poumon, sein et ovaires (Li, Wang et al. 2004, Ueda, Kawashima et al. 2006, Miki, Ochi et al. 2011, Yogurtcu, Hatemi et al. 2012, Bar-Peled, Chantranupong et al. 2013). Ces mutations rendant mTORC1 insensible aux variations de concentration en acide aminés ont été décrites comme favorisant la prolifération tumorale.

5.2. mTOR et progression tumorale

De nombreuses études démontrent l'implication de l'activation aberrante de mTOR dans le développement et la progression tumorale. Il a été démontré que l'inactivation de 4E-BP1 dans des cellules fibroblastiques embryonnaires de souris augmentait leur prolifération *in vitro*. Egalement, eIF4E, protéine inhibée par 4E-BP1, a été décrite comme possédant de nombreuses propriétés oncogéniques (Lazaris-Karatzas, Montine et al. 1990, Ruggero, Montanaro et al. 2004, Wendel, De Stanchina et al. 2004). De ce fait, ces études suggèrent que mTORC1 peut favoriser la prolifération en inhibant 4E-BP1. Cet effet pro-tumoral est dû au fait que mTORC1, par l'intermédiaire de l'inhibition de 4E-BP1, favorise la traduction spécifique des ARNm de type 5'TOP (Ma and Blenis 2009). Parmi ces ARNm se trouvent ceux codants pour des protéines pro-oncogéniques qui favoriseront la progression dans le cycle cellulaire, la survie, l'angiogenèse, le métabolisme énergétique et le développement de métastases **(Figure 19)** (Gera, Mellinghoff et al. 2004, Hsieh, Liu et al. 2012, Thoreen, Chantranupong et al. 2012).

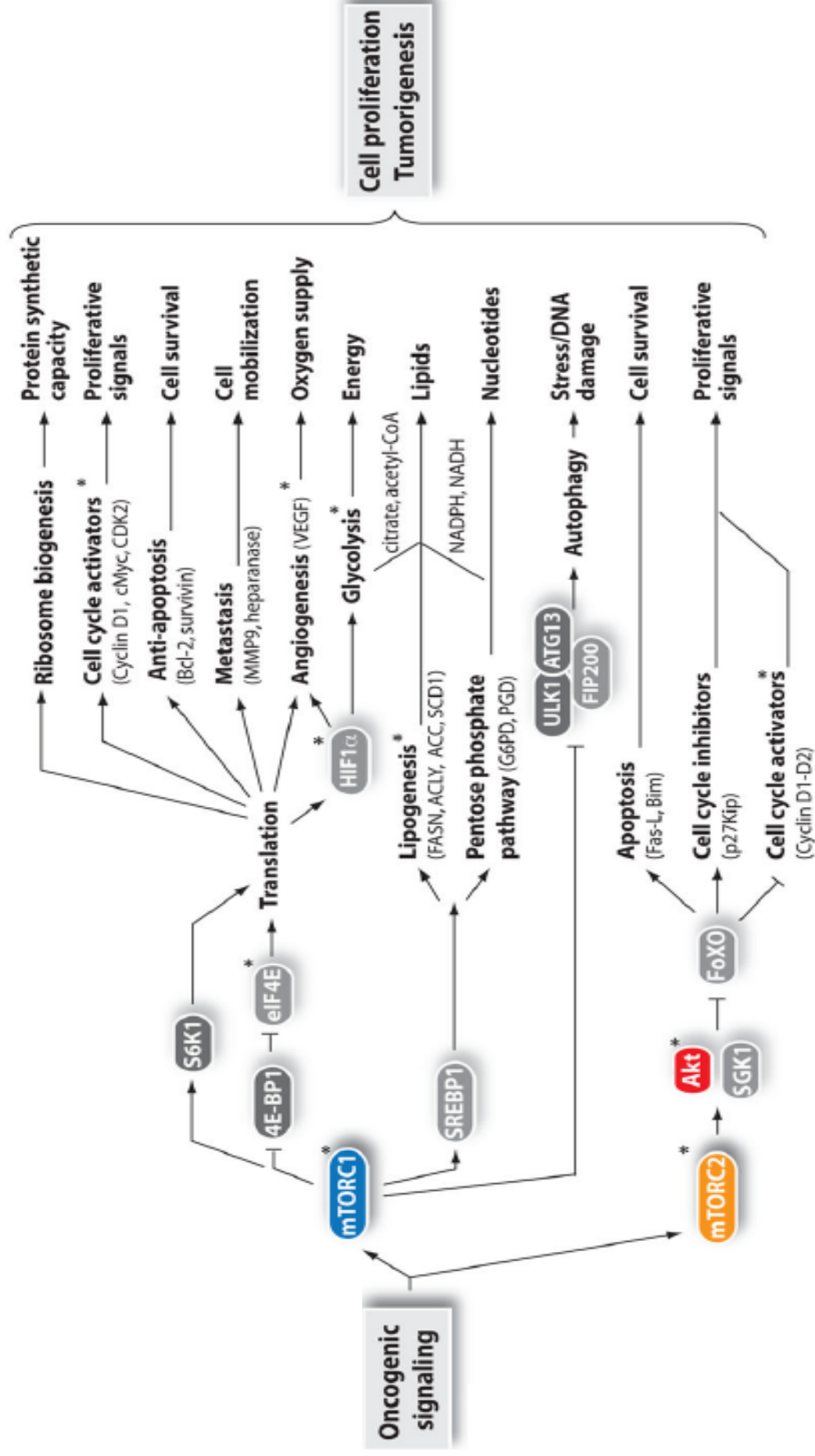


Figure 19 : mTOR et progression tumorale

Ce schéma résume les rôles cellulaires des complexes mTORC1/mTORC2 favorisant la progression tumorale. (Laplane *et al.* Cell 2012)

Une augmentation de la synthèse lipidique est également une altération métabolique caractéristique des cellules cancéreuses (Menendez and Lupu 2007). L'activation constitutive de mTORC1 favorisera la lipogenèse en activant le facteur de transcription SREBP1. De plus, SREBP1 est également capable d'augmenter l'activité de la voie des pentoses phosphates participant aussi à la synthèse nucléotidique (Figure 19). Il a été démontré que l'inactivation de SREBP1 dans des cellules TSC2 KO (donc constitutives actives pour mTORC1) entraîne une chute importante de leur prolifération. Ces résultats suggèrent donc que mTORC1, par l'intermédiaire de SREBP1, favorise la prolifération cellulaire et donc très certainement le développement tumoral (Duvel, Yecies et al. 2010).

L'activation de mTORC1 est également impliquée dans l'inhibition de l'autophagie. L'implication de l'autophagie dans la progression tumorale est un sujet ardemment débattu dans la littérature. En effet, l'autophagie intervient soit comme un mécanisme suppresseur de tumeur soit comme un mécanisme pro-survie pour les cellules tumorales. Des souris invalidées pour différents composants de la machinerie autophagique développent plus facilement et plus rapidement des tumeurs spontanées (Yang and Klionsky 2010). De plus, les cellules déficientes pour l'autophagie accumulent des agrégats protéiques, des mitochondries endommagées et présentent une augmentation des ROS (*Reactive Oxygen Species*), causant une augmentation des dommages à l'ADN et donc l'apparition de mutations oncogéniques (**Figure 19**). Aussi, il a été montré que l'inhibition de l'autophagie favorise la croissance tumorale (Degenhardt, Mathew et al. 2006). Cependant, l'inhibition de l'autophagie sensibilise les cellules tumorales à la nécrose induite par une carence en énergie ou nutriments, démontrant également un rôle protecteur de l'autophagie (Degenhardt, Mathew et al. 2006). En résumé, l'activation de mTORC1 favorise le développement et la progression tumorale en inhibant l'autophagie mais sensibilise les cellules cancéreuses à toute variation dans la disponibilité des nutriments ainsi que dans le statut énergétique (Inoki, Zhu et al. 2003, Shaw, Kosmatka et al. 2004).

mTORC2 semble également jouer un rôle essentiel dans le développement de certains types de tumeurs. En effet, la surexpression de Rictor favorise l'assemblage du complexe mTORC2 et augmente le potentiel tumoral de différentes lignées cancéreuses (Hietakangas and Cohen 2008). Aussi, l'activité de mTORC2 est requise pour le

développement de tumeurs spontanées de la prostate induite par l'inactivation de PTEN (Guertin, Stevens et al. 2009). mTORC2 participe également à prolifération et la résistance aux traitements chimiothérapeutiques des cellules tumorales en activant AKT, SGK1 qui permettent l'inhibition des facteurs de transcription FoxO et donc favoriseront la prolifération et la survie cellulaire (**Figure 19**) (Tanaka, Babic et al. 2011, Weiler, Blaes et al. 2014).

5.3. mTOR en tant que cible thérapeutique

La découverte de la rapamycine, un puissant inhibiteur naturel de mTOR, arrivait à point nommé pour les traitements contre le cancer. Cependant, le succès de la rapamycine ainsi que des molécules analogues (Rapalogues) comme médicament anti-cancéreux dans différents essais cliniques furent assez décevants. La principale raison de cet échec est la présence de différentes boucles de rétrocontrôle (Efeyan and Sabatini 2010). Pour exemple, l'inhibition de la S6K entraîne une sur-activation des voies ERK et PI3K, ce qui fournit d'importants signaux pro-survie et prolifératifs qui limitent les effets de la rapamycine et des rapalogues chez les patients (Carracedo, Ma et al. 2008). Le fait que la rapamycine n'inhibe pas le complexe mTORC2 est également à prendre en compte, ce complexe étant également capable de favoriser la croissance tumorale (Guertin, Stevens et al. 2009). De plus, différentes études ont démontré que la rapamycine n'inhibe pas totalement la phosphorylation de 4E-BP1 par mTORC1 (Thoreen, Kang et al. 2009, Yu, Toral-Barza et al. 2009, Chresta, Davies et al. 2010), suggérant que l'inhibition de mTORC1 par la rapamycine n'est pas suffisante pour supprimer la traduction spécifique des ARNm pro-oncogéniques *via* 4E-BP1 (cf. Introduction Chapitre I Partie 5.2). Ces résultats pourraient donc expliquer les effets modestes de la rapamycine chez les patients et le développement de résistances. Finalement, il est également possible que la résistance à la rapamycine implique une voie de signalisation indépendante de mTORC1, une hypothèse cependant peu probable.

A la vue de ces échecs, l'idée que l'inhibition combinée de mTORC1 et mTORC2 serait plus efficace pour lutter contre le développement tumoral a permis à différents groupes de développer des petites molécules inhibitrices de l'activité kinase de mTOR (Thoreen, Kang et al. 2009, Yu, Toral-Barza et al. 2009, Chresta, Davies et al. 2010). Ces molécules bloquent la phosphorylation des cibles de mTORC1 et mTORC2 et inhibent la progression tumorale plus efficacement que la rapamycine (Feldman, Apsel et al. 2009,

Thoreen, Kang et al. 2009, Yu, Toral-Barza et al. 2009). De façon intéressante, ces molécules sont plus efficaces dans des cellules tumorales invalidées pour mTORC2, suggérant qu'en plus d'inhiber les deux complexes mTOR, ces molécules outrepassent également la résistance des cellules tumorales à la rapamycine (Feldman, Apsel et al. 2009, Thoreen, Kang et al. 2009). En effet, contrairement à la rapamycine, ces inhibiteurs bloquent complètement la phosphorylation de 4E-BP1 et exerce donc une inhibition plus forte de la traduction. Cependant, malgré les nombreux avantages de ces molécules, des inconvénients existent encore. En effet, ces inhibiteurs n'ont qu'un effet modeste sur les tumeurs induites par l'oncogène KRAS, suggérant un autre mécanisme de résistance à l'inhibition de mTOR (Engelman, Chen et al. 2008). Il a également été prédit que ces molécules présentent un risque de toxicité sur les tissus sains (Liu, Thoreen et al. 2009). Cependant, en contradiction avec ces prédictions, des études pré-cliniques dans un modèle de souris soutiennent l'idée que l'inhibition combinée de mTORC1 et mTORC2 peut être très bien tolérée dans les tissus adultes (Guertin and Sabatini 2009, Janes, Limon et al. 2010). Finalement, il a été montré que l'inhibition chronique de mTORC2 pouvait entraîner l'activation d'AKT même en l'absence de sa phosphorylation par mTOR, suggérant un possible mécanisme de résistance à long terme et des phénomènes de résistance (Peterson, Laplante et al. 2009, Zoncu, Efeyan et al. 2011).

Les similitudes entre les domaines kinases de mTOR et PI3K ont également permis de développer des molécules capables d'inhiber ces deux protéines simultanément et pouvant être très efficaces sur des cancers ayant une activation constitutive de la PI3K (Brachmann, Fritsch et al. 2009, Brachmann, Hofmann et al. 2009). Il a été montré que la double inhibition de PI3K et mTOR par ces molécules inhibe la prolifération et provoque la mort par apoptose dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses (Garcia-Echeverria 2011, Wander, Hennessy et al. 2011). Egalement, certains de ces inhibiteurs ont démontré des effets encourageants lors de tests cliniques sur des patients atteints de différents cancers (Vilar, Perez-Garcia et al. 2011, Zaytseva, Valentino et al. 2012). De ce fait, cette troisième génération de médicaments ciblant mTOR et PI3K présente un potentiel thérapeutique anti-cancer prometteur pour les années à venir.

Chapitre II

Homéostasie des acides aminés et développement tumoral

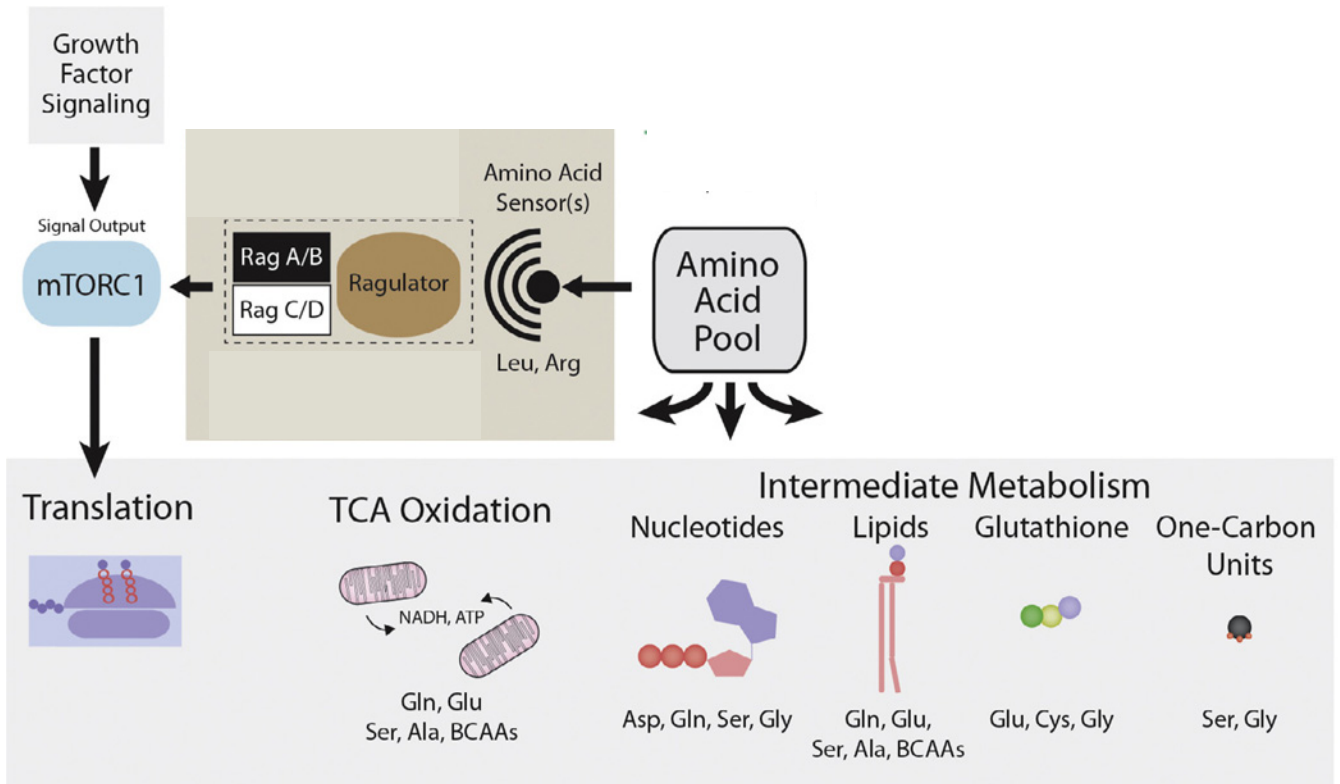


Figure 20 : Rôles des acides aminés dans le métabolisme

Ce schéma résume l'implication des acides aminés dans le métabolisme cellulaire.

Adapté de Tsun & Possemato, Semin Cell Dev Biol, 2015

1. Acides aminés et développement tumoral

1.1. Généralités

Les acides aminés sont des composés organiques présentant un groupement carboxyle (-COOH) et un groupement amine (-NH₂). Il existe 20 acides aminés participant à la synthèse protéique en se fixant sur les ARNs de transfert (ARNt) : ce sont les acides α -aminés naturels. On distingue parmi eux trois groupes différents : les acides aminés essentiels, semi-essentiels et non-essentiels. Parmi les acides aminés, tous ne peuvent pas être synthétisés *de novo* chez l'Homme et certains doivent ainsi être fournis par l'alimentation. Ces acides aminés, au nombre de neuf, sont appelés « acides aminés essentiels ». Egalement, sous certaines conditions physiologiques (grossesse, période de croissance chez l'enfant) ou physiopathologiques (infections, blessures), certains acides aminés tels que l'arginine et l'histidine ne peuvent être synthétisés en quantité suffisante pour l'organisme et doivent être assimilés via l'alimentation : ces acides aminés sont appelés « semi-essentiels ». Les autres, pouvant être synthétisés *de novo* en quantité suffisante par les cellules humaines sont appelés « non-essentiels ».

Les acides aminés jouent de multiples rôles dans le métabolisme cellulaire. Majoritairement connus pour être les maillons servant à la construction des chaînes peptidiques et des protéines, ils servent également de métabolites intermédiaires alimentant d'autres réactions biosynthétiques et sont essentiels à la croissance et la prolifération cellulaire (tumorale ou non)(**Figure 20**)(DeBerardinis and Cheng 2010, Locasale 2013, Mayers and Vander Heiden 2015, Tsun and Possemato 2015). Certains acides aminés sont ou servent également de précurseurs à la synthèse de molécules-signal. Ainsi, le glutamate est un neuromédiateur naturel (Curtis, Phillis et al. 1960), le tryptophane sert à la production de sérotonine (Palego, Betti et al. 2016) et la tyrosine à la production des catécholamines (Gibson and Wurtman 1977). Les acides aminés contrôlent également la croissance cellulaire en régulant directement l'activité de mTORC1 (cf. Introduction Chapitre I Partie 3.1.2)(**Figure 20**), les rendant de ce fait absolument essentiels pour le développement tumoral.

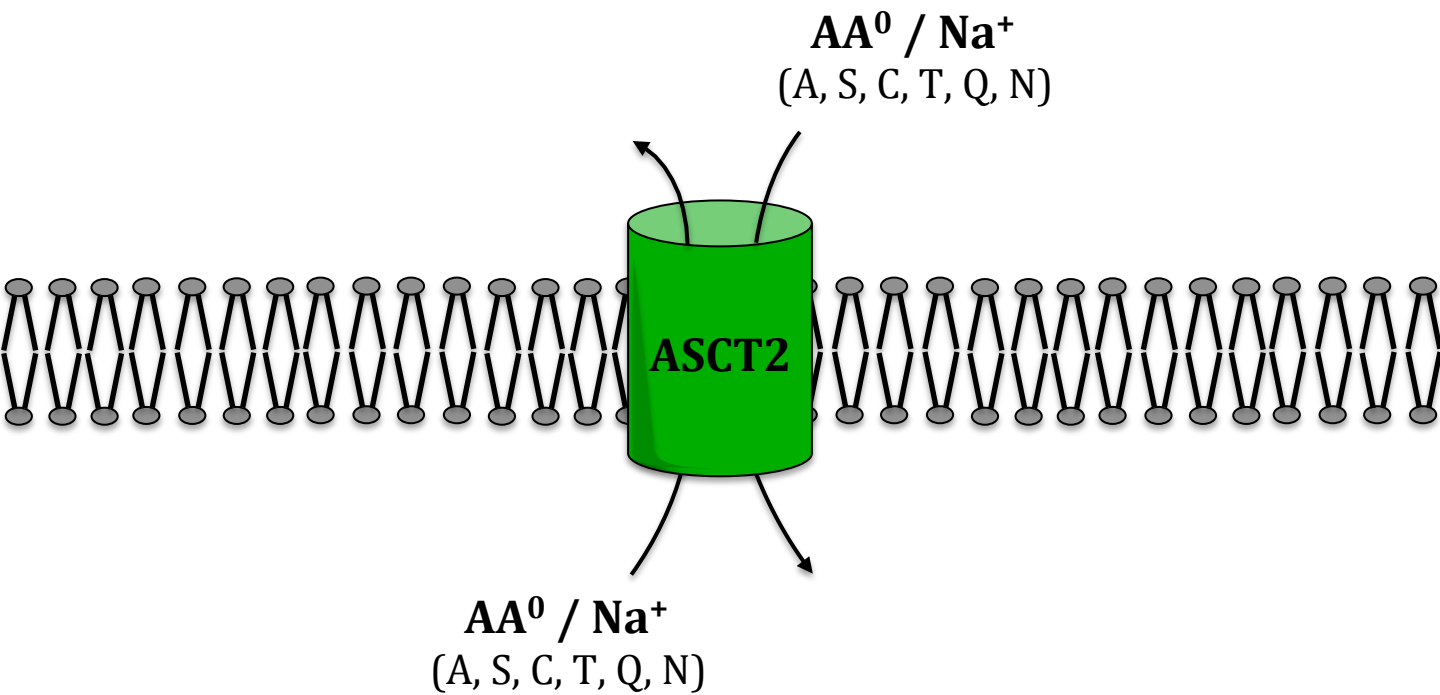


Figure 21 : Mécanisme de transport de ASCT2

ASCT2 est capable transporter les petits acides aminés neutres (AA^0) au travers de la membrane plasmique. ASCT2 fonctionne comme un échangeur obligatoire en couplant l'entrée d'un acide aminé et d'un sodium avec la sortie d'un autre acide aminé et d'un sodium.

2. Transporteurs d'acides aminés surexprimés dans les cancers

Tous les acides aminés sont hydrophiles et par conséquent ne peuvent pas traverser la membrane plasmique sans l'aide de transporteurs. Les cellules de mammifères expriment une trentaine de transporteurs d'acides aminés qui sont exprimés différemment selon le tissu et les besoins physiologiques (Broer 2002, Makrides, Camargo et al. 2014). Dans le but de maintenir leurs métabolisme et croissance exacerbés, les cellules tumorales se doivent d'optimiser leurs apports en acides aminés. Parmi tous les transporteurs exprimés chez l'Homme, trois antiporteurs ou échangeurs (ASCT2, LAT1 et xCT) jouent un rôle majeur dans le développement de la majorité des cancers.

2.1. ASCT2 (SLC1A5)

Au cours de ces dernières années, ASCT2 a bénéficié d'une attention croissante non seulement pour son rôle-clé au niveau du système immunitaire mais également parce que ce transporteur est surexprimé dans de nombreux cancers tels que les cancers du sein triple négatif (van Geldermalsen, Wang et al. 2015), du colon (Huang, Zhao et al. 2014), du poumon (Hassanein, Qian et al. 2015), de la prostate (Wang, Hardie et al. 2015), les mélanomes (Wang, Beaumont et al. 2014), les neuroblastomes (Ren, Yue et al. 2015), les gliomes et les glioblastomes (Wise, DeBerardinis et al. 2008).

Le Transporteur ASCT2 (Alanine Serine Cystéine Transporter 2, aussi appelé SLC1A5) est un transporteur Na⁺-dépendant responsable du transport des petits acides aminés neutres tels que l'alanine, la sérine, la cystéine, la glutamine et l'asparagine avec une grande affinité (K_m ~ 20 uM)(Utsunomiya-Tate, Endou et al. 1996). Il est également capable de transporter avec une affinité plus faible des acides aminés neutres possédant de plus longues chaînes latérales tels que la thréonine, la valine et la méthionine (K_m ~ 300-500 uM). Fait intéressant, en dépit de sa dépendance à l'égard du sodium, le processus de transport est électro-neutre. En effet, ASCT2 fonctionne comme un échangeur obligatoire en couplant l'entrée d'un acide aminé et d'un sodium avec la sortie d'un autre acide aminé et d'un sodium (**Figure 21**). Par conséquent, ce transporteur ne réalise pas un import net mais participe plutôt à l'homéostasie des

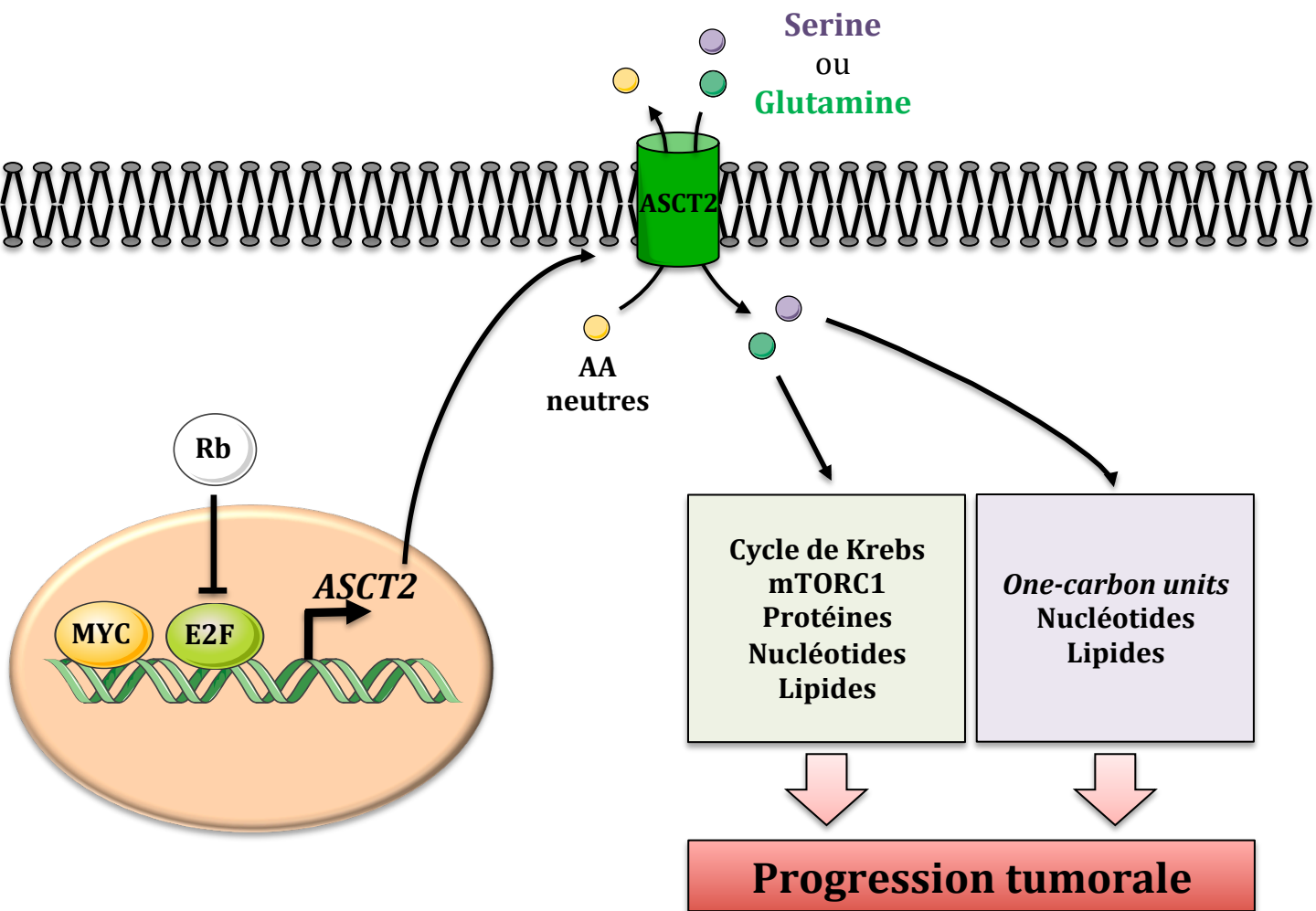


Figure 22 : ASCT2 et cancer

Le transporteur d'acides aminés ASCT2 est fortement surexprimé dans de nombreux cancers. Son expression, causée par les facteurs de transcription MYC et E2F, entraîne le transport de la glutamine et de la serine. Ces deux acides aminés vont être utilisés par le métabolisme tumoral de favoriser la progression tumorale.

acides aminés neutres en équilibrant les concentrations intra- et extracellulaires. D'un point de vue physiologique, ASCT2 est exprimé au niveau du cerveau par les astrocytes ainsi que les neurones où il participe à l'homéostasie de la glutamine (Broer and Brookes 2001, Deitmer, Broer et al. 2003, Gliddon, Shao et al. 2009). ASCT2 est également exprimé dans les tissus périphériques tels que les poumons, les muscles squelettiques, les reins, les testicules et le tissu adipeux (Kanai, Clemencon et al. 2013). L'inactivation de ASCT2 chez la souris est viable et ne donne pas de phénotype particulier en conditions normales. Cependant, le développement des réponses pro-inflammatoires des lymphocytes T est fortement altéré lors de l'activation du système immunitaire (Nakaya, Xiao et al. 2014). Egalement, dans un modèle murin de sclérose en plaque, l'inactivation de ASCT2 protège les souris contre le développement de cette maladie auto-immune, démontrant un rôle-clé de ASCT2 au niveau du système immunitaire (Nakaya, Xiao et al. 2014). En effet, bien que l'inactivation de ASCT2 ne compromette pas les processus initiaux d'activation des cellules T naïves tels que la prolifération et la production d'IL-2, la perte de ASCT2 diminue fortement la capacité des cellules T CD4+ naïves à se différencier en cellules Th1 et Th17. Cette diminution de différenciation va ainsi perturber et atténuer la réponse immunitaire *in vivo*, protégeant ainsi les souris contre le développement de maladies auto-immunes.

La surexpression tumorale de ASCT2 soulignée en introduction est principalement due à divers événements génétiques dérégulant l'activité de certains oncogènes ou suppresseurs de tumeurs au cours du développement tumoral (**Figure 22**). La famille des facteurs de transcriptions MYC (N-MYC, c-MYC et L-MYC) contrôle l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la survie et le métabolisme cellulaire (Dang 2013). Ces proto-oncogènes sont fréquemment amplifiés et suractivés au niveau des cancers et favorisent la tumorigenèse (Dang 2013). Deux études ont démontré que les proto-oncogènes c-MYC et N-MYC étaient capables de se fixer sur le promoteur de ASCT2 et d'induire son expression dans des modèles de neuroblastomes et de glioblastomes (Wise, DeBerardinis et al. 2008, Ren, Yue et al. 2015). L'expression de ASCT2 est également contrôlée par la protéine Rb (*RetinoBlastoma protein*), un suppresseur de tumeur fréquemment inactivé dans les cancers. Il a été montré que Rb inhibe l'activité de E2F-3, un facteur de transcription capable de se fixer sur le promoteur de ASCT2 et d'induire son expression. L'inactivation de Rb dans les cancers entraîne l'activation de E2F-3 et donc la surexpression tumorale de ASCT2.

De nombreuses études ont suggéré que ASCT2 favoriserait la croissance tumorale principalement grâce à sa capacité à transporter la glutamine, un acide aminé clé pour le métabolisme et la prolifération tumorale en permettant la production d'énergie et de métabolites intermédiaires (DeBerardinis and Cheng 2010) (Wise and Thompson 2010) ainsi que l'activation de mTORC1 (cf. Introduction Chapitre I Partie 3.1.2). En effet, l'inhibition pharmacologique ou encore l'inactivation par shRNA de ASCT2 diminue la prolifération des cellules de mélanome *in vitro* (Wang, Beaumont et al. 2014). Egalement, il a été démontré que le *knockdown* de ASCT2 diminue fortement l'activité de mTORC1 et la croissance tumorale dans de multiples modèles de xénogreffes (Willems, Jacque et al. 2013, van Geldermalsen, Wang et al. 2015, Wang, Hardie et al. 2015). De plus, des études récentes ont démontré que les cancers causés par l'hyper-activation de c-MYC sont totalement dépendants de la glutamine pour leur survie et que ces tumeurs répondent à ces besoins en augmentant notamment l'expression de ASCT2 (Wise, DeBerardinis et al. 2008, Ren, Yue et al. 2015). Ainsi, ces différentes études démontrent le rôle essentiel de ASCT2 pour la survie et la croissance tumorales et en font une cible thérapeutique intéressante (**Figure 22**).

Si le rôle-clé joué par la glutamine dans le métabolisme et la prolifération tumorale pousse les chercheurs à se focaliser sur cet acide aminé, il serait dommage d'oublier la capacité d'ASCT2 à transporter d'autres acides aminés tels que la sérine. En effet, de récentes études ont démontré que la sérine était également essentielle à la progression tumorale en agissant comme métabolite intermédiaire de la voie « *one carbon units* » et contribue à la biosynthèse de plusieurs macromolécules telles que les nucléotides, les phospholipides et le glutathion (Locasale 2013, Labuschagne, van den Broek et al. 2014). Plusieurs travaux utilisant des approches génétiques et fonctionnelles ont suggéré que l'activation aberrante de la voie biosynthétique de la sérine était un processus essentiel à la carcinogénèse (Locasale and Cantley 2011, Possemato, Marks et al. 2011, Tsun and Possemato 2015). Cependant, certains types de cancers restent très dépendants de l'absorption de sérine exogène (Maddocks, Berkers et al. 2013), ce qui suggère que la synthèse *de novo* de la sérine seule peut ne pas être suffisante pour supporter les besoins des cellules cancéreuses. Puisque ASCT2 possède une forte affinité pour la sérine, il est possible que ce transporteur favorise également la croissance tumorale en permettant un apport suffisant en sérine (**Figure 22**). Cependant, cet aspect n'a pas encore été étudié à ce jour.

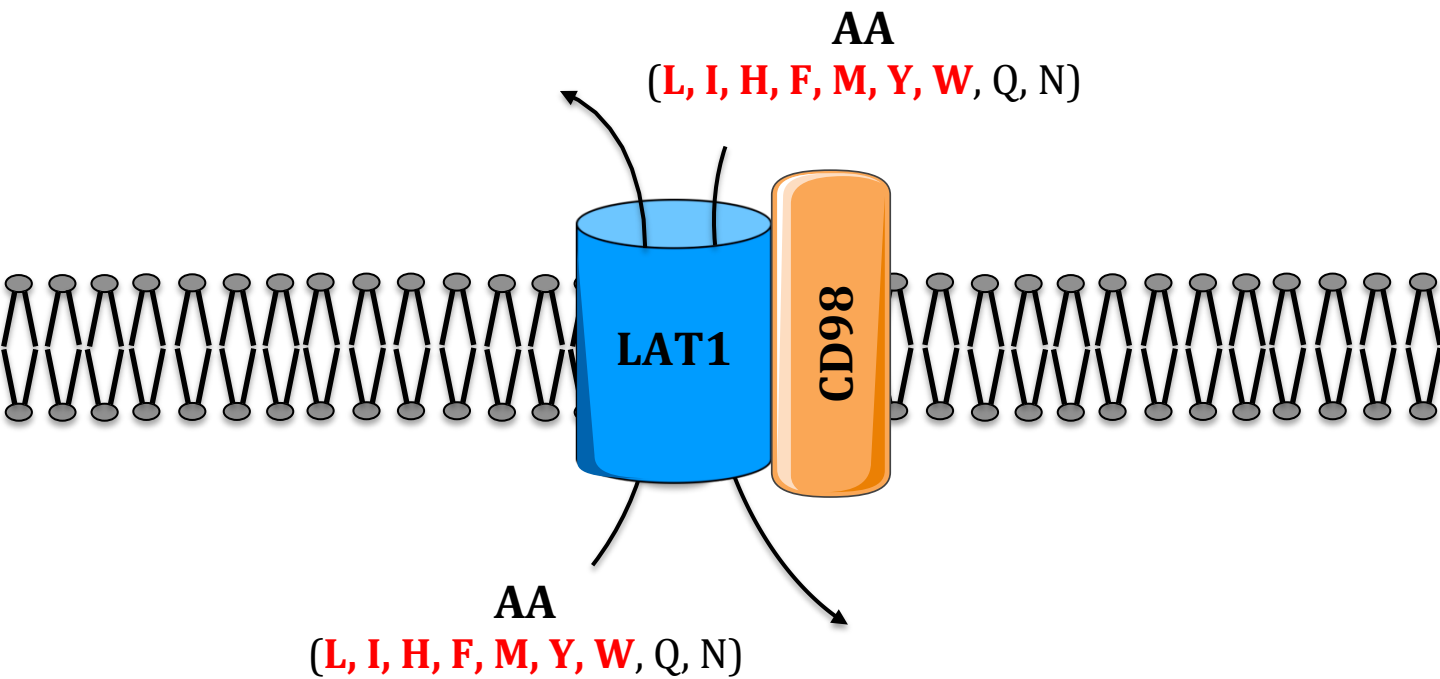


Figure 23 : Mécanisme de transport de LAT1

LAT1 est capable de transporter certains acides aminés essentiels (en rouge) au travers de la membrane plasmique. LAT1 est un échangeur obligatoire (stœchiométrie de 1 : 1) indépendant du sodium et son expression à la membrane plasmique nécessite sa dimérisation avec la glycoprotéine CD98 .

2.2. Le complexe LAT1 (SLC7A5) / CD98 (SLC3A2)

Avant l'isolation et la caractérisation de LAT1 en 1998 (Kanai, Segawa et al. 1998), des études antérieures ont identifié deux cDNA tronqués de LAT1 : E16 chez l'Homme (Gaugitsch, Prieschl et al. 1992) et TA1 chez le rat (Sang, Lim et al. 1995, Wolf, Wang et al. 1996). Ces études ont suggéré un rôle de ces deux transcrits dans la prolifération de cellules immunitaires ainsi que dans le développement tumoral. Depuis lors, de nombreuses études ont démontré que LAT1 est surexprimé et constitue un facteur de mauvais pronostic dans de nombreux types de cancers tels que ceux de la prostate (Sakata, Ferdous et al. 2009), du poumon (Kaira, Oriuchi et al. 2010), du rein (Elorza, Soro-Arnaiz et al. 2012, Betsunoh, Fukuda et al. 2013), du sein (Furuya, Horiguchi et al. 2012), du pancréas (Kaira, Sunose et al. 2012, Yanagisawa, Ichinoe et al. 2012), du foie (Li, Qiang et al. 2013) ainsi que dans les gliomes (Haining, Kawai et al. 2012).

Le transporteur d'acides aminés LAT1 (*L-type Amino acid Transporter 1*, aussi appelé SLC7A5) est une protéine à douze domaines transmembranaires responsable de l'absorption Na⁺-indépendante de la leucine, l'isoleucine, la phénylalanine, la méthionine, la tyrosine, l'histidine, le tryptophane et la valine avec une haute affinité (K_m de l'ordre du micromolaire), mais également de la glutamine et l'asparagine avec une faible affinité (K_m de l'ordre du millimolaire) (Verrey, Closs et al. 2004). De même que ASCT2, LAT1 est un échangeur obligatoire (stœchiométrie de 1 : 1) (**Figure 23**) présentant la même sélectivité pour l'absorption ou l'efflux (exception faite de la leucine, l'isoleucine et la méthionine). Cependant, l'affinité apparente pour les acides aminés extracellulaires est environ 100 fois plus élevée que pour les acides aminés intracellulaires ce qui signifie que la concentration cytoplasmique des acides aminés contrôle la vitesse de transport (Verrey, Closs et al. 2004). Ces données fonctionnelles indiquent que LAT1 et ASCT2 ne permettent pas une accumulation nette d'acides aminés intracellulaires mais favorisent l'équilibre des concentrations relatives de ses différents substrats à travers la membrane (Broer, Rahimi et al. 2016). LAT1 forme un hétérodimère avec la glycoprotéine CD98, une protéine chaperonne indispensable à la stabilisation, et insertion fonctionnelle de LAT1 à la membrane plasmique (Yanagida, Kanai et al. 2001). Bien qu'il soit généralement admis que LAT1 est exprimé principalement dans les tissus tumoraux (Kaira, Oriuchi et al. 2008), son expression a été détectée au sein d'autres tissus tels que la barrière hémato-encéphalique où il

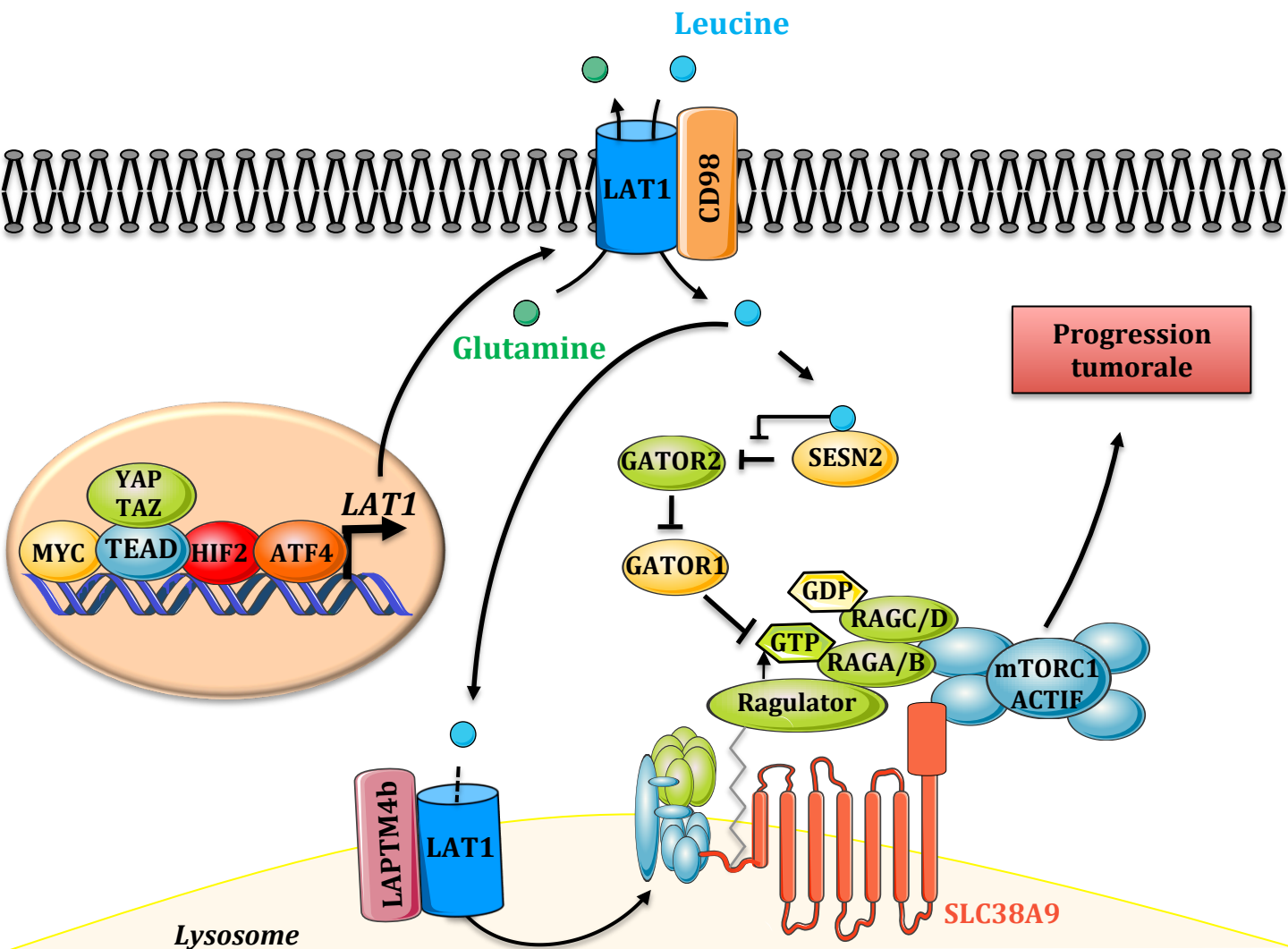


Figure 24 : LAT1 et cancer

Le transporteur d'acides aminés LAT1 est fortement surexprimé dans de nombreux cancers. Son expression, causée par les facteurs de transcription MYC, YAP/TAZ-TEAD, HIF2 et ATF4, entraîne le transport de leucine au travers de la membrane plasmique mais également au niveau du lysosome. Ces deux activités permettent l'activation de mTORC1 et donc la progression tumorale (Cf Introduction Chapitre I Partie 3.2).

semble essentiel au maintien de l'homéostasie des acides aminés au niveau du cerveau (Killian and Chikhale 2001, Dolgodilina, Imobersteg et al. 2015). Egalement, il a récemment été démontré que l'inactivation génétique de LAT1 chez la souris était létale au stade embryonnaire, suggérant un rôle essentiel de ce transporteur pour la croissance (Poncet, Mitchell et al. 2014).

Le mécanisme moléculaire expliquant la surexpression quasi-globale de LAT1 dans les cancers soulignée en introduction s'explique par le fait que son expression est sous le contrôle de nombreuses voies de signalisation dérégulées dans les processus de carcinogénèse (**Figure 24**). La voie de signalisation Hippo régule la croissance cellulaire et l'homéostasie tissulaire à travers la phosphorylation et l'inhibition des co-activateurs de transcription YAP (*Yes-Associated Protein*) et TAZ (*Transcriptional co-Activator with PDZ-binding motif*) (Yu, Zhao et al. 2015). YAP et TAZ contrôlent la croissance cellulaire en activant le facteur de transcription TEAD (Zhao, Ye et al. 2008). L'hyper-activation de YAP/TAZ a été observée dans plusieurs types de cancers et a été décrite comme favorisant la progression tumorale (Chan, Lim et al. 2008, Steinhardt, Gayyed et al. 2008, Moroishi, Hansen et al. 2015). Récemment, deux études indépendantes ont rapporté que YAP/TAZ et TEAD étaient capables de se fixer sur le promoteur de *LAT1* et d'induire son expression, favorisant ainsi la croissance et la prolifération cellulaires (normales et tumorales) (Hansen, Ng et al. 2015, Park, Sohn et al. 2016). En complément de cette régulation par la voie Hippo, une étude a rapporté que, comme pour *ASCT2*, le promoteur de *LAT1* présente une séquence de fixation canonique pour le facteur de transcription c-MYC. Les auteurs ont également démontré que la surexpression de ce proto-oncogène induit l'expression de LAT1 tandis que la mutation du site de fixation supprime cet effet (Hayashi, Jutabha et al. 2012).

En plus de cette induction oncogénique, les conditions physiologiques sont également capables de réguler l'expression de LAT1 (**Figure 24**). Au cours de la carcinogénèse, la masse tumorale se développe plus vite que le réseau vasculaire et cause l'apparition de zones dépourvues en oxygène (hypoxiques) et en nutriments. La chute de la concentration en oxygène entraîne la stabilisation et l'activation des facteurs de transcription HIFs (Pouyssegur, Dayan et al. 2006). Ces facteurs sont capables de réguler l'expression de plusieurs centaines de gènes jouant un rôle prédominant dans le développement tumoral en régulant l'angiogénèse, le métabolisme ainsi que l'invasion

des cellules cancéreuses (Kung, Wang et al. 2000, Liao, Corle et al. 2007, Liao and Johnson 2007, Semenza 2013, Parks, Cormerais et al. 2016). Il a été démontré récemment que l'isoforme HIF-2 α de cette famille était capable de se fixer au promoteur de LAT1 et d'induire son expression (Elorza, Soro-Arnaiz et al. 2012). De la même façon d'autres études ont démontré que l'expression de LAT1 était induite par le facteur de transcription ATF4 en réponse à une carence en acides aminés (cf. Introduction Chapitre II Partie 3.1.3). De ce fait, la régulation de LAT1 par HIF-2 α et ATF4 propose un mécanisme adaptatif favorisant l'expression de LAT1 dans une zone tumorale hypoxique dépourvue en nutriments (**Figure 24**).

De nombreuses études se sont intéressées à l'importance de la surexpression de LAT1 au sein des cellules tumorales. Il a été démontré que l'expression tumorale de LAT1 était nécessaire au transport de leucine, acide aminé essentiel majeur de la constitution des protéines mais permettant aussi le maintien de l'activation de mTORC1 (Nicklin, Bergman et al. 2009) (**Figure 24**). En effet, l'inactivation génétique ou l'inhibition pharmacologique de LAT1 dans différentes lignées tumorales inhibe fortement l'activité mTORC1, supprimant ainsi leur prolifération *in vitro* ainsi que la croissance tumorale *in vivo* (Oda, Hosoda et al. 2010, Elorza, Soro-Arnaiz et al. 2012, Yun, Lee et al. 2014, Rosilio, Nebout et al. 2015, Park, Sohn et al. 2016). Cependant, le rôle de LAT1 dans l'activation de mTORC1 n'est pas simplement limité à l'apport de leucine extracellulaire. Une étude récente a démontré que ce transporteur pouvait également se relocaliser au niveau de la membrane du lysosome grâce à son interaction avec une nouvelle protéine chaperonne : LAPTM4b (Milkereit, Persaud et al. 2015), cette relocalisation favorisant le transport bi-directionnel de leucine dans le lysosome et l'activation directe de mTORC1 (Milkereit, Persaud et al. 2015) (**Figure 24**). De ce fait, cette double localisation de LAT1 rend ce transporteur unique et absolument essentiel à l'activité de mTORC1 et à la prolifération tumorale.

Ainsi, l'utilisation de LAT1 comme cible thérapeutique anti-cancer est une stratégie prometteuse et devrait bientôt révéler tout son potentiel avec le développement d'inhibiteurs spécifiques tels que le JPH203, actuellement en test clinique de phase I au Japon.

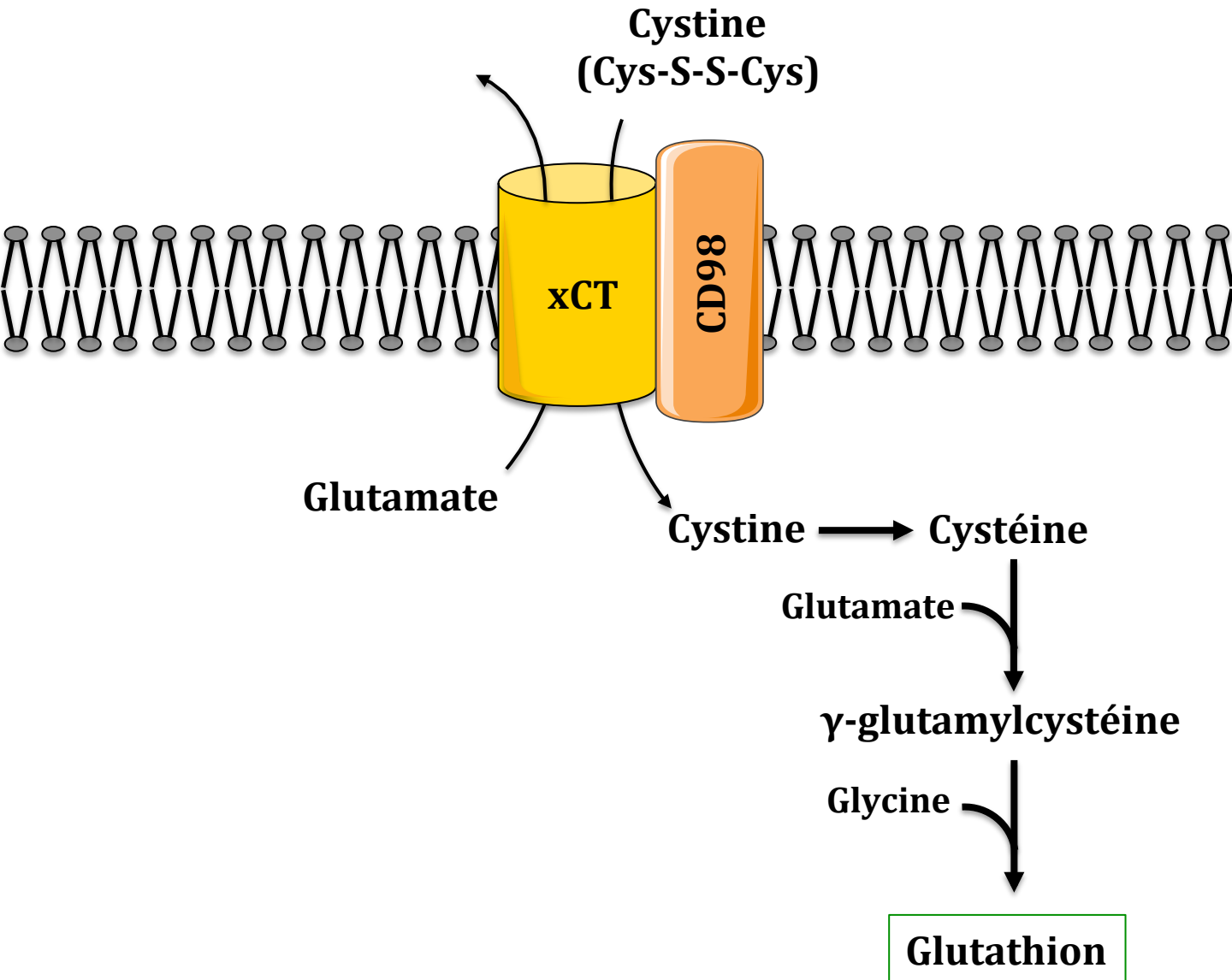


Figure 25 : Mécanisme de transport par xCT

xCT est capable d'échanger le glutamate et la cystine au travers de la membrane plasmique. Le transport de cystine réalisé par xCT permettra la synthèse de glutathion.

2.3. Le complexe xCT (SLC7A11) / CD98 (SLC3A2)

Le transporteur d'acides aminés xCT (aussi appelé SLC7A11) est responsable du transport Na⁺-indépendant de la cystine (Cys-S-S-Cys) et du glutamate (1 : 1). Tout comme LAT1, xCT interagit avec la glycoprotéine chaperonne CD98 qui permet sa localisation fonctionnelle à la membrane plasmique (**Figure 25**) (Lewerenz, Hewett et al. 2013). Contrairement aux autres transporteurs d'acides aminés capables de transporter plusieurs substrats, xCT est unique en ne supportant que l'échange de cystine contre du glutamate. Cette caractéristique fait que ce transporteur n'agit pas comme support nutritif pour la cellule mais plutôt comme une protéine de défense contre le stress oxydatif. En effet, une fois transportée à l'intérieur de la cellule, la cystine sera réduite en cystéine et utilisée pour la synthèse du glutathion, molécule antioxydante majeure de la cellule (**Figure 25**) (Bannai and Tateishi 1986, Rimaniol, Mialocq et al. 2001). Fait intéressant, bien que xCT semble être exprimé dans la quasi-totalité des cellules cultivées *in vitro*, la distribution *in vivo* chez l'Homme est limitée principalement au niveau des fibroblastes, du pancréas, des cellules immunitaires, du rein et du système nerveux central (Bassi, Gasol et al. 2001, Rimaniol, Mialocq et al. 2001, Burdo, Dargusch et al. 2006). Selon le travail de Bannai *et al.*, l'induction de xCT dans des conditions de culture cellulaire est principalement due à la forte concentration environnementale en oxygène augmentant le stress oxydatif (Bannai, Sato et al. 1989). En effet, la culture prolongée de fibroblastes en conditions hypoxiques provoque la diminution de l'activité de xCT d'un facteur cinq (Bannai, Sato et al. 1989). Il est donc important de confirmer toute conclusion obtenue *in vitro* par une approche *in vivo* afin d'éviter tout problème lié à un artefact de culture cellulaire, d'autant que les souris invalidées spécifiquement pour xCT ne démontrent aucun phénotype particulier (Sato, Shiiya et al. 2005). Cependant plusieurs études suggèrent un rôle essentiel de xCT dans la réponse immunitaire (Sato, Fujiwara et al. 1995, Nabeyama, Kurita et al. 2010, Lewerenz, Hewett et al. 2013).

Les cellules cancéreuses à croissance rapide adaptent leur métabolisme anabolique en augmentant la production d'énergie et de précurseurs métabolique. Cette augmentation du métabolisme entraîne une production intense d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Jones and Thompson 2009, Cairns, Harris et al. 2011). Bien qu'une faible concentration de ROS soit capable de favoriser la prolifération et la survie cellulaires (Lee, Yang et al. 2002, Martindale and Holbrook 2002, Giannoni, Buricchi et al. 2005), une trop forte production de ROS entraîne un stress oxydatif mutagène et

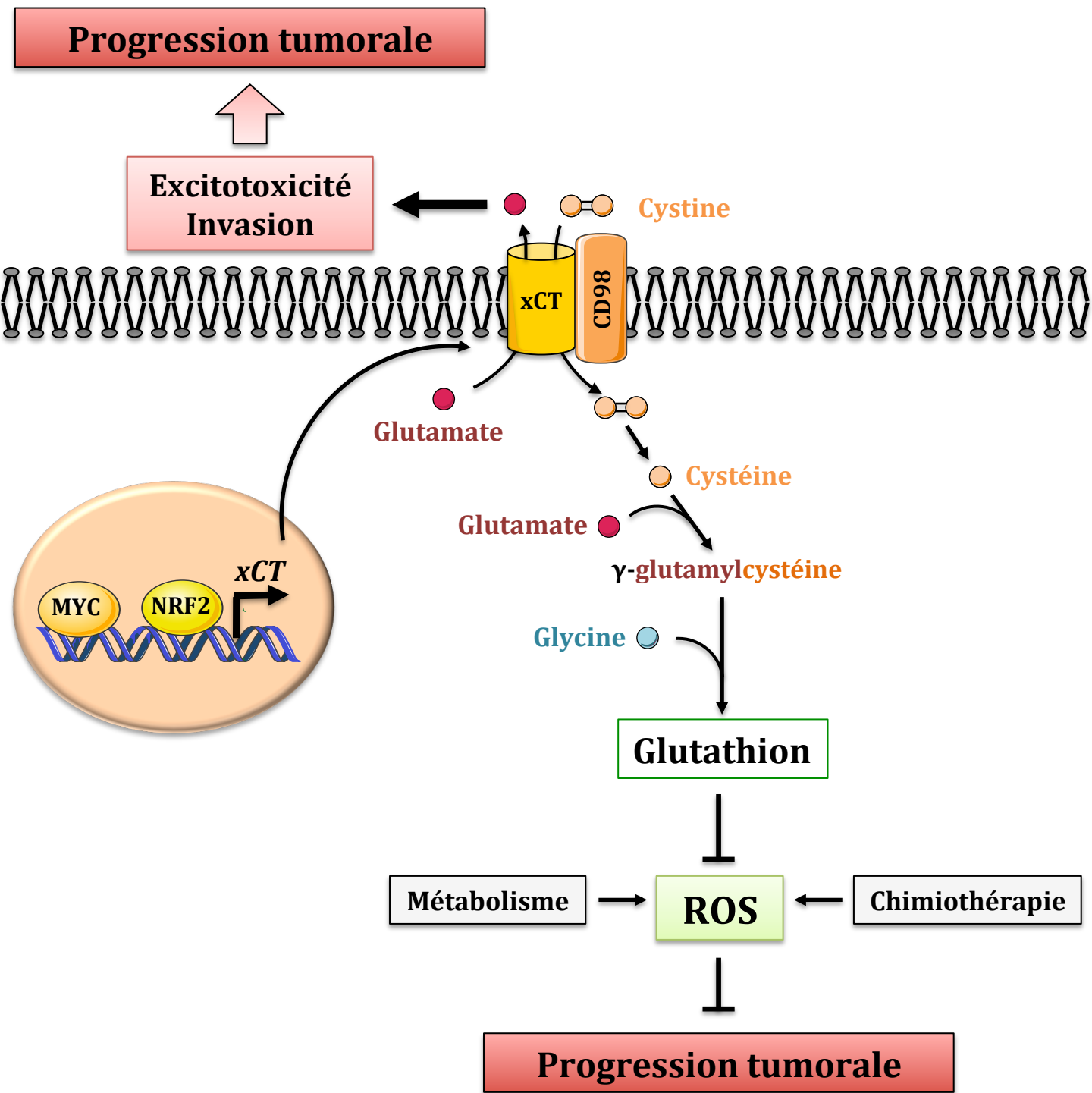


Figure 26 : xCT et cancer

Le transporteur d'acides aminés xCT est fortement surexprimé dans de nombreux cancers. Son expression, causée par les facteurs de transcription MYC et NRF2, favorise l'entrée de cystine (deux cystéines liées par un pont disulfure). La cystine sera principalement utilisée pour la synthèse de glutathion, molécule anti-oxydante permettant de lutter contre l'accumulation de ROS (*Reactive Oxygen Species*) causée par le métabolisme exacerbé ainsi que certains traitements chimiothérapeutiques et de ce fait permettra de favoriser la progression tumorale.

apoptotique (Fleury, Mignotte et al. 2002, Fruehauf and Meyskens 2007). Les cellules se protègent des effets néfastes des ROS en produisant en induisant, *via* notamment le facteur de transcription NRF2, l'expression d'enzymes de détoxification ainsi que la production de molécules anti-oxydantes telles que le glutathion. Compte tenu du rôle essentiel de xCT dans la synthèse du glutathion, il n'est pas surprenant de retrouver ce transporteur surexprimé dans différents types de cancer tels que les lymphomes (Gout, Kang et al. 1997), les gliomes (Savaskan, Heckel et al. 2008) et le cancer du pancréas (Lo, Ling et al. 2008).

La protéine NRF2 est connue pour être le facteur de transcription régulant majoritairement les défenses cellulaires contre le stress oxydatif (Kensler, Wakabayashi et al. 2007). Dans des conditions basales, KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) se fixe et ubiquitinye NRF2, entraînant ainsi sa dégradation. En réponse au stress oxydatif, NRF2 se dissocie de KEAP1 et se relocalise dans le noyau où il pourra se fixer au site ARE (*Antioxidant Response Element*) de ses gènes-cibles et les induire (Kensler, Wakabayashi et al. 2007). Une étude récente a démontré dans un modèle de cancer du sein que l'expression de xCT était directement induite par NRF2 en réponse à un stress oxydatif, proposant ainsi un mécanisme adaptatif expliquant l'expression tumorale de xCT (Habib, Linher-Melville et al. 2015). De plus, des mutations « perte de fonction » de KEAP1 ont été trouvées avec une fréquence élevée dans certains cancers tels que ceux du poumon et de la prostate (Singh, Misra et al. 2006) (Padmanabhan, Tong et al. 2006, Zhang, Singh et al. 2010). Ces mutations, conduisant à une activation constitutive de NRF2, pourraient expliquer la surexpression tumorale de xCT (**Figure 26**). Egalement, différentes études ont suggéré que xCT était induit par les deux oncogènes c-MYC (Kim, Lee et al. 2008) et Ets-1 (Verschoor and Singh 2013).

Considérant le rôle potentiel de xCT dans la défense contre le stress oxydatif et la progression tumorale, plusieurs groupes se sont attachés à développer différentes approches ayant pour but d'inhiber xCT et de confirmer sa fonction pro-tumorale. Le *knockdown* de xCT par siRNA ainsi que l'utilisation de (S)-4CPG ((S)-4-carboxylphenylglycine), un analogue du glutamate et inhibiteur compétitif de xCT (Patel, Warren et al. 2004), réduisent fortement la prolifération de cellules cancéreuses *in vitro* (Chung, Lyons et al. 2005, Guo, Zhao et al. 2011). Egalement, il a été démontré que la sulfasalazine, drogue originellement décrite comme inhibitrice de NF- κ B, était capable

d'inhiber spécifiquement xCT à faible concentration et d'entraîner ainsi une chute de la concentration intracellulaire de glutathion (Lo, Ling et al. 2010). De plus, l'utilisation de cette drogue sur différents modèles tumoraux *in vivo* réduit fortement leur croissance ainsi que leur dissémination métastatique (Gout, Buckley et al. 2001, Chen, Song et al. 2009, Guan, Lo et al. 2009, Guo, Zhao et al. 2011). Ces différents résultats placent xCT comme cible potentielle contre le développement tumoral. L'utilisation de la sulfasalazine apporte un espoir pour le traitement des patients puisqu'elle est déjà approuvée par la FDA (*Food and Drug Administration* – USA) et utilisée dans le traitement de maladies inflammatoires chroniques sans présenter d'effets secondaires importants. Malheureusement, une étude clinique de phase 1/2 chez des patients atteints de tumeurs au cerveau n'a montré aucun effet bénéfique de cette drogue (Robe, Martin et al. 2009). Cependant, compte tenu du fait que cette étude n'ait été réalisée que sur une faible cohorte de patient ne présentant qu'un seul type de cancer, ce résultat est à prendre avec prudence et ne signifie pas nécessairement que la sulfasalazine, dans un avenir proche, ne présentera pas un intérêt pour le traitement de certains cancers.

Une autre propriété pro-tumorale de xCT, relativement sous-étudiée dans la littérature, réside en sa capacité à "relarguer" du glutamate, un neurotransmetteur naturel, dans le microenvironnement tumoral (**Figure 26**) (Nedergaard, Takano et al. 2002). En effet, xCT est responsable de plus de 50% de la sécrétion du glutamate par les cellules de gliome et il a été montré que cette sécrétion massive pouvait favoriser leur croissance tumorale en causant la mort des neurones périphériques par excitotoxicité (Ye and Sontheimer 1999). De plus, une étude a suggéré que le glutamate, *via* une signalisation autocrine, favorisait l'invasion des cellules de gliome (Lyons, Chung et al. 2007). Ces résultats suggèrent donc un double rôle de xCT dans la progression des gliomes, en favorisant les défenses contre le stress oxydatif et en permettant le remodelage et l'invasion du microenvironnement tumoral.

Pour terminer, il a été démontré que xCT joue un rôle central dans la chimiorésistance des cellules tumorales (**Figure 26**). En effet, xCT permet la résistance à certains traitements chimiothérapeutiques tels que la geldanamycine, le celastrol ou encore le cisplatine, molécules connues pour causer une forte production de ROS intracellulaires (Liu, Blower et al. 2007, Pham, Blower et al. 2010, Ma, Chen et al. 2015). De plus, le groupe de G. Semenza a récemment montré que l'utilisation de

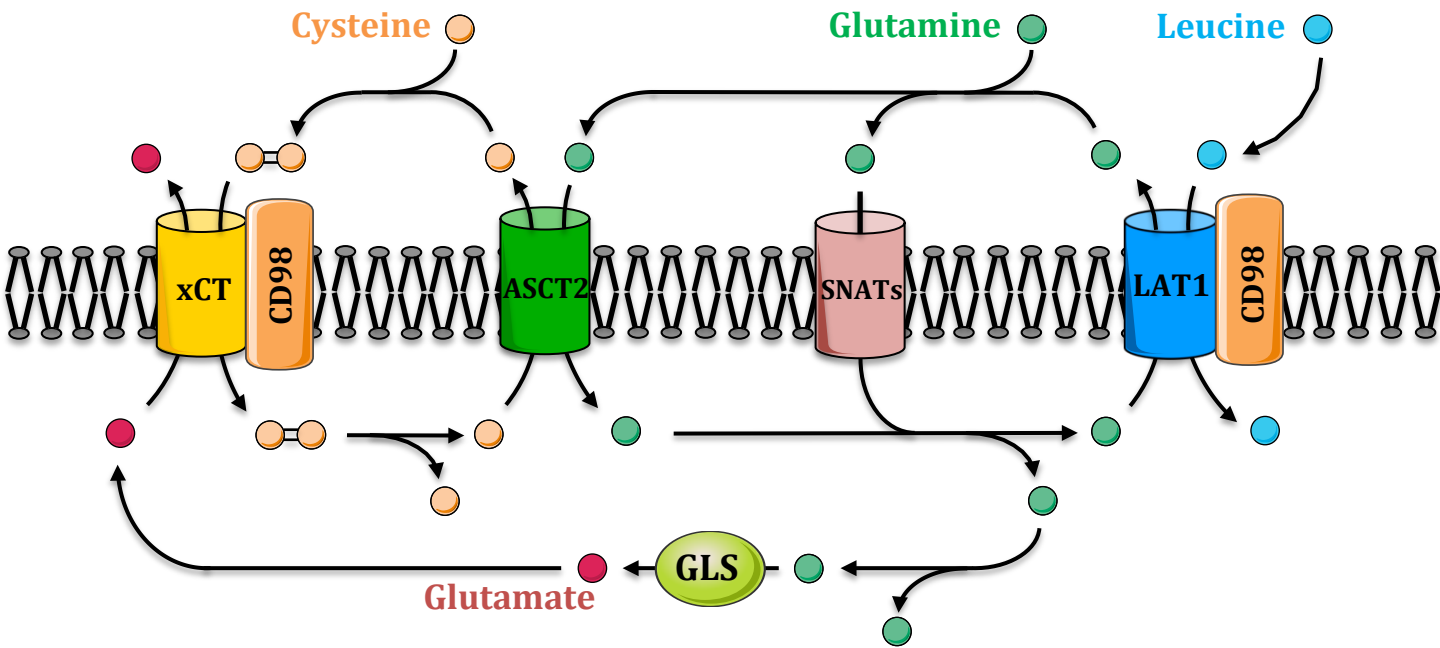


Figure 27 : Schématisation des interactions fonctionnelles entre les transporteurs d'acides aminés dans le cancer.

Les transporteurs d'acides aminés surexprimés dans la majorité des cancers sont principalement des échangeurs ne permettant pas une entrée nette d'acide aminés si ils travaillent seuls (à l'exception des SNATs). Voici une schématisation des différents couplages fonctionnels pouvant potentiellement exister entre ces différents transporteurs.

chimiothérapie dans un modèle de cancer du sein triple négatif entraîne, par l'intermédiaire de HIF-1, une augmentation de l'expression de xCT et de la sous-unité régulatrice de la glutamate-cystéine ligase (GCLM), ce qui participe à la résistance ainsi qu'à l'enrichissement des cellules souches tumorales (Lu, Samanta et al. 2015), principales responsables de la rechute et du développement de métastases chez les patients (Pece, Tosoni et al. 2010, Oskarsson, Batlle et al. 2014). Finalement, l'inhibition de xCT potentialise l'effet de différentes chimiothérapies (Yoshikawa, Tsuchihashi et al. 2013, Chen, Li et al. 2015, Ma, Chen et al. 2015), démontrant l'intérêt thérapeutique de l'utilisation combinée de l'inhibition de xCT avec différents traitements anti-cancereux dans le but d'éviter le développement d'une résistance et d'obtenir un effet anti-tumoral optimal.

2.4. Le transport des acides aminés : une action collaborative

Il est aujourd'hui clair que ces trois transporteurs jouent un rôle central dans le développement de nombreux cancers. Cependant, comment expliquer que ces transporteurs, qui sont des échangeurs obligatoires, peuvent entraîner un apport en acides aminés suffisant pour permettre l'activation de mTORC1 et leur utilisation en tant que métabolites intermédiaires ? Un début de réponse a été apporté en 2009 lorsqu'une étude a démontré que l'activité de LAT1 était couplée à celle de ASCT2 (Nicklin, Bergman et al. 2009). Fonctionnellement, ASCT2 permettrait le transport de glutamine au sein de la cellule permettant ainsi son échange *via* LAT1 contre différents acides aminés essentiels dont la leucine qui est nécessaire à l'activation de mTORC1 (**Figure 27**).

En conséquence, l'inactivation génétique ou l'inhibition pharmacologique de ASCT2 conduit à l'incapacité pour LAT1 de transporter la leucine et d'activer mTORC1 dans certaines lignées cellulaires cancéreuses (Nicklin, Bergman et al. 2009). De la même façon, une étude récente a démontré que la glutamine extracellulaire soutient indirectement le transport de cystine par le transporteur xCT et la synthèse de glutathion dans des lignées de cancer du sein triple négatif (Timmerman, Holton et al. 2013). Une fois que la glutamine pénètre dans les cellules cancéreuses, cet acide aminé peut être transformé en glutamate par la glutaminase 1, fournissant ainsi un substrat pour xCT et permettant donc l'entrée de cystine. Ces résultats suggèrent donc que tout comme LAT1, xCT est fonctionnellement couplé à un transporteur de glutamine tel que

ASCT2 (**Figure 27**). Il est intéressant de noter que les expressions de ASCT2, LAT1, xCT ainsi que de la glutaminase 1 sont contrôlées par l'oncogène c-MYC (cf. ci-dessus et (Dang 2010)), suggérant ainsi une régulation coordonnée permettant d'optimiser le couplage fonctionnel de ces transporteurs et la croissance tumorale.

Il a également été démontré que toutes les cellules cancéreuses ne sont pas strictement dépendantes de ASCT2 pour l'activation de LAT1 et mTORC1 (Broer, Rahimi et al. 2016). En effet, l'inactivation génétique de ASCT2 dans une lignée cellulaire d'ostéosarcome n'a aucun effet sur l'activation de mTORC1 et la prolifération cellulaire. Les auteurs de cette étude ont rapporté que deux autres transporteurs de glutamine : SNAT1 et SNAT2 (*Sodium Neutral Amino acid Transporters*), étaient capables de prendre le relais en l'absence de ASCT2. Ces transporteurs dépendant du sodium ne sont pas des échangeurs et permettent un apport net de glutamine à la cellule tumorale, évitant ainsi la nécessité de couplage à un autre transporteur. Ces résultats qui doivent être confirmés et étendus à d'autres types cellulaires suggèrent donc que LAT1 et xCT ne seraient pas uniquement dépendants de ASCT2 mais aussi du fonctionnement des symporteurs de glutamine Na⁺-dépendants (SNATs, **Figure 27**)

2.5. Utilisation des transporteurs d'acides aminés comme transporteurs de molécules thérapeutiques

Au cours des dernières années, les transporteurs de nutriments ont reçu un grand intérêt en tant que cibles thérapeutiques pour le traitement des cancers. La stratégie visant à « affamer » les cellules tumorales jusqu'à leur mort est en effet l'approche la plus couramment explorée et démontre des résultats encourageants (McCracken and Edinger 2013, Selwan, Finicle et al. 2016). Parmi ces transporteurs de nutriments, nous avons vu précédemment que les transporteurs d'acides aminés jouent un rôle central dans le développement tumoral. En effet, l'inhibition génétique ou pharmacologique de ces derniers, dans des modèles précliniques de cancer, a démontré tout leur potentiel en tant que cible thérapeutique directe. Cependant, il apparaît aujourd'hui qu'une seconde stratégie mérite d'être étudiée. En effet, différentes études ont démontré que de nombreuses drogues sont transportées par les transporteurs d'acides aminés. A titre d'exemple, la L-DOPA et la gabapentine, deux médicaments respectivement utilisés dans le traitement de la maladie de Parkinson et de l'épilepsie,

sont toutes les deux transportées par LAT1 (Yanagida, Kanai et al. 2001, Geier, Schlessinger et al. 2013). Egalement, le melphalan et l'acivicine sont deux médicaments anticancéreux substrats de LAT1 (Yanagida, Kanai et al. 2001, Geier, Schlessinger et al. 2013). Ces éléments suggèrent que ces molécules anticancéreuses pourraient être conçues ou modifiées chimiquement afin d'être reconnues comme substrats pour les transporteurs d'acides aminés surexprimés dans les cancers et donc augmenter leur absorption tumorale, tout en limitant les effets délétères sur les tissus sains. Le laboratoire du Dr. Ganapathy a été l'un des premiers à étudier la possibilité de modifier chimiquement certaines drogues afin qu'elles soient reconnues par certains transporteurs d'acides aminés. Ils ont pu démontrer que l'estérification du médicament antiviral acyclovir (γ -glutamyl-acyclovir) permet son transport par le transporteur d'acides aminés SLC6A14 contrairement à la version standard (Hatanaka, Haramura et al. 2004). De la même façon, une autre étude a démontré que des versions dérivées du naproxen, comprenant la structure de chaînes latérales de certains acides aminés, avaient une meilleure efficacité dans la prévention du cancer du côlon que le naproxen générique, ceci étant certainement dû à une meilleure absorption par les cellules tumorales (Aboul-Fadl, Al-Hamad et al. 2014). Ces études confirment donc la possibilité de générer des médicaments pouvant être des substrats spécifiques de certains transporteurs d'acides aminés. Cependant, de nombreux paramètres peuvent moduler l'efficacité de cette stratégie. En effet, dans les cellules leucémiques, en dépit du fait que le melphalan soit activement transporté par LAT1, la pompe à efflux MDR1 (*Multi Drug Resistance 1*) est capable d'exclure cette drogue, empêchant son accumulation et favorisant la résistance des cellules cancéreuses au melphalan de façon indépendante de l'expression de LAT1 (Kuhne, Tzvetkov et al. 2009). Egalement, l'expression physiologique de ces transporteurs d'acides aminés doit être analysée en détails pour éviter tout effet délétère. A titre d'exemple, l'acivicine a échoué dans divers essais cliniques en raison d'effets toxiques au niveau du cerveau (Hidalgo, Rodriguez et al. 1998). LAT1 étant principalement exprimé au niveau de la barrière hématoencéphalique, son potentiel rôle dans ces effets secondaires est à prendre en considération. Par conséquent, bien que cette idée soit prometteuse, des efforts supplémentaires sont nécessaires pour optimiser cette stratégie.

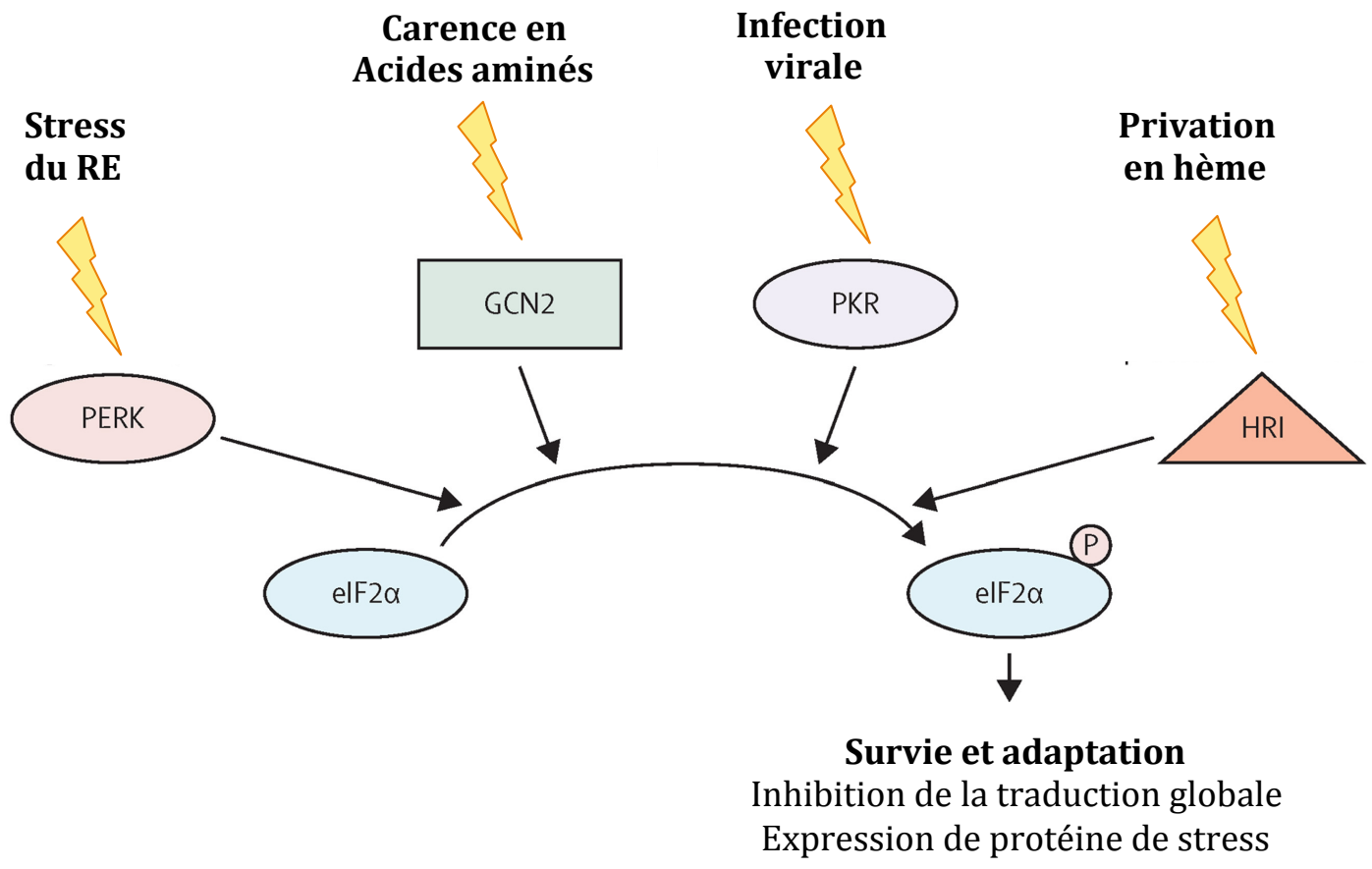


Figure 28 : L'ISR

L'ISR est un mécanisme homéostatique par lequel les cellules eucaryotes détectent et s'adaptent à différents stress cellulaires. PERK (*PKR-like ER kinase*) détecte les protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique, HRI (*Heme-Regulated Inhibitor*) est activée par une privation en hème, PKR (*Protein Kinase double-stranded RNA-dependent*) détecte la présence d'ARN double-brin dans les cellules infectées par des virus et GCN2 (*General Controlled Non-repressed 2*) est activée par une carence en acides aminés. Une fois activées par un stress, ces quatre protéines phosphorylent le facteur d'initiation de la traduction eIF2α ce qui favorisera la survie et l'adaptation cellulaire en inhibant la traduction globale et en favorisant la synthèse de protéines de réponse au stress. (Way *et al.* Lancer Neurol. 2016)

3. Adaptation tumorale à une carence en acides aminés

3.1. L'ISR (*Integrated Stress Response*)

L'ISR est un mécanisme homéostatique par lequel les cellules eucaryotes détectent et s'adaptent à différents stress cellulaires en phosphorylant le facteur d'initiation de la traduction eIF2. Quatre protéines kinases d'eIF2 agissent comme senseurs de cette voie (Donnelly, Gorman et al. 2013) : PERK (*PKR-like ER kinase*) détecte les protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique, HRI (*Heme-Regulated Inhibitor*) est activée par une privation en hème, PKR (*Protein Kinase double-stranded RNA-dependent*) détecte la présence d'ARN double-brin dans les cellules infectées par des virus et GCN2 (*General Controlled Non-repressed 2*) est activée par une carence en acides aminés (**Figure 28**). Dans cette partie traitant de l'adaptation tumorale à une carence en acides aminés, je me focaliserai donc principalement sur GCN2.

3.1.1. GCN2 et homéostasie des acides aminés

GCN2 est une sérine/thréonine kinase conservée au cours du développement, de la levure à l'Homme (Dever, Chen et al. 1993) et a été décrite comme nécessaire à la survie des cellules du système immunitaire ainsi que des embryons de souris durant une carence en nutriments (Zhang, McGrath et al. 2002, Bunpo, Dudley et al. 2009). GCN2 est également impliquée dans l'adaptation de la prise alimentaire durant un régime déficient en acides aminés (Hao, Sharp et al. 2005, Maurin, Jousse et al. 2005). En effet, la consommation d'aliments dépourvus d'un acide aminé induit l'activation de GCN2 dans les neurones du cortex piriforme et de l'hypothalamus, conduisant au développement d'une aversion pour cette alimentation carencée (Hao, Sharp et al. 2005, Maurin, Jousse et al. 2005). GCN2 a également été décrite comme un régulateur de l'homéostasie en acide gras dans le foie au cours d'une privation de leucine (Guo and Cavener 2007). Par conséquent, GCN2 est un élément clé de l'adaptation, non seulement cellulaire mais aussi de l'organisme, à une carence en acides aminés.

GCN2 est composé de 5 domaines protéiques (en partant du N- vers le C-terminal) : **1**) un domaine RWD (*RING finger proteins, WD-repeat-containing proteins,*

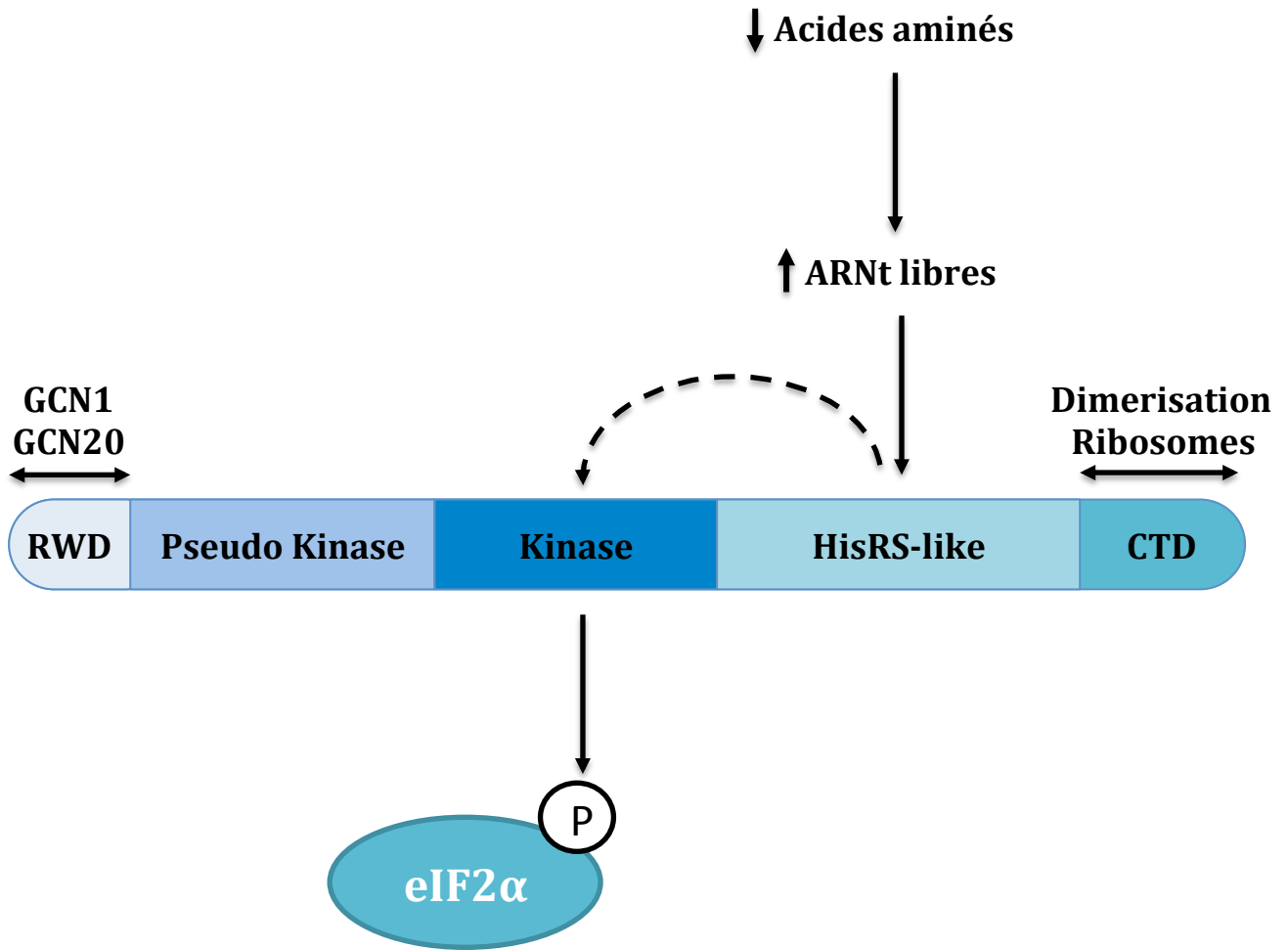


Figure 29 : GCN2

Ce schéma représente les cinq domaines protéiques de GCN2 et leurs rôles. Pendant une carence en acides aminés, les ARNt non chargés vont s'accumuler et se lier au domaine HisRS-like de GCN2 ce qui activera le domaine kinase et entrainera la phosphorylation de eIF2 α par GCN2. Le domaine RWD interagit avec GCN1/GCN20 deux protéines nécessaires à l'activité de GCN2. Le domaine CTD sert de domaine de dimérisation et d'interaction avec les ribosomes.

and yeast DEAD-like helicases) qui se lie au complexe GCN1/GCN20, **2**) un domaine pseudo-kinase qui ne possède pas d'activité enzymatique mais qui reste essentielle au rôle de GCN2, **3**) le domaine catalytique responsable de la phosphorylation de la protéine substrat de GCN2: eIF2 α , **4**) un domaine similaire aux histidyl-tRNA synthétases (HisRS-like) ainsi que **5**) un domaine CTD de dimérisation et d'interaction avec les ribosomes (Castilho, Shanmugam et al. 2014) (**Figure 29**). Pendant une carence en acides aminés, les ARNt non chargés vont s'accumuler et se lier au domaine HisRS de GCN2 (Dong, Qiu et al. 2000, Qiu, Dong et al. 2001). Cette interaction entraîne un changement de conformation induisant l'autophosphorylation de GCN2, et la pleine activation du domaine kinase (Dong, Qiu et al. 2000, Qiu, Dong et al. 2001). Il est important de noter que dans ce mécanisme, l'interaction de GCN1/GCN20 avec le domaine RWD est essentielle pour l'activation de GCN2 (Garcia-Barrio, Dong et al. 2000). GCN2 est capable de lier tous les ARNt non chargés avec une grande affinité (Dong, Qiu et al. 2000) : par conséquent, cette protéine joue un rôle central dans la régulation de l'homéostasie de tous les acides aminés et cela contrairement à mTORC1 qui ne détecte que certains acides aminés spécifiques (cf. Introduction Chapitre I Partie 3.1.2).

3.1.2. eIF2 et régulation de la traduction

Après son activation, GCN2 phosphoryle la sous-unité régulatrice α de eIF2 sur sa sérine 51. Le complexe eIF2 se compose de trois sous-unités : α , β et γ , et joue un rôle essentiel dans l'initiation de la traduction des cellules eucaryotes (Stolboushkina and Garber 2011). L'initiation de la traduction des ARNm nécessite la liaison de eIF2 à un GTP ainsi qu'à l'ARNt initiateur de la méthionine, ceci conduisant à la formation d'un complexe ternaire. Ce complexe s'associe ensuite à la sous-unité ribosomique 40S et aux facteurs eIF1, eIF1A, eIF1B et eIF3, conduisant à la formation du complexe de pré-initiation 43S (**Figure 30**). Dans ce mécanisme, la sous-unité β de eIF2 est responsable de son interaction avec l'ARNm et les autres facteurs d'initiation de la traduction eucaryote. La sous-unité centrale γ fixe quant à elle le GTP et possède une activité GTPase dépendante de la fixation au ribosome. Lors de la reconnaissance du codon d'initiation (AUG), le GTP est hydrolysé en GDP, eIF2 se désolidarise du complexe de pré-initiation 43S et la traduction peut commencer (Lorsch and Dever 2010). Dans le but de débiter un nouveau cycle de traduction, eIF2B remplace le GTP de eIF2 par un

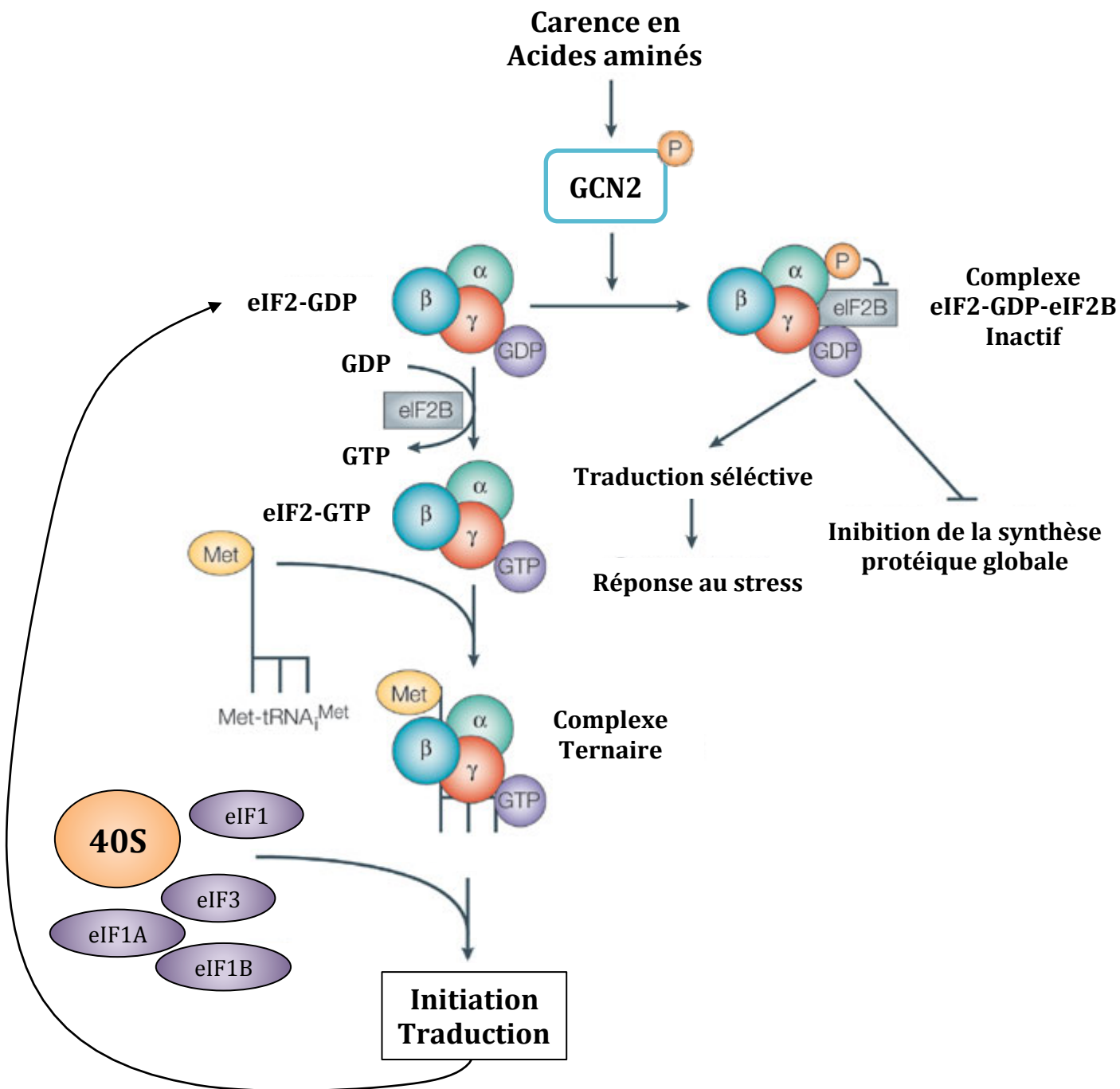


Figure 30 : eIF2 et régulation de la traduction

L'initiation de la traduction des ARNm nécessite la liaison de eIF2 à un GTP (par l'intermédiaire de eIF2B) ainsi qu'à l'ARNt initiateur de la méthionine, ceci conduisant à la formation d'un complexe ternaire. Ce complexe s'associe ensuite à la sous-unité ribosomique 40S et aux facteurs eIF1, eIF1A, eIF1B et eIF3. Une fois le codon start détecté (AUG), de la traduction le GTP est hydrolysé en GDP, eIF2 se désolidarise du complexe de pré-initiation et la traduction commence. En carence d'acides aminés, GCN2 phosphoryle eIF2 qui passe de l'état de substrat à inhibiteur d'eIF2B, ce qui inhibe la liaison d'un GTP à eIF2 et de ce fait entraîne l'inhibition de la synthèse protéique globale et favorise la traduction de protéines spécifiques responsables de l'adaptation cellulaire à la carence. Adapté de Holcik & Sonenberg Nat Rev Mol Cell Biol. 2005

GTP grâce à son activité GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*) et enclenchera la formation d'un nouveau complexe ternaire (Proud 2001). La sous unité α est responsable de la régulation de eIF2, sa phosphorylation par GCN2 réduisant efficacement le niveau de eIF2 sous forme GTP (et donc actif). La phosphorylation de eIF2 par GCN2 transforme eIF2 de substrat en inhibiteur compétitif d'eIF2B (Proud 2001), entraînant une forte diminution de fréquence de formation du complexe ternaire et donc de la traduction des ARNm (**Figure 30**). Ce mécanisme d'inhibition de la synthèse protéique globale assure la survie cellulaire en période de carence en acides aminés. En effet, ce processus permet aux cellules de maintenir leur homéostasie en ajustant leur consommation d'acides aminés et d'énergie lorsque les conditions environnementales sont hostiles (Holcik and Sonenberg 2005, Leprivier and Sorensen 2014).

3.1.3. eIF2 et traduction spécifique des protéines de stress

3.1.3.1. ATF4

Parallèlement à l'inhibition générale de la synthèse des protéines, la phosphorylation de eIF2 α entraîne le démarrage d'un « programme transcriptionnel d'adaptation » en induisant la traduction spécifique de protéines de stress, notamment le facteur de transcription ATF4. En condition normale, l'ARNm de ATF4 est synthétisé; cependant, sa traduction est inhibée. En période de carence en acides aminés, la phosphorylation d'eIF2 α entraîne la traduction spécifique de ATF4 (Harding, Novoa et al. 2000). Le mécanisme régulant la traduction de ATF4 implique la présence de deux uORFs (*Upstream Open Reading Frame*) conservée chez les mammifères (Ait Ghezala, Jolles et al. 2012) au sein de la partie 5'UTR de l'ARNm de ATF4 (Lu, Harding et al. 2004, Vattem and Wek 2004) (**Figure 31 A**). Ces uORFs sont de petites séquences (environ 30 codons) se situant en amont de l'ORF principal. Lors de la traduction de l'ARNm de ATF4, les ribosomes initient la traduction au niveau de l'uORF1 et synthétisent un petit peptide de 3 acides aminés, puis la petite sous-unité ribosomale 40S reprend le balayage de la séquence de l'ARNm en aval de cette séquence. En présence de faibles niveaux de phosphorylation de eIF2 α , eIF2B fixe très rapidement un nouveau GTP sur eIF2, forme un nouveau complexe ternaire et la petite sous unité ribosomale 40S s'associe avec ce dernier et initie la traduction d'un deuxième peptide de 60 acides aminés au niveau de

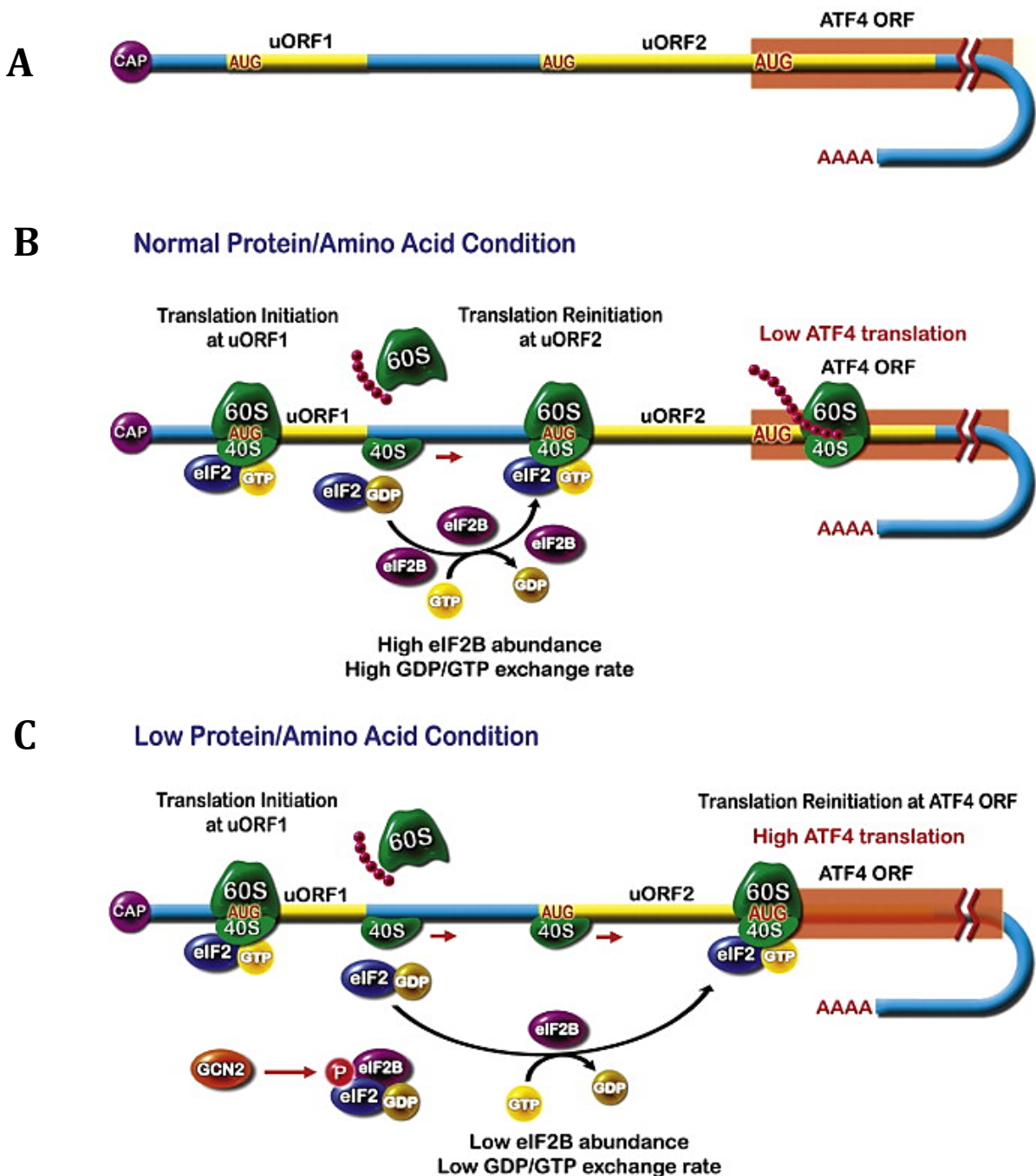


Figure 31 : Régulation de la traduction d'ATF4

A: Deux uORF (maron) sont présents au sein de la partie 5'UTR de l'ARNm d'ATF4. L'uORF2 chevauche l'ORF d'ATF4. **B:** Lors de la traduction de l'ARNm de ATF4, les ribosomes initient la traduction au niveau de l'uORF1 et synthétisent un petit peptide de 3 acides aminés, puis la petite sous-unité ribosomale 40S reprend le balayage de la séquence de l'ARNm en aval de cette séquence. En présence de faibles niveaux de phosphorylation de eIF2 α , eIF2B est libre et fixe très rapidement un nouveau GTP sur eIF2, forme un nouveau complexe ternaire et la petite sous-unité ribosomale 40S s'associe avec ce dernier et initie la traduction d'un deuxième peptide de 60 acides aminés au niveau de l'uORF2. La synthèse de ce peptide aura un effet inhibiteur pour la traduction de ATF4 car sa séquence chevauche son ORF. **C:** En carence d'acide aminé GCN2 phosphoryle eIF2 ce qui inhibe une majorité des protéines eIF2B et ralentit la fixation d'un GTP sur eIF2 et la formation du complexe ternaire. Par conséquent, l'assemblage du complexe d'initiation de la traduction a lieu après le AUG de l'uORF2 et permet la détection et la traduction de l'ORF de ATF4. D'après Kilberg *et al.* Trends in Endocrinology and Metabolism 2009

l'uORF2. La synthèse de ce peptide aura un effet inhibiteur pour la traduction de ATF4 car sa séquence chevauche son ORF et empêchera donc sa détection (**Figure 31 B**). Lorsque eIF2 α est phosphorylé par GCN2 en réponse à une carence en acides aminés, eIF2B est inhibé (**Figures 30 & 31 C**) et la fixation d'un nouveau GTP sur eIF2 est plus longue. Ainsi, après la synthèse du peptide de trois acides aminés, la réassociation entre la sous-unité 40S qui "scanne" l'ARNm de ATF4 et le complexe ternaire se fait beaucoup plus tardivement, majoritairement après l'uORF2. Par conséquent, le complexe d'initiation de la traduction est capable de détecter l'ORF de ATF4 et d'induire sa traduction spécifique (**Figure 31 C**) (Lu, Harding et al. 2004, Vattem and Wek 2004).

ATF4 fait partie de la famille des facteurs de transcription de type ATF/CREB (*Activating Transcription Factor/Cyclic AMP Response Element Binding protein*) comportant un domaine bZip (*Basic region-leucine Zipper*). Les protéines de cette famille se fixent sur l'ADN au niveau de sites consensus de type CARE (*C/EBP-ATF Response Element*) composés d'un site de fixation pour les ATF suivit d'un site de fixation pour les protéines de type C/EBP (Kilberg, Shan et al. 2009) (**Figure 32**). ATF4 régule la transcription de nombreux gènes impliqués dans la défense et l'adaptation cellulaire à de nombreux stress, tels qu'un stress du réticulum endoplasmique, un stress oxydatif ou une carence en acides aminés. ATF4 est également requis au niveau du développement embryonnaire, les souris invalidées pour ATF4 étant aveugles (Hettmann, Barton et al. 2000), anémiques (Masuoka and Townes 2002), beaucoup moins fertiles (Fischer, Johnson et al. 2004) et présentant une faible masse osseuse (Yang, Matsuda et al. 2004). ATF4 fut initialement décrit comme un répresseur de la transcription de l'enképhaline humaine ainsi que d'autres gènes (Karpinski, Morle et al. 1992). Suivant cette découverte, d'autres études ont démontré que ATF4 était également capable d'activer la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme et le transport des acides aminés (Harding, Zhang et al. 2003, Sato, Nomura et al. 2004), l'autophagie (Rzymiski, Milani et al. 2010, B'Chir, Maurin et al. 2013) et l'angiogenèse (Roybal, Hunsaker et al. 2005, Wang, Ning et al. 2013), trois processus biologiques essentiels à l'adaptation cellulaire aux carences en acides aminés et oxygène. ATF4 trans-active également l'expression de certains gènes en interagissant avec diverses protéines partenaires. Par exemple, son interaction avec NRF2 induit des gènes cibles impliqués dans la réponse au stress oxydatif tels que *HO-1* (*Heme Oxygenase-1*) (He, Gong et al. 2001). Il est possible que les

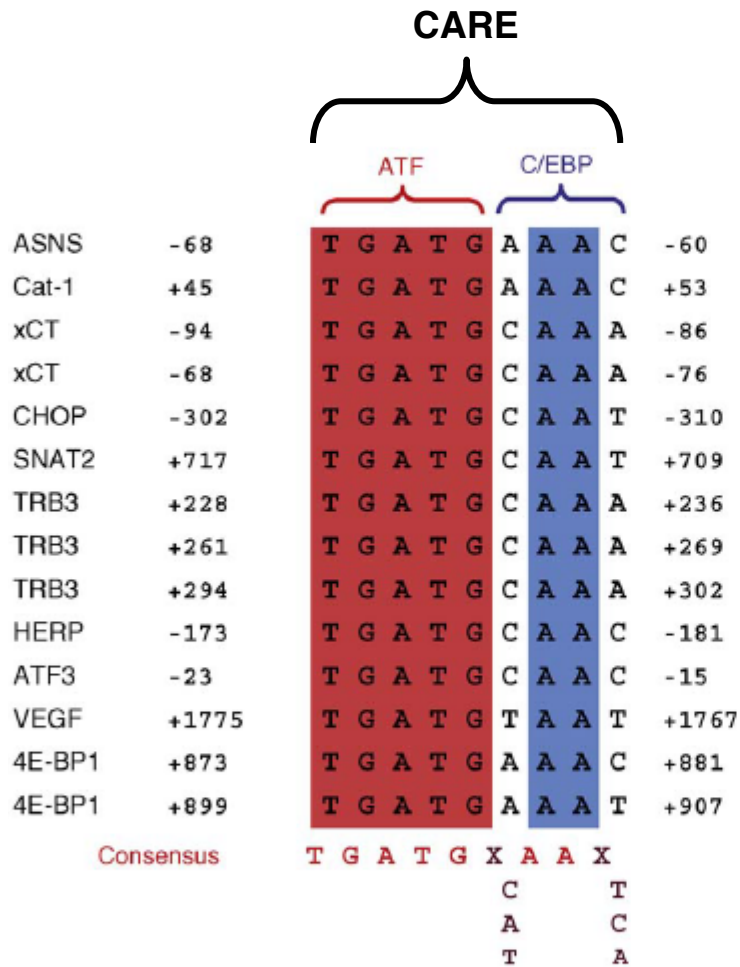


Figure 32 : Séquence consensus du site CARE

Les site de fixation CARE (C/EBP-ATF *Response Element*) sont composés d'un site de fixation pour les ATF (rouge) suivit d'un site de fixation pour les protéines de type C/EBP (bleu) . Sur cette figure sont également indiqués différents gènes présentant un site de fixation de type CARE. D'après Kilberg *et al.* Trends in Endocrinology and Metabolism 2009

différents partenaires de dimérisation fournissent une spécificité de signal de transcription générée par ATF4 en fonction de la kinase de l'ISR se trouvant activée.

ATF4 est également capable de réguler sa propre activité en induisant la transcription de certaines protéines telles que C/EBP β (Thiaville, Dudenhausen et al. 2008), ATF3 (Jiang, Wek et al. 2004, Pan, Chen et al. 2007) et CHOP (C/EBP homology protein) (Fawcett, Martindale et al. 1999). Une étude s'intéressant à la régulation de l'expression de l'ASNS (*Asparagine Synthetase*) a démontré que ATF4 était capable de se complexer à C/EBP β pour induire la transcription du gène *ASNS* en réponse à une diminution de la concentration en acides aminés. Après plusieurs heures de carence ATF4 serait progressivement remplacé par ATF3 sur le promoteur du gène *ASNS* et ceci concordant avec l'inhibition de son expression (Chen, Pan et al. 2004). De façon intéressante, par l'intermédiaire d'un épissage alternatif, il a également été démontré que différentes isoformes de ATF3, possédant des fonctions opposées, peuvent être exprimées (Pan, Chen et al. 2003). Comme démontré dans l'étude de l'expression de l'ASNS, l'isoforme de ATF3 de taille complète est un antagoniste de l'activité de ATF4, tandis que l'isoforme ATF3 Δ ZIP3 (qui présente un domaine *leucine zipper* tronqué) augmente l'activité de ATF4. Plus récemment, une autre étude a démontré que, en plus de ATF3, CHOP agit également comme un inhibiteur de l'activité promotrice de ATF4 sur le gène *ASNS* après plusieurs heures de carence en acides aminés (Su and Kilberg 2008). A l'inverse, il a été démontré que l'interaction CHOP-ATF4 favorise l'expression de TRB3 et induit la mort cellulaire. Ces études démontrent que ATF4 auto-régule son activité au cours du temps en induisant l'expression de protéines qui vont contrôler son activité promotrice/inhibitrice de transcription en réponse à une carence en acides aminés.

3.1.3.2. CHOP et GADD34

En plus de sa transcription induite par ATF4, CHOP fait également partie des protéines traduites de façon préférentielle lors de la phosphorylation de eIF2. Cependant, le mécanisme sous-jacent est différent de celui régulant l'expression de ATF4. La partie 5'UTR de CHOP ne présente qu'un seul uORF, celui-ci servant à inhiber la traduction de CHOP en condition normale. En condition de carence, le complexe de pré-initiation 43S « saute » cet uORF et détecte l'ORF de CHOP, permettant ainsi sa traduction. Ce mécanisme appelé « *by pass* » et régulé par la phosphorylation de eIF2, n'est toujours pas totalement compris (Palam, Baird et al. 2011). L'uORF de CHOP

présente deux AUG en position 1 et 4 qui sont conservées chez les vertébrés. Ces deux AUG peuvent servir de codon d'initiation de traduction ; cependant, le second semble être prédominant. Il est connu depuis la fin des années 80 que la fréquence d'initiation de traduction lors du scan de l'ARNm par le complexe de pré-initiation 43S est directement influencée par la séquence Kozak entourant l'AUG (Kozak 1987), la séquence optimale étant : 5' -GCC(A/G)CCAUG(G)-3'. Toute modification de cette séquence, en particulier en position -3 et +4 (comparé au A de l'AUG) réduit l'efficacité d'initiation de la traduction. Il a été rapporté que les deux AUG de l'uORF de CHOP présentent des séquences Kozak éloignées de la séquence optimale contrairement à l'AUG de l'ORF de CHOP. Ainsi en condition normale, il a été suggéré que la faible efficacité d'initiation soit compensée par l'abondance de complexe ternaire, permettant ainsi la détection et la traduction de cet uORF. Il a également été suggéré que la partie carboxy-terminale de l'uORF exerce une activité inhibitrice de l'élongation ou de la terminaison de la traduction. Ces deux phénomènes entraînent donc l'inhibition de la traduction de l'ORF de CHOP (Palam, Baird et al. 2011). En condition de carence, eIF2 est phosphorylé et la quantité de complexe ternaire est diminuée. Cet événement, associé à la faible efficacité d'initiation de l'uORF due à une séquence Kozak différente de la séquence optimale, entraîne le *by-pass* de cet uORF par le complexe de pré-initiation 43S qui pourra alors détecter l'ORF de CHOP présentant une séquence Kozak consensus optimale (Palam, Baird et al. 2011).

CHOP est un facteur de transcription de la famille des C/EBP qui interagit avec d'autres membres de cette famille où les protéines ATF telles que ATF4. CHOP régule l'expression de nombreux gènes en réponse à un stress cellulaire (Wang, Kuroda et al. 1998). CHOP est notamment considéré comme médiateur de la mort cellulaire en contrôlant l'expression de différents gènes clés du processus d'apoptose tels que Puma, Bim ou encore DR5 (Yamaguchi and Wang 2004, Ghosh, Klocke et al. 2012). En plus de ce rôle apoptotique, CHOP contrôle l'expression de GADD34 (Marciniak, Yun et al. 2004). La protéine GADD34 contrôle la déphosphorylation de eIF2 α en activant la phosphatase de eIF2 α : PP1c. Ce mécanisme permet donc un rétrocontrôle négatif permettant la réactivation de la synthèse protéique globale une fois la période de stress terminée (Kojima, Takeuchi et al. 2003, Novoa, Zhang et al. 2003). De façon intéressante, GADD34 fait également partie des protéines traduites lorsque eIF2 α est phosphorylé (Lee, Cevallos et al. 2009). En effet, la partie 5'UTR de l'ARNm GADD34 présente, comme celui

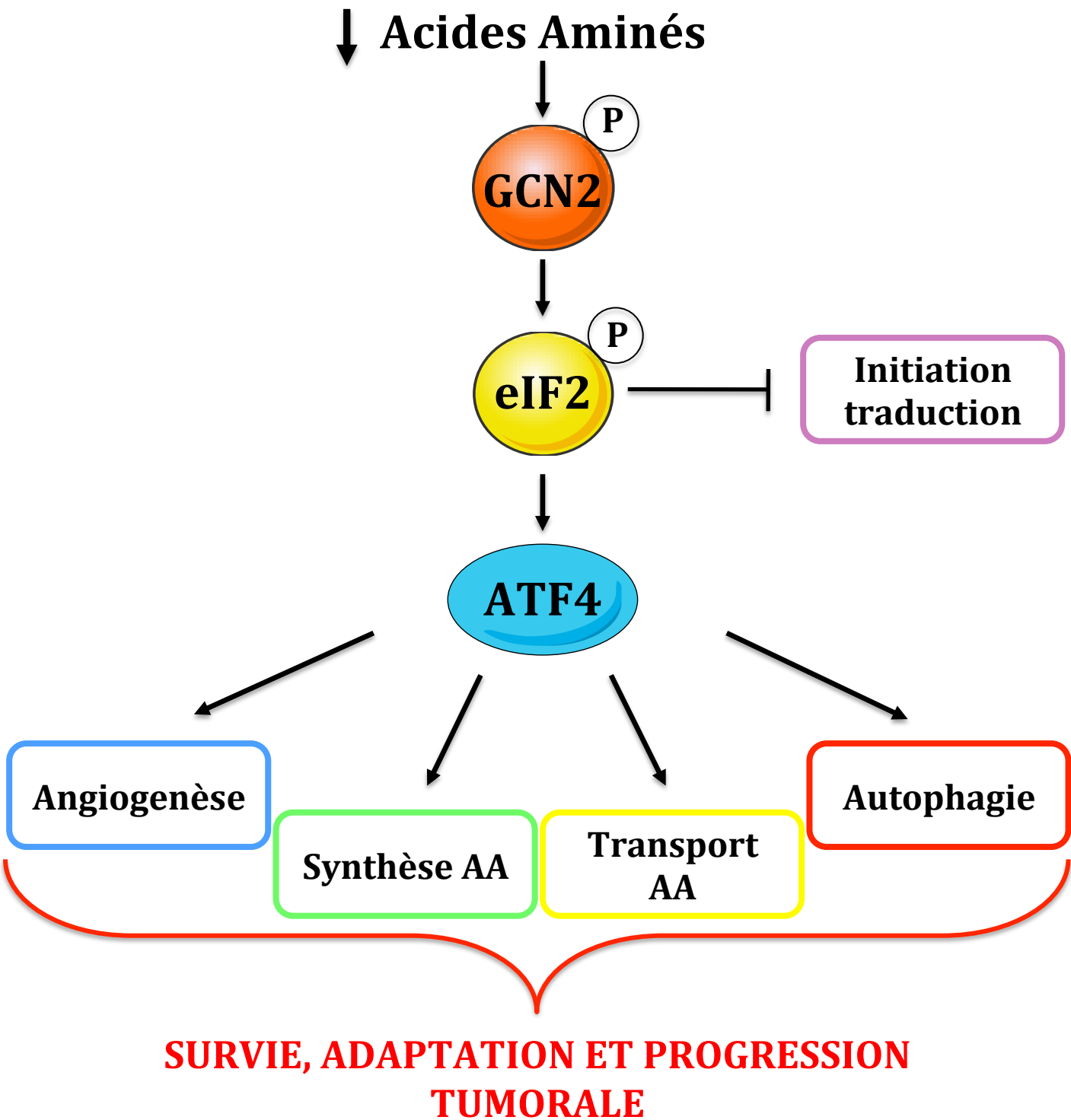


Figure 33 : Rôle de GCN2 dans l'adaptation tumorale à une carence en acides aminés

En période de carence en acides aminés, GCN2 détectera l'accumulation de tNRA libre ce qui entrainera son activation par autophosphorylation. Une fois activée GCN2 phosphoryle eIF2 entrainant l'inhibition de l'initiation de la synthèse protéique et la traduction spécifique d'ATF4. L'expression d'ATF4 entrainera le lancement d'un programme transcriptionnel favorisant l'angiogénèse, le transport et la synthèse des acides aminés et l'autophagie permettant ainsi la survie, l'adaptation et la progression tumorale en condition carencée en acides aminés.

de ATF4, deux séquences uORF permettant sa régulation par la phosphorylation de eIF2 α et démontrant un contrôle aussi bien transcriptionnel que traductionnel de la voie GCN2-eIF2. Le facteur de transcription CHOP a également été impliqué dans l'induction de différents gènes-clés pour le processus autophagique, favorisant ainsi la survie cellulaire en période de carence en acides aminés (B'Chir, Chaveroux et al. 2014).

3.1.4. GCN2 et développement tumoral

En considérant le fait que la vascularisation anarchique et incomplète des tumeurs soumet les cellules cancéreuses à une faible disponibilité en nutriments et notamment en acides aminés, il n'est pas surprenant que l'expression, ainsi que la phosphorylation intra-tumorale de GCN2 soient significativement augmentées (Ye, Kumanova et al. 2010, Wang, Ning et al. 2013). Cependant, de nombreuses études ont démontré que cette activation n'était pas une simple relation de cause à effet puisque l'invalidation de GCN2 ou l'inhibition de la phosphorylation de eIF2 α *in vitro* compromettent fortement la survie des cellules cancéreuses en cas de carence en acides aminés (Ye, Kumanova et al. 2010). De plus, l'invalidation de GCN2 et ATF4 dans des modèles de xéno greffe perturbe fortement la croissance tumorale (Ye, Kumanova et al. 2010, Wang, Ning et al. 2013), démontrant le rôle critique de la voie GCN2-eIF2 dans l'adaptation et la croissance tumorale.

L'axe GCN2-eIF2 favorise la croissance tumorale à de nombreux niveaux (**Figure 33**). **1)** L'induction d'ATF4 par cette voie favorise l'expression du VEGF, un facteur pro-angiogénique. En effet, l'invalidation de GCN2 diminue l'expression de VEGF *in vitro* et réduit fortement l'angiogenèse tumorale *in vivo* (Wang, Ning et al. 2013). **2)** L'axe GCN2-eIF2-ATF4 favorise également l'expression d'enzymes nécessaires à la synthèse d'acides aminés non-essentiels. Comme vu précédemment (cf. Introduction Chapitre II Partie 3.1.3.1), l'induction de ATF4 favorise l'expression de l'asparagine synthase (ASNS), une enzyme critique pour le maintien des niveaux intracellulaires d'asparagine, un acide aminé qui favorise la prolifération dans certaines lignées cancéreuses (Ye, Kumanova et al. 2010). Egalement, un travail publié récemment a démontré que l'activation de l'axe GCN2-eIF2-ATF4 résultant de la carence en acides aminés de cellules de souris et de cellules humaines, entraîne une augmentation de la synthèse de sérine (Ye, Mancuso et al. 2012), voie biosynthétique essentielle au développement de nombreux types de tumeurs (Possemato, Marks et al. 2011, Locasale 2013, Tsun and Possemato 2015). **3)**

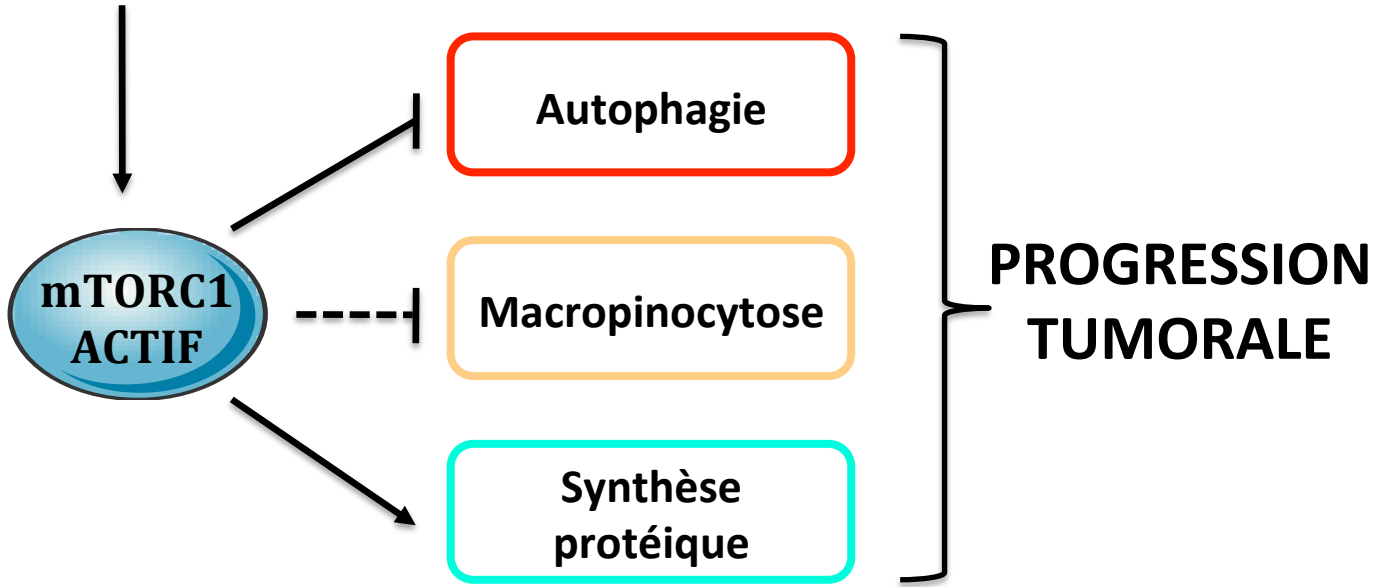
ATF4 est également responsable de l'expression des transporteurs d'acides aminés LAT1, ASCT2 et xCT (Harding, Zhang et al. 2003, Wang, Bailey et al. 2011, Ye, Mimura et al. 2014, Ren, Yue et al. 2015), trois transporteurs essentiels au développement tumoral (cf. Partie 2 de ce Chapitre II). **4)** Enfin, il a été montré que l'induction de ATF4 et CHOP dans les 6 premières heures d'une carence en acides aminés favorise l'expression de différents gènes-clés du processus autophagique et favorise la survie de cellules non transformées. A l'inverse, lorsque la privation en acides aminés est prolongée, CHOP inhibe l'autophagie et entraîne l'apoptose par la transcription de gènes pro-apoptotiques (B'Chir, Chaveroux et al. 2014). Cependant, l'insensibilité à la multitude des voies capable de déclencher l'apoptose est une des altérations oncogéniques caractéristique des cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg 2000), il est donc possible que, dans le cas des tumeurs, CHOP favorise principalement la réponse autophagique, permettant le recyclage des acides aminés et la survie limitée en carence nutritive.

La voie GCN2-eIF2 est donc une voie adaptative essentielle à la survie et la croissance tumorale en condition de carence en acides aminés. De plus, il est intéressant de noter que ATF4 partage de nombreux gènes cibles avec les facteurs de transcription protumoraux HIFs et MYC. Il a été rapporté que MYC était plutôt un amplificateur de promoteurs déjà actifs plutôt qu'un activateur d'un nouveau set de gènes (Lin, Loven et al. 2012, Nie, Hu et al. 2012, Blum, Hao et al. 2015). Il est donc fort probable que les facteurs de transcriptions MYC et ATF4 agissent de façon synergique et donnent un avantage sélectif pour les cellules tumorales pendant une carence en acides aminés.

3.2. mTORC1 et carence en acides aminés

Comme nous l'avons vu au cours du Chapitre I de cette Introduction, le complexe mTORC1 joue un rôle essentiel dans la coordination des différents procédés métaboliques avec la disponibilité en nutriments. La leucine, l'arginine ainsi que la glutamine sont les acides aminés majeurs régulant l'activation de mTORC1, une carence de l'un de ces trois nutriments entraînant une chute d'activité de mTORC1. Lors d'une période de carence en acides aminés, l'inhibition de mTORC1 et l'adaptation métabolique qui en découle exerce un effet protecteur pour les cellules (**Figure 34**). Le premier mécanisme impliqué dans la survie cellulaire induite par l'inhibition de mTORC1 est l'arrêt de la synthèse protéique globale (cf. Introduction Chapitre I Partie

+ Acides Aminés



- Acides Aminés

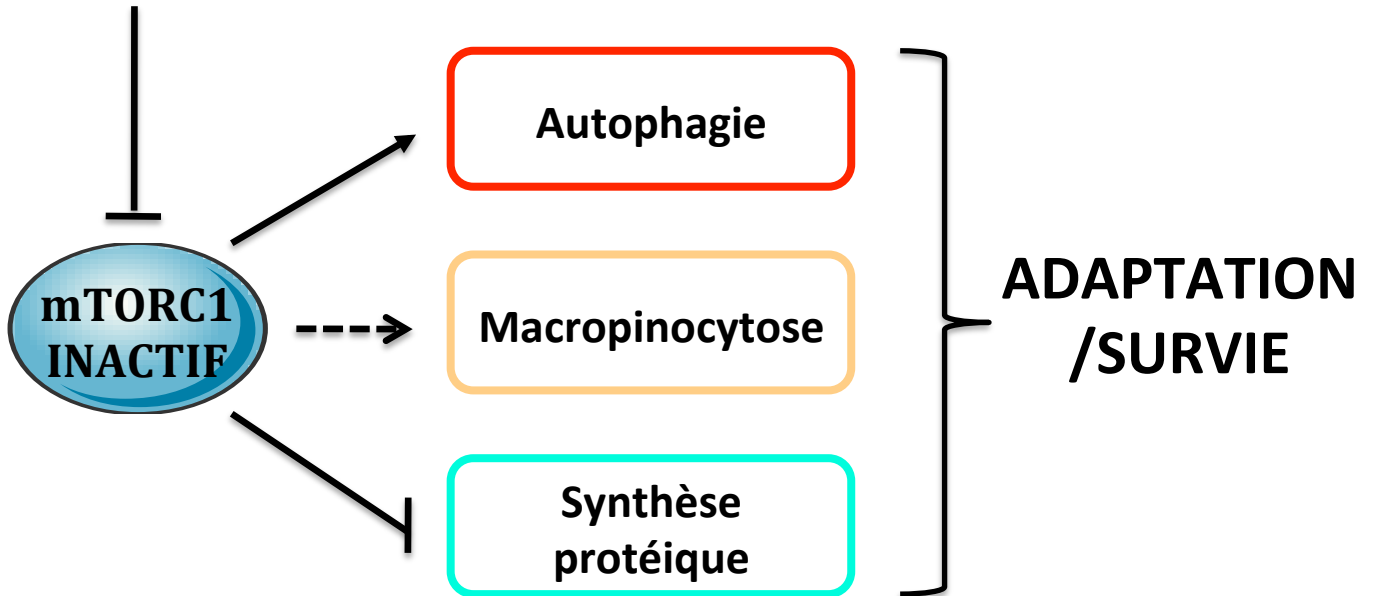


Figure 34 : Rôle de mTORC1 dans l'adaptation tumorale à une carence en acides aminés

Lorsque les acides aminés sont présents en concentration suffisante, mTORC1 favorise de nombreux procédés métaboliques dont la synthèse protéique permettant ainsi la progression tumorale (cf Introduction Chapitre 1 Partie 4). Lorsque les acides aminés (leucine, arginine et glutamine) manquent, mTORC1 est inactivé ce qui entraîne l'inhibition de l'anabolisme et l'activation de différents procédés cataboliques tels que l'autophagie et la macropinocytose permettant l'obtention d'acides aminés à partir de nouvelles sources et ainsi l'adaptation et la survie tumorale pendant ces périodes de carence.

4.1.1). Ce mécanisme permet la sauvegarde des ressources énergétiques et nutritives en période de stress et est essentiel à la survie et à l'adaptation cellulaire (Holcik and Sonenberg 2005, Choo, Kim et al. 2010, Leprivier, Rotblat et al. 2015). Egalement, l'inhibition de mTORC1 va favoriser le processus autophagique (cf. Introduction Chapitre I Partie 4.1.5), permettant ainsi le recyclage des protéines et de certaines organelles afin de fournir une nouvelle source d'acides aminés et de lipides. En effet, il a été démontré que, bien que ralentissant la croissance tumorale, ce procédé catabolique favorisait la survie tumorale dans les zones hypoxiques et dépourvues en nutriments (Degenhardt, Mathew et al. 2006).

Egalement, deux études indépendantes ont suggéré un rôle surprenant de mTORC1 dans l'utilisation d'un mode alternatif d'absorption d'acides aminés par les cellules tumorales en cas de carence appelé macropinocytose. La macropinocytose est un processus d'endocytose hautement conservé par lequel le fluide extracellulaire et son contenu sont internalisés et digérés par les cellules *via* de grandes vésicules hétérogènes appelées macropinosomes (Kerr and Teasdale 2009). Des études antérieures ont démontré que les cellules transformées par l'oncogène Ras utilisaient ce mécanisme afin d'internaliser des protéines extracellulaires et de les recycler dans les lysosomes, dans le but d'obtenir une nouvelle source d'acides aminés. Ce procédé permet à ces cellules de survivre et de continuer à croître lorsque les acides aminés libres sont absents du milieu extracellulaire (Commisso, Davidson et al. 2013, Kamphorst, Nofal et al. 2015). Il a été récemment publié que mTORC1 jouait un rôle prépondérant dans la régulation de la macropinocytose. En effet, l'inhibition de mTORC1 favorise l'utilisation de ce mécanisme par les cellules tumorales et leur permet de survivre et de proliférer (Palm, Park et al. 2015, Sung, Choi et al. 2015). Ces résultats, démontrant une prolifération maintenue malgré l'inhibition de mTORC1, sont cependant surprenants et fortement débattus compte tenu du rôle essentiel de l'activité de mTORC1 dans la croissance tumorale (cf. Introduction Chapitre I Partie 5.2). Cependant, il apparaît clair que ce mécanisme permet la survie ainsi que l'adaptation des cellules tumorales pendant une période de forte carence en acides aminés, ajoutant ainsi un nouveau rôle essentiel à la régulation de mTORC1 par les nutriments.

3.3. Interaction entre GCN2 et mTORC1

Il apparaît aujourd'hui que les voies de signalisation contrôlées par GCN2 et mTORC1 se complètent pour favoriser la survie cellulaire en période de carence en acides aminés. En effet, ces deux protéine kinases agissent de concert en inhibant la synthèse protéique et en activant le flux autophagique en période de carence. Cependant, de nombreuses études suggèrent que ces deux voies de signalisation ne travaillent pas uniquement en parallèle mais sont interconnectées par différents mécanismes. Les premières preuves de ces connections proviennent de travaux réalisés chez la levure, où il a été montré que l'utilisation de rapamycine stimule l'activation de GCN2 et la phosphorylation de eIF2 α sans augmenter la quantité d'ARNt libres, suggérant que la kinase TOR, lorsqu'elle est active, inhibe GCN2 (Cherkasova and Hinnebusch 2003, Kubota, Obata et al. 2003). Cependant, aucun effet de la rapamycine ainsi que d'autres inhibiteurs de mTORC1 n'a été observé sur la phosphorylation de eIF2 α dans une lignée de fibroblastes embryonnaires de souris (Thoreen, Chantranupong et al. 2012). Cette différence avec la levure suggère la possibilité que ce mécanisme de régulation de GCN2 par TOR ne soit peut-être pas conservé chez les mammifères. A l'inverse, des études sur des souris invalidées pour GCN2 ont montré que cette kinase régulait négativement la phosphorylation des cibles de mTORC1 (S6K et 4EBP1) dans le foie et le pancréas en cas de diète carencée en leucine ou d'un traitement à l'asparginase (Anthony, McDaniel et al. 2004, Bunpo, Dudley et al. 2009). Egalement, les souris invalidées pour GCN2 et maintenues avec un régime déficient en leucine présentent une augmentation de l'activité mTORC1 dans le foie, associée à une diminution de la sensibilité à l'insuline (Xiao, Huang et al. 2011), démontrant clairement le rôle de GCN2 *in vivo* dans la régulation de mTORC1.

Plusieurs études se sont intéressées aux mécanismes moléculaires interconnectant mTORC1 et GCN2. La principale explication avancée est le fait que l'activation de GCN2 entraîne l'expression de REDD1, protéine inhibitrice de mTORC1, via le facteur de transcription ATF4 (cf. Introduction Chapitre I Partie 3.1.5). Cependant, il apparaît aujourd'hui que l'expression de REDD1 n'est pas la seule connexion entre ces deux voies régulatrices de l'homéostasie des acides aminés. En effet, une étude très récente a démontré que l'inactivation précoce de mTORC1, induite par une carence en leucine, est indépendante de GCN2 ; cependant, l'axe GCN2-eIF2-ATF4 est absolument requis pour maintenir l'inhibition de mTORC1 en cas de carence prolongée (Ye, Palm et

al. 2015). En effet, l'invalidation de GCN2 ou d'ATF4 entraîne une réactivation de mTORC1 avec son recrutement au niveau du lysosome ainsi que la phosphorylation de ses substrats deux heures après le début de la carence en leucine, tandis que dans les cellules sauvages l'inhibition persiste jusqu'à plus de 24h. Les auteurs de cette étude ont démontré que le rôle essentiel de l'axe GCN2-eIF2-ATF4 dans la régulation de mTORC1 était dû au fait que ATF4 induisait l'expression de Sestrin2, une protéine capable de détecter une carence en leucine intracellulaire et d'inhiber mTORC1. Ainsi, lors d'une carence en acides aminés, mTORC1 est inhibé de façon très rapide et indépendante de GCN2 ; cependant lorsque la carence persiste, l'activation de GCN2 entraînera l'expression de la Sestrin2, permettant le maintien du complexe mTORC1 sous forme inactive et de ce fait la survie cellulaire en carence d'acides aminés (Ye, Palm et al. 2015). Ces différentes études sur les connexions entre GCN2 et mTORC1 démontrent bien que le maintien de l'homéostasie cellulaire des acides aminés n'est pas régulé par deux axes de signalisation indépendants mais plutôt *via* un programme moléculaire complexe impliquant de très nombreux acteurs. De plus, si Sestrin2 est le senseur de leucine de la voie de signalisation mTORC1, la protéine CASTOR1 est quant à elle responsable de la détection et de la régulation de mTORC1 par l'arginine (cf. Introduction Chapitre I Partie 3.1.2). De nombreuses similitudes existent entre Sestrin2 et CASTOR1 d'un point de vue mécanistique : il serait donc intéressant d'étudier si ATF4 est également capable d'induire l'expression de CASTOR1 en cas de carence en arginine.

RESULTATS

Cette section se compose d'une publication ainsi que d'un manuscrit résumant les résultats d'un projet en cours :

PUBLICATION

(Cormerais Y. et al. Cancer Res. May 2016, in press)

—

L'invalidation génétique du complexe multifonctionnel CD98/LAT1 démontre le rôle clé du transport d'acides aminés essentiels dans le contrôle de mTORC1 et la croissance tumorale

PROJET EN COURS

Etude du transporteur ASCT2 dans la croissance tumorale et analyse génétique du couplage fonctionnel ASCT2::LAT1

PUBLICATION

L'invalidation génétique du complexe multifonctionnel CD98/LAT1 démontre le rôle clé du transport d'acides aminés essentiels dans le contrôle de mTORC1 et la croissance tumorale

Y. Cormerais, S. Giuliano, R. LeFloch, B. Front, J. Durivault, E. Tambutté, P. A. Massard, L. Rodriguez de la Ballina, H. Endou, M. F. Wempe, M. Palacin, S. K. Parks, et J Pouyssegur.

(Article accepté dans le journal Cancer Research en mai 2016)

Contexte et objectif de la recherche

Au cours de leur développement, les cellules tumorales sont confrontées à de nombreux facteurs de stress et doivent développer des stratégies adaptatives afin de survivre et se développer. La limitation des nutriments essentiels est particulièrement aiguë dans les tumeurs hypoxiques à croissance rapide (McCracken and Edinger 2013, Parks, Cormerais et al. 2016). Fait intéressant, dans des conditions de perfusion limitée en oxygène, les cellules tumorales sont capables d'induire, par l'intermédiaire des facteurs de transcription HIFs (Hypoxia Inducible Factor), l'augmentation de l'expression des transporteurs de nutriments essentiels tels que le transporteur de glucose GLUT1 et le transporteur d'acides aminés essentiels LAT1/CD98 (Elorza, Soro-Arnaiz et al. 2012, Parks, Cormerais et al. 2016).

Comme nous l'avons vu dans l'Introduction Chapitre 2 Partie 2.2, l'hétérodimère multifonctionnel LAT1/CD98 est un transporteur fortement surexprimé dans de nombreux types de cancers et représente un facteur de mauvais pronostic pour les patients. La localisation fonctionnelle de LAT1 à la membrane plasmique nécessite sa liaison à la glycoprotéine CD98 qui lui sert de chaperon (Fenczik, Zent et al. 2001). Différents travaux ont suggéré que CD98 possède une activité pro-tumorale indépendante de LAT1 en interagissant avec la queue cytoplasmique des protéines intégrine β (Fenczik, Zent et al. 2001). Cette interaction amplifie différents processus

cellulaires tels que l'adhésion, la migration et la survie cellulaire (Rintoul, Buttery et al. 2002, Feral, Nishiya et al. 2005, Prager, Feral et al. 2007). Plusieurs études ont conclu que CD98 *via* sa capacité à amplifier le signal des intégrines est essentiel à la prolifération des lymphocytes T, des lymphocytes B ainsi qu'à la croissance de certains modèles tumoraux, tandis que le rôle de LAT1 serait mineur dans ce contexte (Feral, Nishiya et al. 2005, Cantor and Ginsberg 2012, Estrach, Lee et al. 2014). Considérant l'importance des acides aminés dans le contexte de croissance tumorale (cf. Introduction Chapitre II), ces conclusions débattues dans la littérature (McCracken and Edinger 2013) nous ont paru surprenantes. Vu l'intérêt du laboratoire pour les 'cibles Hypoxiques' nous avons décidé pour ce projet de thèse d'approfondir le rôle exact de LAT1 et de CD98 dans la croissance tumorale.

Résultats et conclusions

Afin de répondre à notre problématique visant à discriminer les rôles pro-tumoraux de LAT1 et CD98 nous avons réalisé l'inactivation génétique de *LAT1* et/ou *CD98* dans des lignées d'adénocarcinomes colique et pulmonaire (LS174T et A549).

J'ai pu montrer que l'inactivation de LAT1 cause une suppression totale du transport de la leucine, sodium-indépendant ; entraînant une perte d'homéostasie des AA conduisant à l'activation de la voie de stress GCN2/eIF2 α /ATF4, l'inhibition drastique de mTORC1 et la suppression totale de la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo*. De manière intéressante, j'ai pu confirmer et généraliser ce concept par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de LAT1 (JPH203) sur quatre autres lignées cellulaires issues de cancers du côlon, poumon et rein.

A l'inverse, bien qu'elle soit accompagnée d'une chute de 90% de l'activité de LAT1, l'inactivation génétique de *CD98* dans les lignées LS174T et A549 ne s'est traduit par aucun phénotype visible aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Cependant, la suppression des 10% d'activité résiduelle du transporteur LAT1 de ces cellules par inactivation génétique ou pharmacologique est suffisante pour abolir leur potentiel tumoral. Ces résultats me permettent ainsi d'écarter tout mécanisme d'adaptation indépendant de LAT1 et démontrent le rôle essentiel de ce transporteur dans le développement tumoral.

Pour conclure, mes résultats démontrent que le rôle pro-tumoral clé du complexe multifonctionnel CD98 / LAT1 est porté par la capacité de LAT1 à maintenir

l'homéostasie des acides aminés et l'activité mTORC1. De plus, mon travail suggère que l'interaction CD98-integrine ne joue qu'un rôle minoritaire dans le développement tumoral puisque son invalidation n'entraîne aucun défaut de croissance. De ce fait, notre étude place LAT1 comme cible majoritaire et encourage le développement de nouveaux inhibiteurs tels que le JPH203 afin d'améliorer l'arsenal thérapeutique anti-cancer.

Genetic disruption of the multifunctional CD98/LAT1 complex demonstrates the key role of essential amino acid transport in the control of mTORC1 and tumor growth

Yann Cormerais¹, Sandy Giuliano², Renaud LeFloch², Benoît Front¹, Jerome Durivault¹, Eric Tambutté³, Pierre-André Massard¹, Laura Rodriguez de la Ballina⁶, Hitoshi Endou⁴, Michael F. Wempe⁵, Manuel Palacin⁶, Scott K. Parks¹, and Jacques Pouyssegur^{1,2}

¹*Medical Biology department, Centre Scientifique de Monaco (CSM), Monaco*

²*Institute for Research on Cancer & Aging (IRCAN), CNRS, INSERM, Centre A. Lacassagne, University of Nice-Sophia Antipolis, Nice, France*

³*Marine Biology department, Centre Scientifique de Monaco (CSM), Monaco*

⁴*Research & Development, Fuji Biomedix Co. Ltd.*

⁵*School of Pharmacy, University of Colorado Denver, Anschutz Medical Campus, Aurora, CO 80045, USA.*

⁶*Institute for Research in Biomedicine, University of Barcelona and CIBERER, Barcelona, Spain*

Corresponding author:

Jacques Pouyssegur, jpouyssegur@centrescientifique.mc

Medical Biology department, Centre Scientifique de Monaco (CSM),

Keywords: Nutrient stress, Amino acids, LAT1, CD98, membrane transporter, mTORC1, pharmacology, proliferation, cancer,

Running Title: Genetic dissection of LAT1/CD98 complex and tumor growth

Financial support

This work was entirely supported by the government of Monaco including thesis (YC) master (PAM) and post-doctoral (SP) fellowships. This project has also been, in part, supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (JP, Equipe labellisée), IRCAN, University of Nice and Centre A. Lacassagne.

We declare no conflict of interest for the study presented herewith. Each co-author has provided to AACR the corresponding signed form of conflict of interest.

Abstract (250)

The CD98/LAT1 complex is overexpressed in aggressive human cancers and is thereby described as a potential therapeutic target. This complex promotes tumorigenesis with CD98 (4F2hc) engaging β -integrin signaling while LAT1 (SLC7A5) imports essential amino acids (EAA) and promotes mTORC1 activity. However, it is unclear as to which member of the heterodimer carries the most prevalent pro-tumoral action. To answer this question, we explored the tumoral potential of each member by gene disruption of CD98, LAT1 or both and by inhibition of LAT1 with the selective inhibitor (JPH203) in six human cancer cell lines from colon, lung and kidney. Each knockout respectively ablated 90% ($CD98^{KO}$) and 100% ($LAT1^{KO}$) of Na^+ -independent leucine transport activity. $LAT1^{KO}$ or JPH203-treated cells presented an amino acids stress response with ATF4, GCN2 activation, mTORC1 inhibition and severe *in vitro* and *in vivo* tumor growth arrest. We show that this severe growth phenotype is independent of the level of expression of CD98 in the six tumor cell lines. Surprisingly, $CD98^{KO}$ cells with only 10% EAA transport activity displayed a normal growth phenotype, with mTORC1 activity and tumor growth rate undistinguishable from wild type cells. However $CD98^{KO}$ cells became extremely sensitive to inhibition or genetic disruption of LAT1 ($CD98^{KO}, LAT1^{KO}$). This finding demonstrates that the tumoral potential of $CD98^{KO}$ cells is due to residual LAT1 transport activity. Therefore these findings clearly establish that LAT1 transport activity is the key growth-limiting step of the heterodimer and advocate the pharmacology development of LAT1 transporter inhibitors as a very promising anticancer target.

Introduction

Tumor cells face numerous stressors in their microenvironment and therefore have developed adaptive strategies to survive and grow. The limitation of essential nutrients is particularly acute in rapidly growing and hypoxic tumors. Interestingly, under conditions of limited oxygen perfusion, tumors cells induce, *via* hypoxia induced transcription factors (HIFs) and other adaptive mechanisms, increased expression of key nutrient transporters (1-4). An example of an overexpressed membrane nutrient transporter complex is the multifunctional heterodimer, CD98/LAT1 that controls import of essential amino acids (EAA).

CD98 is a single-transmembrane glycoprotein also known as the 4F2 antigen heavy chain (4F2hc). This protein binds to the cytoplasmic tail of β -integrin (5,6) and regulates migration, adhesion-induced intracellular signaling and anchorage independent survival (7-9). It has been reported that CD98 overexpression induces malignant transformation of NIH3T3 and BALB3T3 cells (10,11). Furthermore, CD98 knockout mouse embryonic stem cells display restricted teratocarcinoma formation (8). Moreover, a recent study has shown that CD98 regulates microenvironmental adaptation by amplifying cancer cells capacity to respond to extracellular matrix rigidity to facilitate their tumor growth in a mouse skin cancer model (12).

CD98 also interacts with LAT1 through a di-sulfide bond and acts as a chaperone by promoting LAT1 stabilization, trafficking and functional insertion into the plasma membrane (6,13). LAT1 is a 12-transmembrane spanning protein responsible for Na^+ -independent transport of large neutral EAA (Leu, Val, Ile, Phe, Trp, His, Met, Tyr). LAT1 is an obligatory exchanger with the uptake of one AA being coupled to the efflux of another AA (14,15). The elevated bioenergetic need of rapidly dividing cells creates an increased demand for AAs to satisfy biomass increase. This nutritional demand imposes a constant stress in tumors growing in hostile, acidic and low nourished microenvironments (16,17). Thus, high expression and activity of LAT1, regulated by HIF2 as reported in lung tissues and kidney cancers is implicated in the ability to sustain growth despite the challenges faced in the microenvironment (18). Numerous clinical studies have shown that the CD98/LAT1 complex is overexpressed and is a negative prognostic factor in different types of cancers including prostate (19), non-small cell lung cancer (20), gliomas (21) and renal cell carcinomas (18,22).

It is now well accepted that the CD98/LAT1 complex plays a key role in tumor growth and is therefore an attractive therapeutic target. However, in order to improve effective anticancer treatments, it is essential to clearly define which member plays the dominant pro-tumoral role in this complex. This notion is far from being clarified and remains controversial in the literature (2). Despite the fact that CD98 knockout cells have reduced AA transport, Ginsberg and colleagues reported that the pro-tumoral action in a teratocarcinoma model or growth promoting activities in T and B cells are mediated through integrins-CD98 signaling rather than the activity of LAT1 (8,9). Considering the obligatory nutrient needs in tumors and in particular EAA, this is a surprising conclusion that we decided to challenge and investigate further.

Here, we report AA stress, mTORC1 activity, EAA transport rates, proliferation and tumorigenicity in a colorectal and lung human adenocarcinoma cell lines (LS174T, A549) in which the corresponding genes for LAT1, CD98 have been disrupted by Zinc Finger Nucleases (ZFN) or knockdown by shRNA. Homozygous knockouts of each gene, *CD98^{KO}* and *LAT1^{KO}*, confirmed a clear interdependence of the two members of this complex. As anticipated, *LAT1^{KO}* cells display an *in vitro* and *in vivo* disruption of AA homeostasis leading to ATF4 induction, inhibition of mTORC1 and abolition of tumor growth. Full restoration of plasma membrane expression of CD98 failed to rescue growth of *LAT1^{KO}* cells demonstrating the independence of CD98 in the growth phenotype. Finally we confirmed and extended these results by specific inhibition of LAT1 with JPH203 (23,24) in six cell lines from colon, lung and renal cell carcinoma. Together these findings clearly establish that EAA transport, but not CD98, is a key limiting step in tumor growth and therefore fully validate LAT1 as a major anticancer target. Undoubtedly, besides JPH203 (23,24), enthusiasm for developing novel LAT1 (SLC7A5) inhibitors will emerge.

Materials & Methods

Cell culture

Human colon adenocarcinoma LS174T and HT29 cells were kindly provided by Dr. Van de Wetering, NL, The other cell lines from lung (A549, H1975) and renal cell carcinoma, (786-O, A498) were obtained from American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA. These cell lines have been authenticated by DNA profiling using 8 different and highly polymorphic short tandem repeat loci (DSMZ, Germany). The cells, currently checked for mycoplasma were grown in DMEM (Gibco) supplemented

with 7.5% FBS, penicillin (10 U/mL), and streptomycin (10 µg/mL). DMEM (0.3X) was obtained by mixing 2 volumes of DMEM lacking 5 EAA LEU, ILE, MET, PHE, TRP with 1 volume of regular DMEM. It is important to note that the final concentration of the EAA (except tryptophan) in DMEM (0.3X) still largely exceeds the physiological EAA levels of human plasma (Table S1).

ZFN-Mediated gene knockout of LAT1 and CD98

LS174T cells were transfected with Zing Fingers Nucleases (ZFN) designed by Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). Transfection of the ZFN (CSTZFN-1KT, CompoZr Custom ZFN) targeting LAT1 (exon 5) or CD98 (exon 4) was performed with JetPRIME (Polyplus). Transfected cells were grown for 7 days to express the mutated forms and then CD98 surface expression was analyzed using flow cytometry. Negative and low expressing cells were sorted and plated in clonal conditions (250 individualized cells in 100 mm dishes). Each clone was picked and analyzed for CD98 or LAT1 expression by immunoblot and negative clones were re-cloned and further analyzed by DNA sequencing (Table S2). Finally two independent clones for $LAT1^{KO}$, $CD98^{KO}$ and $LAT1^{KO}/CD98^{KO}$ double knockout were selected for this study.

Short Hairpin RNA (shRNA) mediated knockdown of CD98

We obtained pre-validated shRNA sequences targeting CD98 from Sigma (Sigma NM_002394,CCGGCTAGCTCATACCTGTCTGATTCTCGAGAATCAGACAGGTATGAGCTAGTTTTTG). Lentiviral particles (pLKO.1, Sigma) containing the shRNA were produced in HEK cells. Lentiviral infection of A549 cells was then performed and puromycin selection was utilized to obtain a total population of shRNA targeted cells. shControl (shCTRL) cells were created as a reference control (Adgend plasminid #1864, CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTCGAGCGAGGGCGACTTAACCTTAGG). shRNA efficacy was validated by comparison of shCD98 and shCTRL cells using QPCR and WB.

Immunoblotting

Cells were lysed in 1.5X Laemmli buffer and protein concentrations were determined using the Pierce BCA protein assay (23227 Thermo Scientific). Protein extracts (40µg) were separated by electrophoresis on 10% SDS polyacrylamide gel and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore). Membranes were

blocked in 5% non-fat milk in TN buffer (50 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl) and incubated with the following anti-human antibodies: rabbit LAT1 (1:1000, KE026 TransGenic Inc.), rabbit CD98 (1:1000, SC-9160 Santa-Cruz Biotechnology), rabbit xCT (1:1000, ab37185 Abcam), mouse GCN2 (1:250, sc-374609 Santa-Cruz Biotechnology), mouse phospho-GCN2 (1:500, ab75836 Abcam), rabbit EIF2 α (1:1000, ab5369 Abcam), mouse phospho-EIF2 α (1:1000, ab32157 abcam), rabbit ATF4 (1:1000, 11815S CST), rabbit p70-S6K (1:1000, 9202S CST), rabbit phospho-p70-S6K (1:1000, 9202S CST), rabbit RPS6 (1:1000, 2217S CST) and rabbit phospho-RPS6 (1:1000, 2215S CST). Detection of tubulin was used as a protein loading control (1:10000 MA5-16308 Thermo Scientific). Immunoreactive bands were detected with horseradish peroxidase (HRP) anti-mouse or anti-rabbit antibodies (Promega) using the ECL system (Merck Millipore WBKLS0500). Analysis and quantification of immunoblots were performed using LI-COR odyssey Imaging System.

Flow cytometry

Cells were trypsinized, washed and incubated for 30 min with mouse anti-human CD98 (1:100, KS129 TransGenic Inc.) diluted in FACS buffer (PBS/BSA 0.1%/EDTA 5 mM) on ice. Cells were then washed and incubated for 30 min with anti-mouse PE-conjugated secondary antibody on ice. Cells were washed, re-suspended in 500 μ l of FACS buffer, filtered (40 μ m) and analyzed using a fluorescence-activated cell sorter (BD healthcare FACS CALIBUR, analyzer, San Jose, CA, USA).

Immunofluorescence and confocal analysis

Cells were seeded (1×10^5 cells) on Cel-Line Diagnostic Microscope Slides (30-256H-BLACK-CE24 Thermo Scientific). After 24h, cells were washed and fixed at room temperature for 20 min with 3% paraformaldehyde. Cells were permeabilized with PBS (Euromedex, ET330-A) containing 0.2% Triton X-100 (T8532 Sigma) for 2 min before being exposed to rabbit anti-human LAT1 (1:1000, KE026 TransGenic Inc.) and mouse anti-human CD98 (1:1000, KS129 TransGenic Inc.) for 1 h at room temperature. Cells were washed 3 times with PBS, and then incubated for 1 h at room temperature with 1:1000 dilution anti mouse FluoProbe 488-labeled (FP-SA4110-T Interchim) and anti rabbit FluoProbe 594-labeled (FP-SD5110-T Interchim)

and mounted using ProLong Gold antifade reagent (P36934 Life technologies). Images were captured on an SP5 confocal microscope (Leica) and analyzed using Leica LS AF software and ImageJ.

L-[¹⁴C]-Leucine Uptake

Cells (2.5×10^5) were seeded onto 35 mm dishes, in triplicates per cell line. Cells were used for uptake experiments 24 h after seeding. Culture media was removed and cells were carefully washed with pre-warmed Na^+ -free HBSS (Hank's balanced salt solution: 125 mM choline chloride, 4.8 mM KCl, 1.2 mM MgSO_4 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.3mM CaCl_2 , 5.6 mM glucose, 25 mM HEPES), pre-incubated in 1.0 ml of pre-warmed Na^+ free HBSS at 37°C for 5min before adding substrates for the uptake experiment. Cells were then incubated at 37°C for 1 min in 750 μl of Na^+ free HBSS containing 1.0 μM of L-[¹⁴C]-Leucine (0.03 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Subsequently, cells were washed three times with ice-cold Na^+ -free HBSS containing 1.0 mM of non-radiolabeled Leucine. Cells were then lysed with 50 μl of 0.1N NaOH and mixed with 3.5 ml of Emulsifier safe cocktail (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Radioactivity was measured using a β -scintillation counter. For the inhibition experiments, the uptake of 1.0 μM L-[¹⁴C]-Leucine is examined in the presence of BCH (1.0 mM).

Proliferation assay

The different cell lines (2.5×10^4 cells for 3 days, 5×10^4 cells for 7 days) were seeded onto 6-well plates in triplicate per cell line and per condition. We measured proliferation by trypsinizing the cells and counting them daily with a Coulter Z1 (Beckman) during 3 or 7 days. The cell proliferation index was calculated as 'fold increase' by standardizing each measurement to the cell number obtained 24 h after seeding (Day 0).

3-dimensional growth assay

LS174T 3D cultures were prepared using the liquid overlay method. Briefly, 24-well culture plates were coated with 1.5% agarose prepared in sterile water. Cells (10,000) from a single-cell suspension were added per well. The plates were gently swirled and incubated at 37°C in 5% CO_2 atmosphere until cells were organized into three-dimension. Media was changed once every 3 days. After 9 days, 3D-culture

images were taken using an EVOS Cell Imaging Systems (Life Technologies) and the 3D-culture surface area was measured using imageJ.

Clonogenicity assay

LS174T-derived mutants (1000 cells) were plated in 60-mm dishes and incubated at 37°C, 5% CO₂. 24h after cell adherence, the media was replaced with regular 1X or 0.3X DMEM (Table S1) supplemented with 7.5% serum and containing JPH203 for LAT1 inhibition experiment. Media was changed once every three days. Dishes were stained with 5% Giemsa (Fluka) for 30-45 min to visualize colonies.

LAT1 inhibitor dose response assay

The different cell lines (5×10^4 cells) were seeded onto 6-well plates in triplicate for each cell line and JPH203 concentrations indicated. We measured proliferation as described above after 3 days. Cell number-fold increases were calculated as described above.

Tumor xenograft studies

The different LS174T stable cell lines (1×10^6 cells) suspended in 300 μ l of serum-free DMEM supplemented with insulin–transferrin–selenium (Life Technologies) were injected subcutaneously into the back of 8-week-old female athymic mice (Janvier). Tumor dimensions were measured twice a week using calipers and the tumor volume was determined by using the formula: $(4\pi/3) \times L/2 \times W/2 \times H/2$, (L, length; W, width; and H, height). When the tumor volume reached 1000 mm³, mice were euthanized and the tumors were excised. For protein analysis, tumors were lysed directly after harvesting. Tumors were incubated in cell extraction buffer (FNN0011 Thermo Scientific) supplemented with Halt protease inhibitor cocktail (78429 Thermo Scientific) and lysed using a Precellys homogenizer. Animal housing was done in compliance to the EU directive 2010/63/EU. Briefly, each cage contained 5 mice with an enriched environment. Food and water were given *ad libitum* and the litter was changed on a weekly basis. Animal care met the EU directive 2010/63/EU ethical criteria. The animal experimentation protocol was approved by the local animal care committee (Veterinary service and direction of sanitary and social action of Monaco Dr H. Raps).

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SD. Each experiment was performed at least three times. Statistical analysis was done with the unpaired Student *t* test. Differences between groups were considered statistically significant when $P < 0.05$.

Results

CD98 and LAT1 expression, localization and activity are interdependent.

LAT1 or CD98 knockouts (KO) were created in the colon adenocarcinoma cell line LS174T using Zinc Finger Nucleases (ZFN). To avoid clonal effects, we always tested two independent clones of each disrupted gene. Lack of corresponding protein expression (Fig. 1A), genome analysis and sequencing around the ZFN-targeted site demonstrated that the mutations introduced (see supplementary data Table S2) disrupted the different alleles. *LAT1^{KO}* cells exhibit an 80% decrease in total CD98 protein expression (Fig. 1A, S1A) resulting in a 60% reduction of the functional plasma membrane expression (Fig. 1B). Furthermore, qPCR analysis revealed that the CD98 protein reduction in *LAT1^{KO}* cells is partially due to reduced mRNA expression (Fig. S1B). Similar independent results were obtained in inducible *LAT1* knock-down (KD) LS174T cells and *LAT1^{KO}* in the lung carcinoma A549 cell line (Fig. S1C, S1D). Therefore, despite the fact that CD98 can heterodimerize with other transporters (LAT2, γ^+ LAT1, γ^+ LAT2 and xCT), LAT1 represents the major expressed light chain in the two tumor cell lines LS174T and A549. In contrast, LAT1 total protein expression is reduced in *CD98^{KD}* and *CD98^{KO}* cells (Fig. S1A,C) and retained in the cytoplasm (Fig. 1C). This finding is in agreement with the notion that CD98 is required to control LAT1 trafficking and functional insertion in the plasma membrane.

We next investigated the impact of these gene knockouts on LAT1 activity by measuring the Na⁺-independent rate of leucine transport. Ablation of LAT1 fully abolished the leucine uptake confirming that LAT1 is the only functional Large neutral AA Transporter expressed in LS174T (Fig. 1D). *CD98^{KO}* cells also show a 90% reduction in Na⁺-independent leucine transport (Fig. 1D). However, the residual 10% transport activity detected in *CD98^{KO}* cells is significant and sensitive to the LATs inhibitor BCH (Fig. 1D) and JPH203 (see later).

LAT1 ablation disrupts amino acid homeostasis and abolishes proliferation while CD98 knockout does not.

Since LAT1 transport activity is severely decreased in both CD98 and LAT1 knockouts we analyzed their effects on the two AA sensing pathways: GCN2 and mTORC1 (reviewed in (25)). In a nutrient-rich media (1X DMEM) *LAT1^{KO}* cells display an induction of the AA stress response pathway GCN2 / EIF2a / ATF4, demonstrating an AA deficiency (Fig. 2A). In contrast, minor changes in the mTORC1 pathway were observed through the phosphorylation of p70-S6K and RPS6 as only the phosphorylation of p70-S6K decreased while its target S6RP remained unchanged (Fig. 2A). We then challenged these cells with a media where the concentrations of LAT1 substrates are closer to physiological levels (0.3X DMEM) (Table S1). In this condition, while the wild type LS174T cells (WT) do not present any modification in mTORC1 and GCN2 pathways, *LAT1^{KO}* cells display strong modifications in both pathways (Fig. 2A). Quantification of GCN2 activity using the ATF4 expression shows that this pathway is increased by 10-fold compared to the wild type cells (Fig. 2B). In parallel, mTORC1 activity measured by the phosphorylation level of RPS6 decreased by 50% (Fig. 2C). Similar results were observed with the second cell line (A549) disrupted for LAT1 (Fig.S2A). In contrast, although *CD98^{KO}* cells have a strongly reduced LAT1 activity (90%), no change in the GCN2 and mTORC1 pathways are detectable in both 1X and 0.3X DMEM (Fig. 2A,B). Similar results were obtained for the GCN2 pathway with a 90% knockdown of CD98 in A549 cells (Fig. S3A,B).

mTORC1 (26,27) and more recently GCN2 (28) have been demonstrated to control cell proliferation. We therefore investigated the effect of either LAT1 or CD98 knockout on *in vitro* LS174T proliferation (Fig. 3A). In 1X DMEM, LAT1 ablation decreased LS174T proliferation by 60% (Fig. 3A,B left) and a decreased nutrient challenge with 0.3X EAA-derived DMEM dramatically reduced their proliferation by more than 90% (Fig. 3A,B right). Consistent with our results for mTORC1 and GCN2 activity, LS174T-*CD98^{KO}* and A549-*CD98^{KD}* cells are able to maintain their proliferation at the same level as WT cells (Fig. 3A,B and Fig. S3C). Furthermore, we confirmed that this *LAT1^{KO}* specific anti-proliferative effect (70% reduction) was observed in 3-dimensions (3D) culture assays (Fig. 3C). Interestingly, whereas CD98 has been described to be important for anchorage-independent survival and growth (7), 3D cultures show that only *CD98^{KO}* cells are able to grow like WT cells (Fig. 3C bottom).

These findings demonstrate an essential role of LAT1 for maintenance of

tumor cell AA homeostasis and proliferation. We confirmed these results by either invalidating (Fig. S2A-C) or inhibiting LAT1 with the specific inhibitor JPH203 (Fig. S4A,B) (23,24) in six different cell lines from colon (LS174T, HT29), lung (A549, H1975) and renal cell carcinoma (786-O and A498).

Residual LAT1 activity in CD98^{KO} cells ensures proliferation.

We then focused on the surprising growth phenotype of *CD98^{KO}* cells. In particular we wanted to understand how cells that have lost 90% of the LAT1 EAA transport activity (Fig. 1D) and should have also reduced activities from additional transporters like xCT (29) are able to proliferate in 0.3X media at the same rate as WT cells. First, we tested the possibility that CD98 disruption could have induced another transporter capable to compensate for the lack of EAA transport by LAT1. A good candidate was SLC6A14, which transports all neutral AA (30). However, this transporter was only detectable at very low levels by RT-qPCR and western blotting while its expression was not increased in *CD98^{KO}* cells. In addition we were not able to detect a Na⁺-dependent leucine transport activity (data not shown).

We then investigated the impact on proliferation of the residual LAT1 activity present in *CD98^{KO}* cells using JPH203. Growth dose-response demonstrated an extreme sensitivity of *CD98^{KO}* cells to JPH203 with an IC₅₀ of 1.0 μM while the IC₅₀ for WT cells was 35-fold higher (Fig. 4A). Furthermore, 5.0 μM of JPH203 completely abolished the growth of *CD98^{KO}* cells (Fig. 4A,B) indicating that *CD98^{KO}* cell growth is critically dependent on the LAT1 residual activity. These findings were confirmed in A549-*CD98^{KD}* cells where 30 μM of JPH203 abolishes growth while WT cells continue to grow (Fig. S3D). We independently confirmed this finding by generating double knockout (dKO) LS174T cells: *CD98^{KO}, LAT1^{KO}* (Fig. 4C, lane dKO). dKO cells present the same stress response as the *LAT1^{KO}* cells: The GCN2/EIF2a/ATF4 pathway is induced while the mTORC1 activity is strongly decreased (Fig. 4C) and *in vitro* proliferation is also strongly inhibited (Fig. 4D). Interestingly, down-regulation of mTORC1 is stronger in dKO cells than in *LAT1^{KO}* cells (Fig. 4C). This result can be easily explained by the fact that CD98 is able to heterodimerize with other transporters. Therefore double *CD98^{KO}, LAT1^{KO}* likely abolish, besides EAA transport, additional AA transporter like xCT explaining this deeper effect on the mTORC1 activity. Combined, these data demonstrate that maintenance of *CD98^{KO and KD}* cell proliferation is not due to an adaptation resulting from CD98 invalidation but to a

residual LAT1 transport activity.

Reduced CD98 expression in LAT1^{KO} cells has a minor impact on proliferation.

To investigate the impact of reduced CD98 expression in *LAT1^{KO}* cells we designed an experiment that fully restore endogenous CD98 expression at the cell surface in *LAT1^{KO}* cells while maintaining the lack of EAA transport. For this, we transfected xCT cDNA in *LAT1^{KO}* cells. Like LAT1, xCT is a light chain of CD98 but has a completely different function. While LAT1 is important for EAA transport, xCT transports cystine, an essential precursor of glutathione synthesis to counteract oxidative stress (31,32). As expected, expression of xCT or of LAT1 as a control restored the plasma membrane expression of CD98 in *LAT1^{KO}* cells (Fig. 5A). However, only LAT1 re-expression was able to restore leucine transport activity (Fig. 5B). This restoration of AA transport activity in LAT1 rescue cells re-established AA homeostasis. Indeed, the mTORC1 activity was completely recovered while no induction of the GCN2 pathway was detectable (Fig. 5C). In *LAT1^{KO}* cells transfected with xCT (*LAT1^{KO}* xCT), the GCN2 pathway was still activated but surprisingly the induction of ATF4 was reduced by the xCT overexpression (Fig. 5C). The mTORC1 activity was also recovered in *LAT1^{KO}* xCT cells (Fig. 5C). With regards to the proliferation phenotype, as expected LAT1 rescue completely restores the growth of LS174T cells while xCT overexpression has only a minimal effect on proliferation that could reflect the increased expression of xCT (Fig. 5C,D). We confirmed these findings in the lung carcinoma A549 cell line. Transient transfection of LAT1 in A549 *LAT1^{KO}* cells rescued cell proliferation while xCT had no effect (Fig. S5). These results demonstrate that CD98 down-regulation in *LAT1^{KO}* is not implicated in the severe growth phenotype of *LAT1^{KO}* and again highlight the key role EAA transport in cell growth. In addition, the complete growth phenotype rescue by LAT1 re-expression in LS174T- and A549-*LAT1^{KO}* illustrates that the phenotypes described were not due to ZFN-mediated off-target effects.

Furthermore, pharmacological inhibition of LAT1 in six independent cancer cell lines (colon (LS174T, HT29), lung (A549, H1975) and kidney carcinomas (786-O, A498)) did not decrease CD98 expression (Fig. S4A) while it mimicked the *LAT1^{KO}* growth phenotype. Indeed, JPH203 treatment increased the GCN2 pathway, reduced mTORC1 activity (Fig. S4A) and inhibited proliferation (Fig. S4B) in all of the cell lines tested. These finding further confirmed that the decreased expression of CD98

in *LAT1^{KO}* cells has no impact on their AA stress response and growth phenotype. Combined, these results demonstrate that LAT1 carries the dominant pro-tumoral role in comparison with CD98 across multiple cancer types.

LAT1 is essential for mTORC1 activity and tumor growth in vivo.

Finally, we wanted to validate our results demonstrating a strong impact of LAT1 removal on cancer cell proliferation using an *in vivo xenograft* model. LS174T-derived cells were injected subcutaneously into *nude* mice and tumor growth was monitored (Fig. 6A). Consistent with our *in vitro* results, WT and *CD98^{KO}* tumors grow at the same rate while *LAT1* invalidation decreased tumor growth by 91% at day 20 (Fig. 6A). Following tumor growth experiments, protein analysis was performed in 3 independent tumors of each LS174T-derived cell line (Fig. 6B). Interestingly, CD98 expression is even more reduced in *LAT1^{KO}* tumors (93%) compared to *in vitro* cultures and LAT1 expression as well is more dramatically decreased in *CD98^{KO}* tumor (91%) (Fig. 6B,C). Furthermore, as *in vitro*, AA sensing pathways are altered specifically in *LAT1^{KO}* tumors: ATF4 is induced while mTORC1 activity is decreased by more than 70% (Fig. 6B,C). Finally genetic disruption of residual LAT1 activity in *CD98^{KO}* cells (*dKO*) disrupts mTORC1 activity and fully ablates the tumorigenic potential of LS174T cells (Fig. S6A,B,C). These results demonstrate the key role of LAT1 for maintenance of tumor growth by sustaining tumor AA homeostasis and mTORC1 activity.

Discussion

Growth factor signals transduced through the ERK/PI3K/Akt/mTORC1 pathway, upregulate nutrient transporters (33). However these transporters have kept the ability developed in bacteria to be upregulated in response to nutrient depletion and, in addition some transporters are transcriptionally induced by HIFs in the nutrient deprived tumor microenvironment (2,3). Among the many AA transporters identified in human physiology (34,35) at least 3 AA transporter systems have emerged as playing a major role in the control of growth and cancer aggressiveness if we consider their increased level of expression and correlation with poor disease prognosis. These are the bidirectional EAA transporter complex CD98/LAT1 (SLC5A7) induced by HIF2 (18) and apparently functionally 'coupled' to the high affinity glutamine transporter ASCT2 (SLC1A5) (36) and the cystine transporter

complex CD98/xCT (SLC7A11) essential for glutathione synthesis and resistance to chemotherapeutic agents (32).

LAT1-transporter is critical for mTORC1 activity and tumor growth

In this report, investigating the multi-functional CD98/LAT1 transporter complex in the context of AA stress response, proliferation and tumor growth, we first showed that *LAT1^{KO}* cells are capable to grow (50% reduction compared to WT) in the 'super rich' nutrient culture media (DMEM). However restoring an EAA concentration closer (but still above) to physiological values in the culture media with the exception of tryptophan (Table S1) strongly induced an AA stress, restricted mTORC1 activity and arrested in vitro proliferation in the two human cancer cell lines tested (LS174T, A549) as well as tumor growth for LS174T. However this major growth defect associated to the single *LAT1^{KO}* might not seem surprising considering the concomitant 80% decrease in total CD98 protein and 60-65 % reduction at the cell surface (Fig. 1). We therefore could have concluded that this drastic phenotype resulted from abrogation of the dual EAA transport activity of LAT1 and of β -integrin-signalling. In fact several arguments led us to fully reject this interpretation.

First, the single CD98-KO in LS174T cells also led to a concomitant severe reduction of LAT1 transport activity (10% residual) with, surprisingly, no detectable growth phenotype. Inhibition of the residual LAT1 activity of CD98-KO elicited AA stress and cell growth illuminating LAT1 as the key pro-tumoral element of the membrane heterodimer. However this was a surprising result considering that CD98 (4F2hc) acts as a chaperone for multiple AA transporters, including xCT. The hypothesis that these cells might have acquired another AA transporter such as SLC6A14 that is capable to transport several AA including EAA (37) could not be validated in our cellular models (data not shown). In contrast, pharmacological inhibition of LAT1 (JPH203) or genetic invalidation of the residual 10% leucine transport activity (*CD98^{KO}, LAT1^{KO}*) was sufficient to induce an AA stress response and suppressed in vitro growth and tumorigenicity in *CD98^{KO}* cells.

Secondly, we fully restored CD98 expression in *LAT1^{KO}* cells. As CD98 requires a light chain as a co-chaperone to be expressed in the membrane, we ectopically expressed xCT in LS174T and A549 cells. Even under these conditions, which allow full surface re-expression of CD98 in *LAT1^{KO}* cells, we could not rescue the growth defect phenotype of *LAT1^{KO}* cells. The LS174T *LAT1^{KO} CD98^{high} (xCT)* cells display

only a slightly attenuated AA stress response that might result from the overexpression of the xCT transporter responsible for anti-oxidant production.

Thirdly, the pharmacological targeting of LAT1 with JPH203 allowed us to explore six human cancer cell lines expressing different levels of LAT1 (Fig. S4A). As expected JPH203 did not reduce CD98 expression with the expression being even slightly increased in all cell lines following the concomitant increased expression of LAT1. Interestingly however, targeting LAT1 alone with JPH203 drastically reduced cell proliferation associated with all detected markers of AA stress including members of the GCN2 and mTORC1 pathways in all six cell lines (Fig. S4A,B). This finding fully confirmed and extended the genetic disruption of LAT1.

LAT1: a dual cytosolic/lysosomal leucine transporter?

Although not yet fully resolved, the field of mTORC1 activation by AA has rapidly progressed. Three variations of leucine-sensing mechanisms regulating mTORC1 activity were uncovered. Han et al. demonstrated that a cytoplasmic detection of leucine occurs by the tRNA charging enzyme Leucyl-tRNA Synthetase, which translocates to the lysosome and promotes mTORC1 activity (38). Sabatini's group provided evidence that sestrin2 is responsible for cytoplasmic leucine-sensing and mTORC1 activation (39). Finally, recent work by Rotin's group suggested a novel mechanism based on leucine lysosomal-sensing (40). This last mechanism is particularly appealing in the context of this study since LAT1 might be the first AA transporter to have two distinct chaperones, CD98 for plasma membrane and LAPT4b for LAT1 lysosomal membrane expression (40). This finding of dual LAT1 expression could explain the extreme mTORC1 inhibition and growth defects of *LAT1^{KO}* cells, contrasting with the non-affected *CD98^{KO}* cells. Intriguingly we observed increased mTORC1 activity in A549 *CD98^{KD}* cells (Fig. S3B), which agrees with a recent study on ES-derived fibroblasts *CD98^{KO}* cells (41). We propose that by suppression of CD98 the LAT1 expression ratio between lysosomal/plasma membranes may have increased and induced a stronger mTORC1 signal. However, even if mTORC1 is increased in certain cell lines when CD98 is knocked out or knocked down, these results demonstrate that AA homeostasis is drastically disrupted in *LAT1^{KO}* cells, whereas it is still maintained in *CD98^{KO}* or *CD98^{KD}* cells.

Conclusion

Our study highlights the dominant pro-tumoral role of LAT1 in comparison with CD98.

Indeed, although the tumoral impacts of integrin signaling are well described (42,43), a loss of CD98 does not affect the integrin levels in the cell (Fig. S1F,G), whereas a loss of LAT1 affects the foundation of cell proliferation by preventing essential nutrient import and mTORC1 activation. This dependency leads to cancer cell reliance on LAT1 activity in order to sustain tumoral AA homeostasis, mTORC1 activation and tumor growth. Previous studies from our lab investigated the potential of disrupting different metabolism related proteins as therapeutic targets (44-47). Use of the aggressive LS174 xenograft model in these previous studies underlined the problem of the functional protein redundancy in terms of cancer treatment. Indeed, dramatic reductions in tumor growth were obtained only by combined targeting of two carbonic anhydrases (44) or two lactate transporter isoforms (47). Intriguingly, here we show that in the same aggressive LS174 xenograft model, ablation of LAT1 alone is sufficient to abolish tumor growth demonstrating an absence of redundancy for essential AA transport in certain tumors. Together these results highlight the essential pro-tumoral role of LAT1 and demonstrate that LAT1 is a promising individual target for future efforts in anticancer drug development.

Acknowledgments

The authors greatly acknowledge Ludovic Cervera and CytoMed, the IRCANs' Flow Cytometry Facility. The materials of CytoMed were supported by the Conseil Général 06, the FEDER, the Ministère de l'Enseignement Supérieur, the Région Provence Alpes-Côte d'Azur and the INSERM, France.

References

1. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 2006;441(7092):437-43.
2. McCracken AN, Edinger AL. Nutrient transporters: the Achilles' heel of anabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2013;24(4):200-8.
3. Parks SK, Cormerais Y, Marchiq I, Pouyssegur J. Hypoxia optimizes tumour growth by controlling nutrient import and acidic metabolite export. *Molecular aspects of medicine* 2016;In press.
4. Bhutia YD, Babu E, Ramachandran S, Ganapathy V. Amino Acid transporters in cancer and their relevance to "glutamine addiction": novel targets for the design of a new class of anticancer drugs. *Cancer Res* 2015;75(9):1782-8.
5. Zent R, Fenczik CA, Calderwood DA, Liu S, Dellos M, Ginsberg MH. Class- and splice variant-specific association of CD98 with integrin beta cytoplasmic domains. *J Biol Chem* 2000;275(7):5059-64.
6. Fenczik CA, Zent R, Dellos M, Calderwood DA, Satriano J, Kelly C, et al. Distinct domains of CD98hc regulate integrins and amino acid transport. *J Biol Chem* 2001;276(12):8746-52.
7. Rintoul RC, Buttery RC, Mackinnon AC, Wong WS, Mosher D, Haslett C, et al. Cross-linking CD98 promotes integrin-like signaling and anchorage-independent growth. *Mol Biol Cell* 2002;13(8):2841-52.
8. Feral CC, Nishiya N, Fenczik CA, Stuhlmann H, Slepak M, Ginsberg MH. CD98hc (SLC3A2) mediates integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(2):355-60.
9. Cantor JM, Ginsberg MH. CD98 at the crossroads of adaptive immunity and cancer. *J Cell Sci* 2012;125(Pt 6):1373-82.
10. Hara K, Kudoh H, Enomoto T, Hashimoto Y, Masuko T. Malignant transformation of NIH3T3 cells by overexpression of early lymphocyte activation antigen CD98. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;262(3):720-5.
11. Shishido T, Uno S, Kamohara M, Tsuneoka-Suzuki T, Hashimoto Y, Enomoto T, et al. Transformation of BALB3T3 cells caused by over-expression of rat CD98 heavy chain (HC) requires its association with light chain: mis-sense mutation in a cysteine residue of CD98HC eliminates its transforming activity. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2000;87(3):311-6.
12. Estrach S, Lee SA, Boulter E, Pisano S, Errante A, Tissot FS, et al. CD98hc (SLC3A2) loss protects against ras-driven tumorigenesis by modulating integrin-mediated mechanotransduction. *Cancer Res* 2014;74(23):6878-89.
13. Nakamura E, Sato M, Yang H, Miyagawa F, Harasaki M, Tomita K, et al. 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J Biol Chem* 1999;274(5):3009-16.
14. Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim DK, Segawa H, Nii T, et al. Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* 2001;1514(2):291-302.
15. Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E, Endou H. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem* 1998;273(37):23629-32.
16. Marchiq I, Pouyssegur J. Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H symporters. *Journal of molecular medicine* 2015.

17. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 1989;49(23):6449-65.
18. Elorza A, Soro-Arnaiz I, Melendez-Rodriguez F, Rodriguez-Vaello V, Marsboom G, de Carcer G, et al. HIF2alpha acts as an mTORC1 activator through the amino acid carrier SLC7A5. *Mol Cell* 2012;48(5):681-91.
19. Sakata T, Ferdous G, Tsuruta T, Satoh T, Baba S, Muto T, et al. L-type amino-acid transporter 1 as a novel biomarker for high-grade malignancy in prostate cancer. *Pathol Int* 2009;59(1):7-18.
20. Kaira K, Oriuchi N, Imai H, Shimizu K, Yanagitani N, Sunaga N, et al. Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 expression in resectable stage I-III nonsmall cell lung cancer. *Br J Cancer* 2008;98(4):742-8.
21. Haining Z, Kawai N, Miyake K, Okada M, Okubo S, Zhang X, et al. Relation of LAT1/4F2hc expression with pathological grade, proliferation and angiogenesis in human gliomas. *BMC Clin Pathol* 2012;12:4.
22. Betsunoh H, Fukuda T, Anzai N, Nishihara D, Mizuno T, Yuki H, et al. Increased expression of system large amino acid transporter (LAT)-1 mRNA is associated with invasive potential and unfavorable prognosis of human clear cell renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 2013;13:509.
23. Wempe MF, Rice PJ, Lightner JW, Jutabha P, Hayashi M, Anzai N, et al. Metabolism and pharmacokinetic studies of JPH203, an L-amino acid transporter 1 (LAT1) selective compound. *Drug metabolism and pharmacokinetics* 2012;27(1):155-61.
24. Oda K, Hosoda N, Endo H, Saito K, Tsujihara K, Yamamura M, et al. L-type amino acid transporter 1 inhibitors inhibit tumor cell growth. *Cancer Sci* 2010;101(1):173-9.
25. Efeyan A, Comb WC, Sabatini DM. Nutrient-sensing mechanisms and pathways. *Nature* 2015;517(7534):302-10.
26. Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, et al. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 1994;369(6483):756-8.
27. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer cell* 2007;12(1):9-22.
28. Ye J, Kumanova M, Hart LS, Sloane K, Zhang H, De Panis DN, et al. The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *The EMBO journal* 2010;29(12):2082-96.
29. Fotiadis D, Kanai Y, Palacin M. The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Molecular aspects of medicine* 2013;34(2-3):139-58.
30. Karunakaran S, Ramachandran S, Coothankandaswamy V, Elangovan S, Babu E, Periyasamy-Thandavan S, et al. SLC6A14 (ATB0,+) protein, a highly concentrative and broad specific amino acid transporter, is a novel and effective drug target for treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *J Biol Chem* 2011;286(36):31830-8.
31. Ganapathy V, Thangaraju M, Prasad PD. Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond. *Pharmacology & therapeutics* 2009;121(1):29-40.
32. Lo M, Wang YZ, Gout PW. The x(c)- cystine/glutamate antiporter: a potential target for therapy of cancer and other diseases. *Journal of cellular physiology* 2008;215(3):593-602.
33. Edinger AL. Controlling cell growth and survival through regulated nutrient transporter expression. *The Biochemical journal* 2007;406(1):1-12.

34. Broer S, Palacin M. The role of amino acid transporters in inherited and acquired diseases. *The Biochemical journal* 2011;436(2):193-211.
35. Makrides V, Camargo SM, Verrey F. Transport of amino acids in the kidney. *Comprehensive Physiology* 2014;4(1):367-403.
36. Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* 2009;136(3):521-34.
37. Babu E, Bhutia YD, Ramachandran S, Gnanaprakasam JP, Prasad PD, Thangaraju M, et al. Deletion of the amino acid transporter Slc6a14 suppresses tumour growth in spontaneous mouse models of breast cancer. *The Biochemical journal* 2015;469(1):17-23.
38. Han JM, Jeong SJ, Park MC, Kim G, Kwon NH, Kim HK, et al. Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. *Cell* 2012;149(2):410-24.
39. Wolfson RL, Chantranupong L, Saxton RA, Shen K, Scaria SM, Cantor JR, et al. Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway. *Science* 2015.
40. Milkereit R, Persaud A, Vanoaica L, Guetg A, Verrey F, Rotin D. LAPT4b recruits the LAT1-4F2hc Leu transporter to lysosomes and promotes mTORC1 activation. *Nat Commun* 2015;6:7250.
41. de la Ballina LR, Cano-Crespo S, Gonzalez-Munoz E, Bial S, Estrach S, Cailleteau L, et al. Amino Acid Transport Associated to Cluster of Differentiation 98 Heavy Chain (CD98hc) is at the Crossroad of Oxidative Stress and Amino Acid Availability. *J Biol Chem* 2016.
42. Sun CC, Qu XJ, Gao ZH. Integrins: players in cancer progression and targets in cancer therapy. *Anti-cancer drugs* 2014;25(10):1107-21.
43. Seguin L, Desgrosellier JS, Weis SM, Cheresch DA. Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends in cell biology* 2015;25(4):234-40.
44. Chiche J, Ilc K, Laferriere J, Trottier E, Dayan F, Mazure NM, et al. Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res* 2009;69(1):358-68.
45. Doyen J, Parks SK, Marcie S, Pouyssegur J, Chiche J. Knock-down of hypoxia-induced carbonic anhydrases IX and XII radiosensitizes tumor cells by increasing intracellular acidosis. *Frontiers in oncology* 2012;2:199.
46. Le Floch R, Chiche J, Marchiq I, Naiken T, Ilc K, Murray CM, et al. CD147 subunit of lactate/H⁺ symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(40):16663-8.
47. Marchiq I, Le Floch R, Roux D, Simon MP, Pouyssegur J. Genetic disruption of lactate/H⁺ symporters (MCTs) and their subunit CD147/BASIGIN sensitizes glycolytic tumor cells to phenformin. *Cancer Res* 2015;75(1):171-80.

Figure legends

Figure 1: LAT1 and CD98 expression, localization and activity are interdependent.

A: The LAT1 and CD98 protein expression were analyzed by immunoblotting in LS174T WT, *LAT1^{KO}* and *CD98^{KO}* cells demonstrating an interdependence of protein expression for CD98. 2 independent clonal cell lines of LAT1 and CD98 knockout are shown (#1, #2). Tubulin was used as a loading control. B: Plasma membrane expression of CD98 was analyzed by flow cytometry in LS174T WT, *LAT1^{KO}* and *CD98^{KO}* cells. Relative membrane expression of CD98 is noted on each panel as a percentage (%) compared to WT cells. C: Immunofluorescence was performed on LS174T WT, *LAT1* and *CD98^{KO}* cells using LAT1 and CD98 antibodies to analyze protein localization using confocal microscopy. Note the cytoplasmic localization of LAT1 in CD98 knockout cells. Scale bars are indicated on each panel. D: LAT1 transport activity of LS174T WT, *LAT1^{KO}* and *CD98^{KO}* cells was measured by [¹⁴C]-Leucine uptake in Na⁺ free HBSS media containing 1μM Leucine with or without the LATs inhibitor BCH (10mM). These results represent the average of three independent experiments. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$; n.s: not significant

Figure 2: LAT1 knockout induces an amino acid stress response and decreases mTORC1 activity.

A: LS174T WT, *LAT1^{KO}* and *CD98^{KO}* cells were cultivated for 24h in either 1X or 0.3X DMEM (see methods for detailed composition). Changes in phosphorylation status and protein abundance of members of the two major amino acid sensing pathways GCN2 (p-GCN2/p-EIF2a/ATF4) and mTORC1 (p-p70-S6K and p-RPS6) were analyzed by Western blot. Tubulin was used as a loading control. Differential responses between cell lines are observed between culture media composition. B: Quantification of amino acid sensing pathways: GCN2 (ATF4/TUBULIN ratio, left) and mTORC1 (p-RPS6/RPS6 ratio, right) in LS174T WT, *LAT1^{KO}* and *CD98^{KO}* cells cultivated 24h in 0.3X DMEM. Quantifications represent the average of three independent experiments. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$; n.s: not significant.

Figure 3: LAT1 knockout dramatically reduces cell proliferation while CD98 ablation has no effect.

A: Cell proliferation of LS174T WT, *LAT1*^{KO} (2 independent cell lines) and *CD98*^{KO} (2 independent cell lines) cells. Cells were cultivated for 7 days in either 1X or 0.3X DMEM and media was replaced every 3 days. Proliferation rates are presented as fold increase (see methods for detailed description). B: Clonal growth of LS174T WT, *LAT1*^{KO} and *CD98*^{KO}. Cells were cultivated 15 days either in 1X or 0.3X DMEM and colored for visualization using Giemsa. Media was replaced every 3 days. C: 3-dimensional spheroid growth of LS174T WT, *LAT1*^{KO} and *CD98*^{KO} cells were produced following 9 days in suspension in 0.3X DMEM. Representative images are shown (Scale bars are indicated on each panel and represent 1mm) and quantification of spheroid size was performed to illustrate differences between cell types. Quantification data are combined from 10 different spheroids per cell type. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$; n.s: not significant.

Figure 4: Residual activity of LAT1 in *CD98*^{KO} cells maintains cell proliferation

A: Dose response analysis of the LAT1 specific inhibitor JPH203 in LS174T WT and *CD98*^{KO} cells. Cells were cultivated for 3 days in 0.3X DMEM containing different concentration of inhibitor and cell numbers were counted to determine proliferation rates. At 1-40 μM of JPH203 the proliferation of the two *CD98*^{KO} clones is significantly decreased compared to WT cells (indicated by ***). B: Clonal growth of WT, *LAT1*^{KO} and *CD98*^{KO} LS174T cells cultivated for 15 days in 0.3X DMEM and treated with DMSO or different concentrations of JPH203 (1.0 μM , 2.5 μM or 5.0 μM) with visualization achieved via Giemsa staining. C: LS174T WT, *LAT1*^{KO}, *CD98*^{KO} and *LAT1/CD98* double knockout (dKO) cells were cultivated for 24h in 0.3X DMEM for analysis of the amino acids sensing pathways GCN2 (p-GCN2/p-EIF2a/ATF4) and mTORC1(p-p70-S6K and p-RPS6) via immunoblotting. Tubulin was used as a loading control.

D: Cell proliferation rates of LS174T WT, *LAT1*^{KO}, *CD98*^{KO} and double knockout (dKO) cells. Cells were counted after 3 days of culture in 0.3X DMEM. For statistical analysis these data represent the average three independent experiments. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$; n.s: not significant.

Figure 5: Interactions between reduced CD98 expression and rescue in *LAT1*^{KO} cell proliferation.

A: Plasma membrane expression of CD98 was analyzed by flow cytometry in LS174T WT, *LAT1*^{KO} and *LAT1*^{KO} cells stably expressing either the xCT or LAT1 cDNA to observe rescue of CD98 expression. Relative membrane expression (%) is indicated for each cell type. B: LAT1 transport activity of LS174T WT, *LAT1*^{KO} and *LAT1*^{KO} cells stably expressing either the xCT or LAT1 was measured by [¹⁴C]-Leucine uptake in Na⁺ free HBSS media. C: LS174T WT, *LAT1*^{KO} and *LAT1*^{KO} cells stably expressing either xCT or LAT1 were cultivated for 24 h in 0.3X DMEM and the two Amino acids sensing pathways GCN2 (p-GCN2/p-EIF2a/ATF4) and mTORC1 (p-p70-S6K and p-RPS6) were analyzed by immunoblot. Tubulin was used as a loading control. D: Cell proliferation analysis of LS174T WT, *LAT1*^{KO} and *LAT1*^{KO} cells stably expressing either xCT or LAT1. Cells were counted after 3 days of culture in 0.3X DMEM. These results represent the average of three independent experiments. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$; n.s: not significant.

Figure 6: LAT1 is essential for tumor growth *in vivo*.

A: Tumor volumes of nude mice injected subcutaneously with LS174T WT, *LAT1*^{KO}, *CD98*^{KO} cells revealed dramatic inhibition of tumor growth with LAT1 knockout. B: Protein levels of LAT1, CD98 and the two amino acid sensing pathways GCN2 (ATF4) and mTORC1 (S6K and RPS6) were analyzed by immunoblotting in 3 independent tumors from each LS174T-derived cell line (WT, *LAT1*^{KO} and *CD98*^{KO}). Tubulin acted as a protein loading control. SE: Short exposition, LE: Long exposition C: Quantification of LAT1, CD98 expression and mTORC1 activity (p-RPS6/RPS6 ratio, right) in tumors from each LS174T-derived cell line (WT, *LAT1*^{KO} and *CD98*^{KO}). * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$; n.s: not significant.

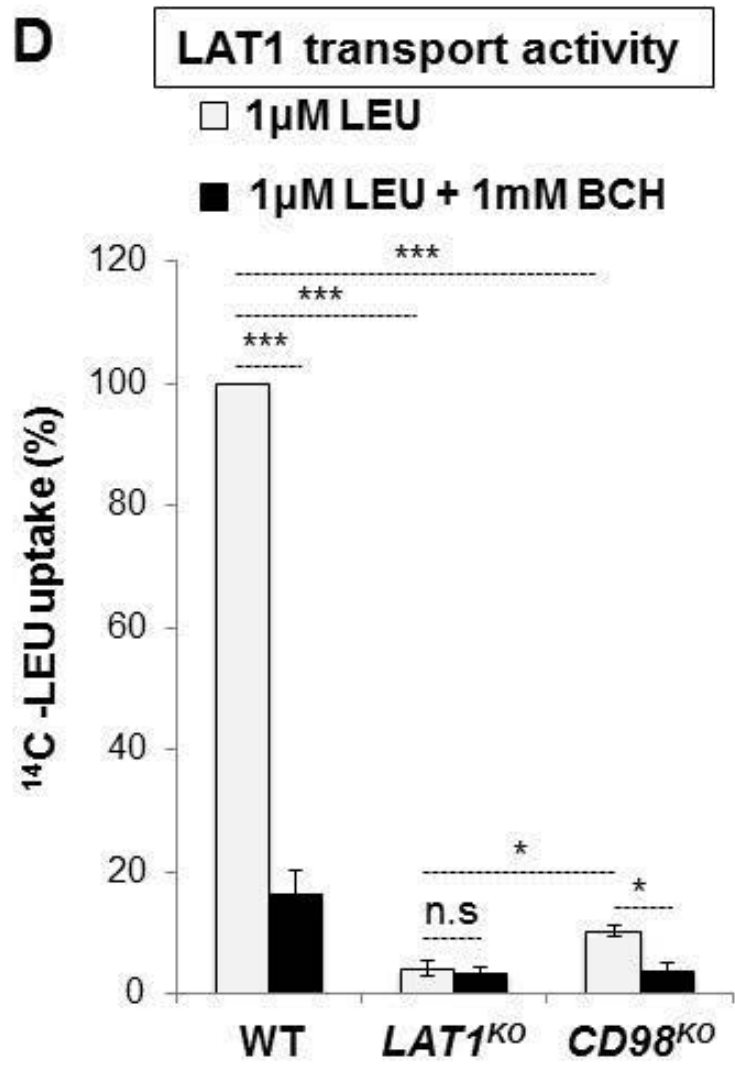
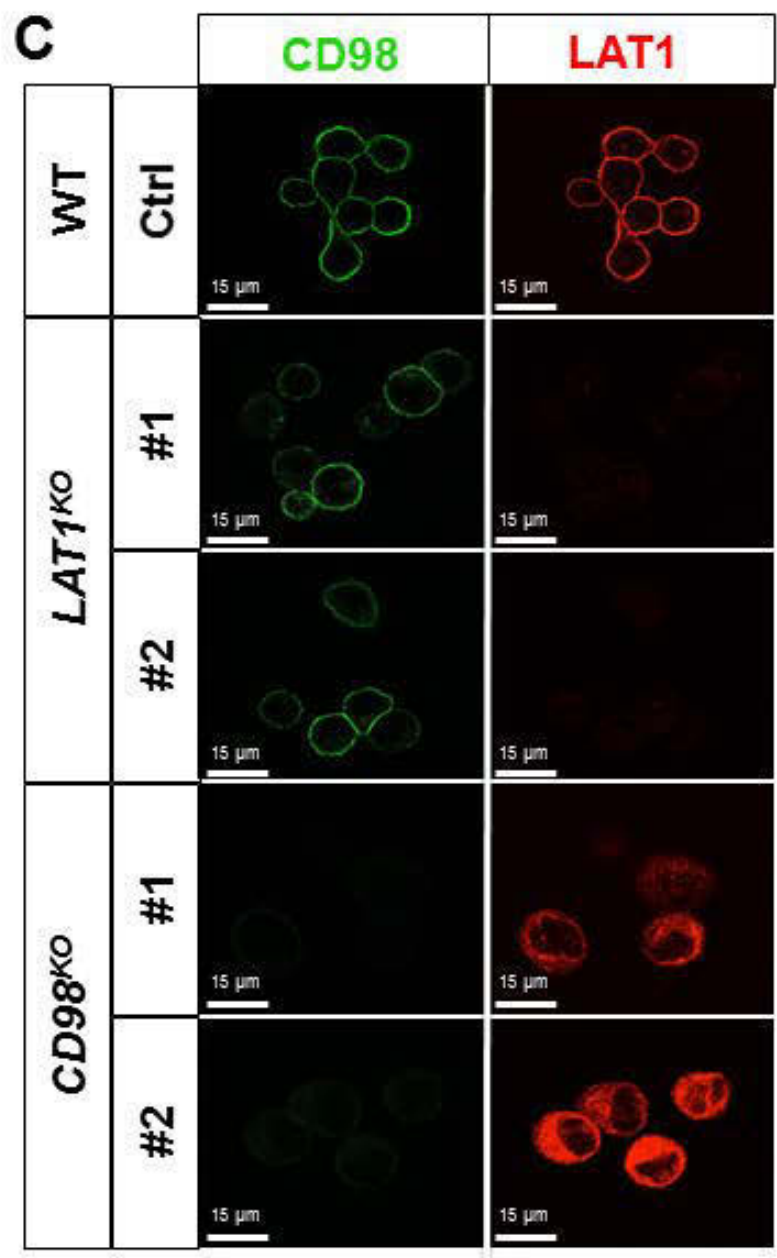
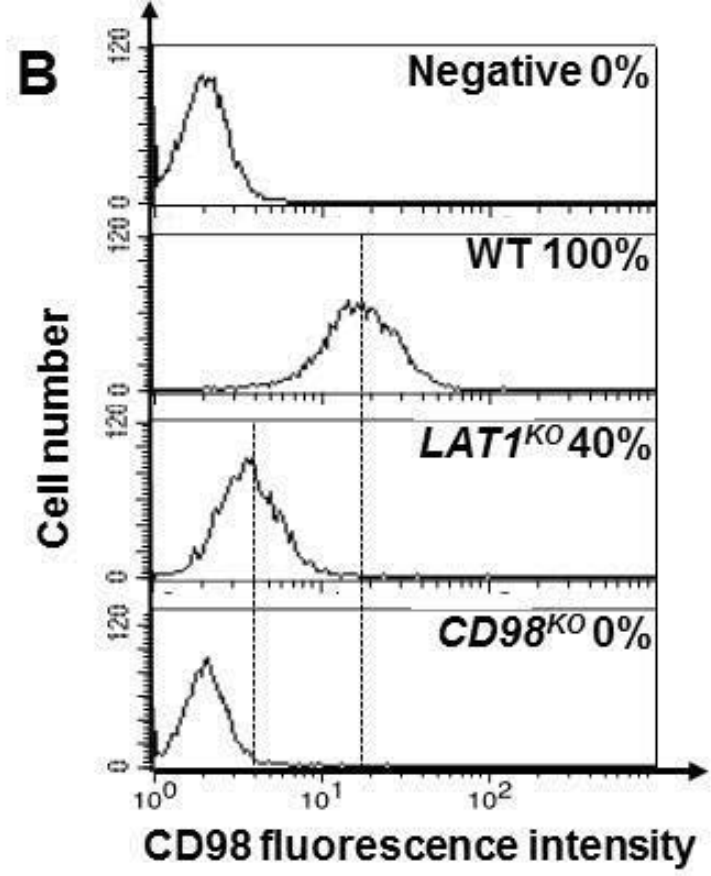
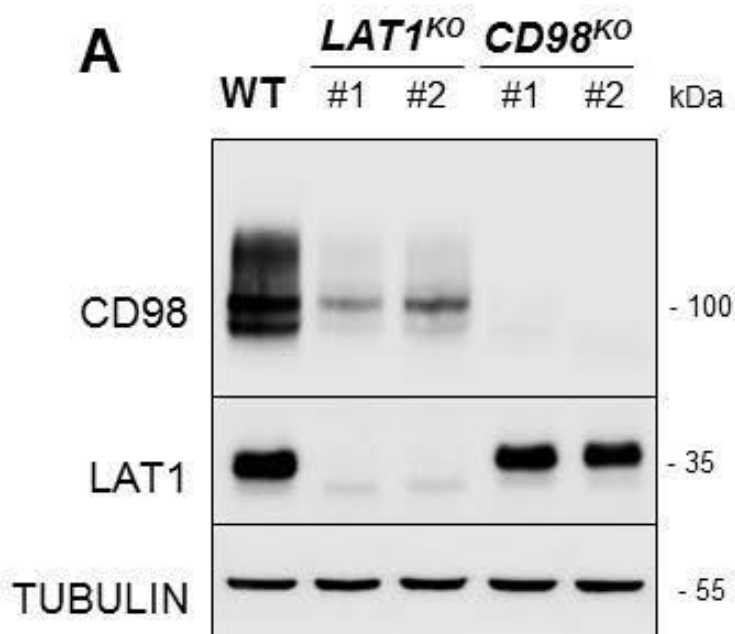


Figure 1 Cormerais et al.

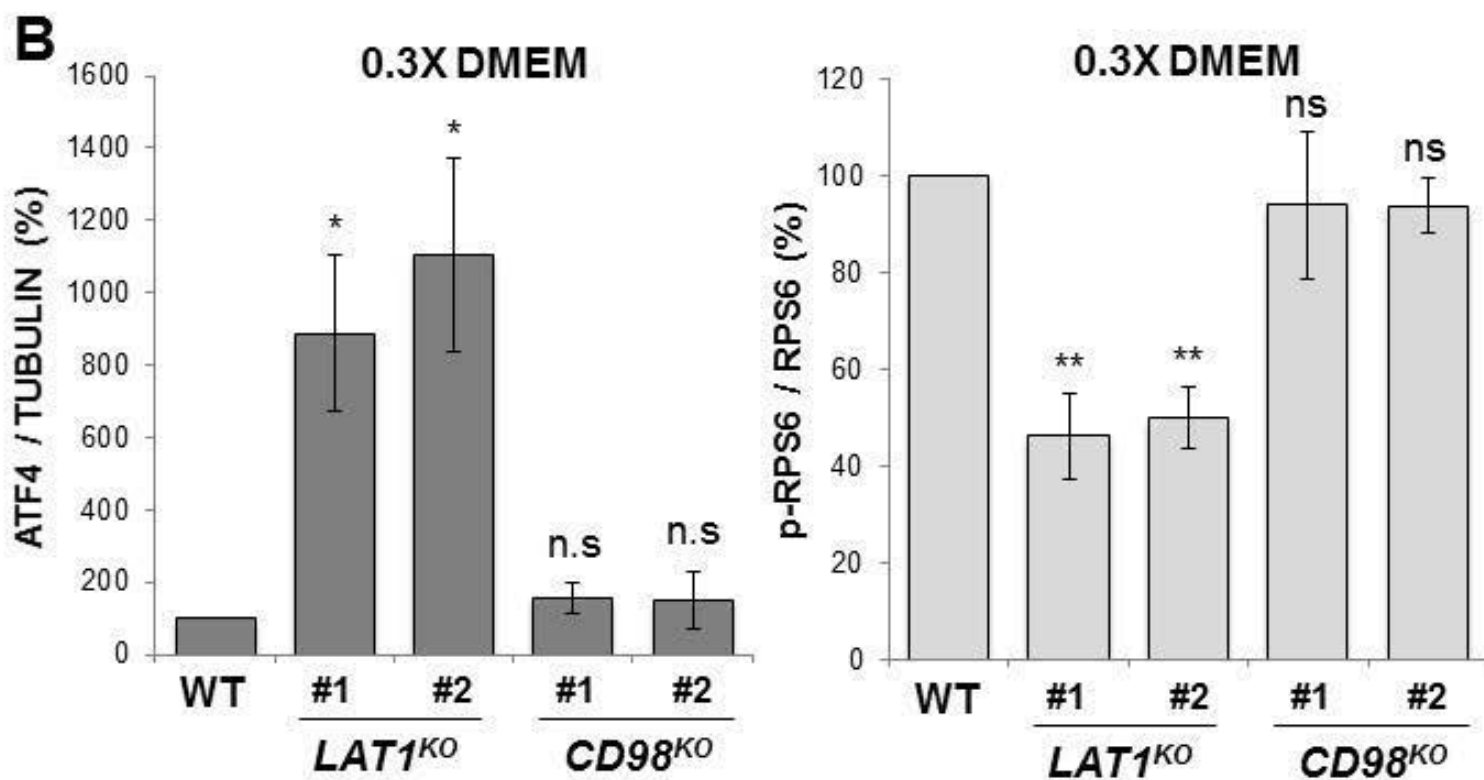
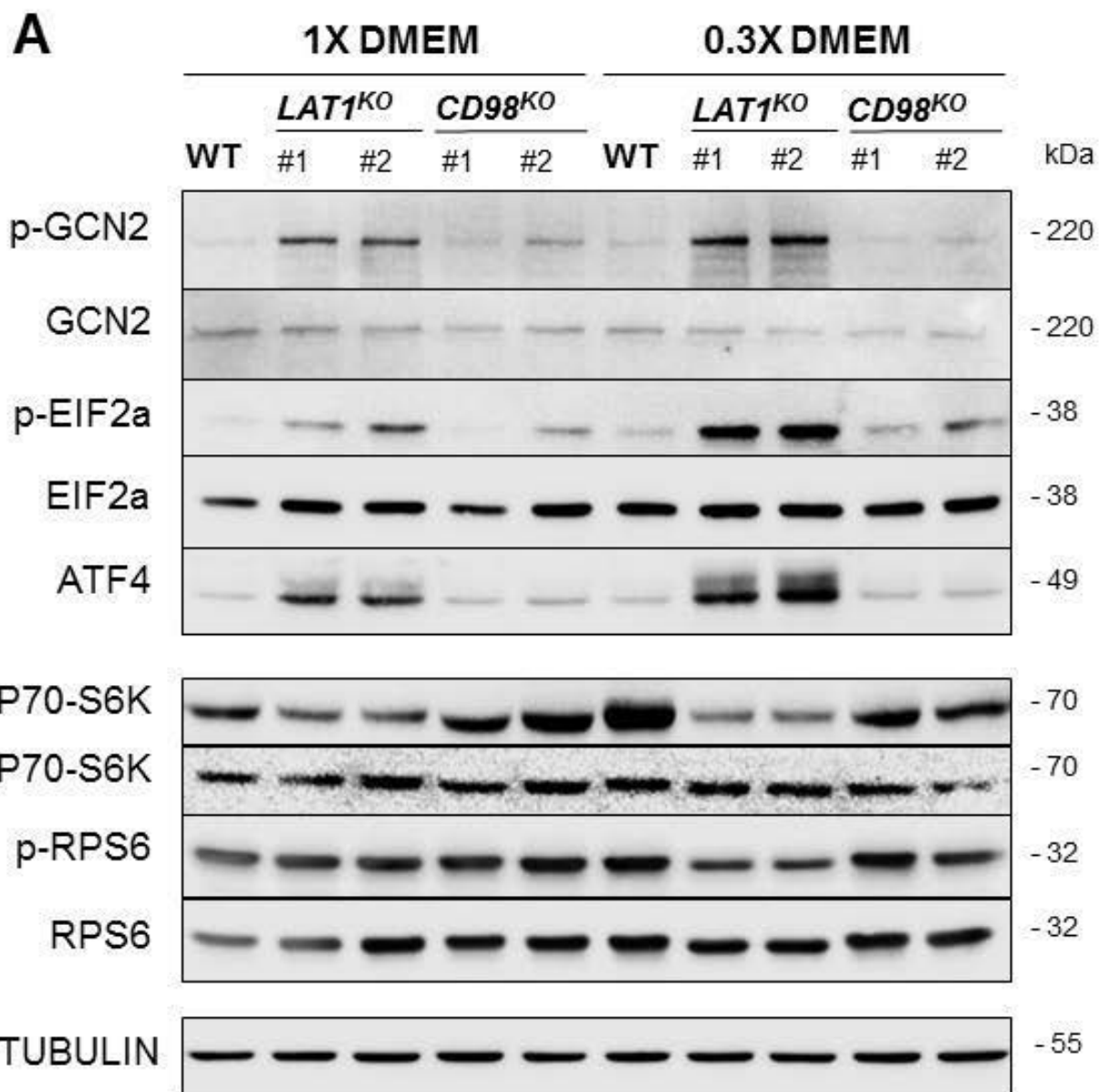


Figure 2 Cormerais et al.

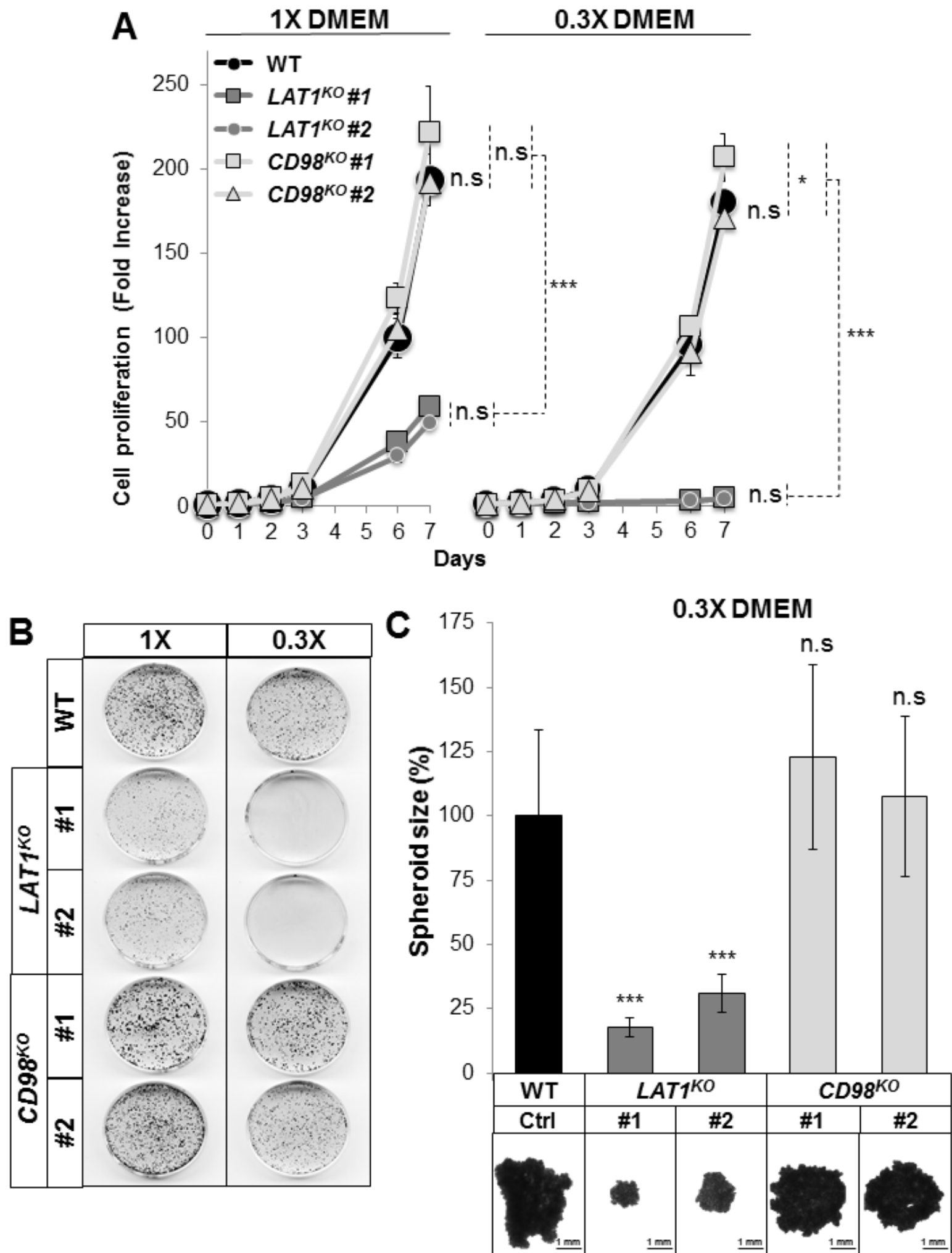


Figure 3 Cormerais et al.

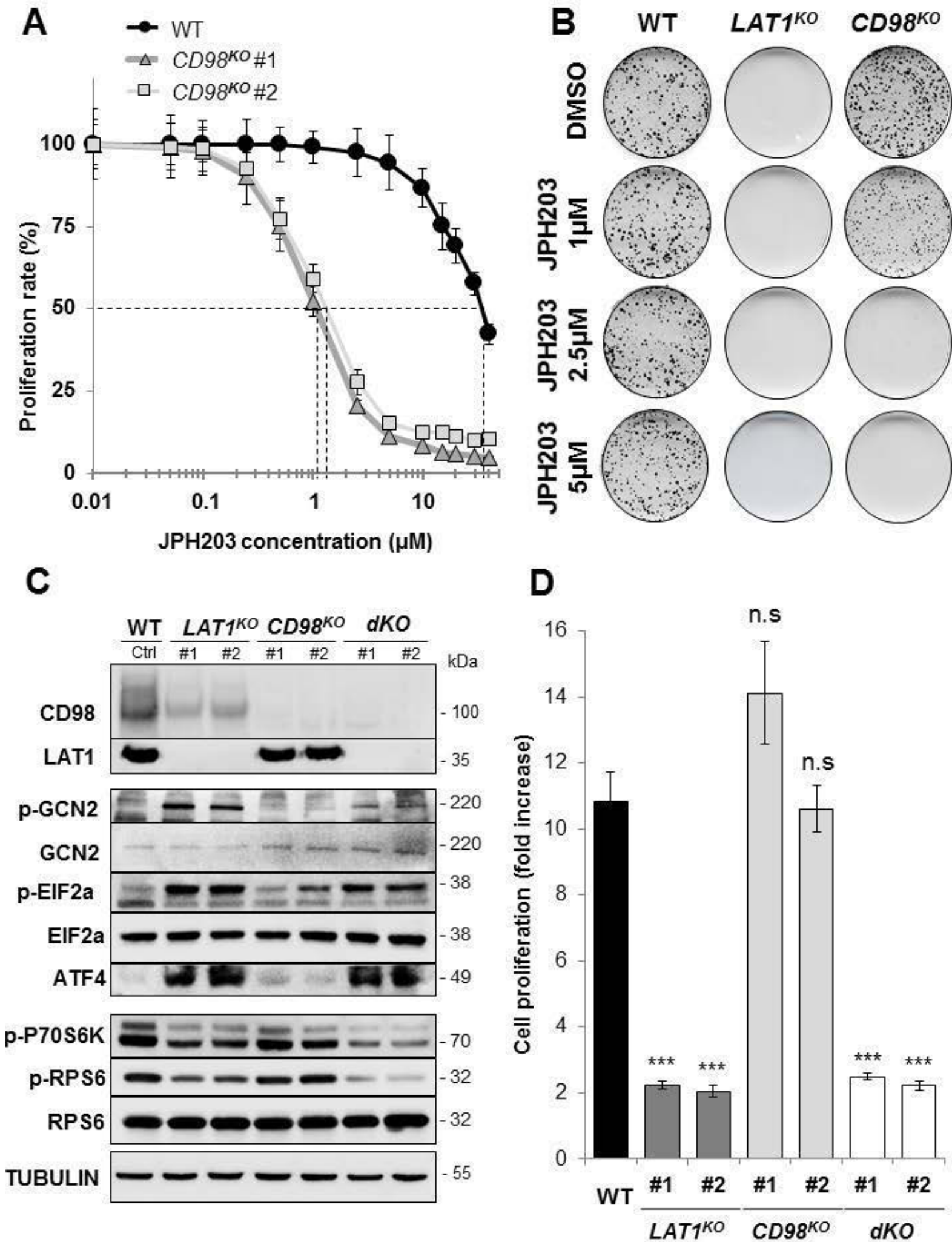


Figure 4 Cormerais et al.

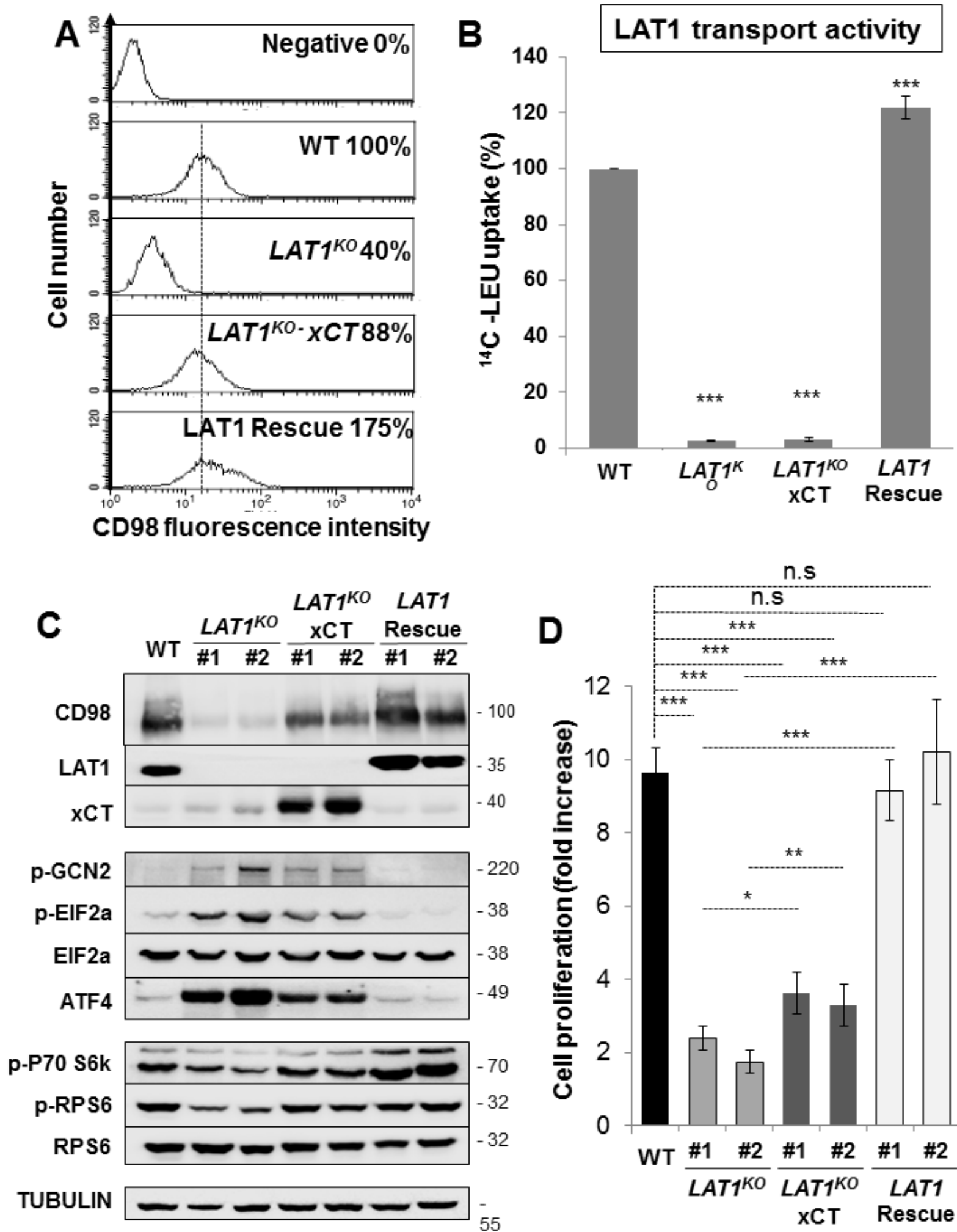


Figure 5 Cormerais et al.

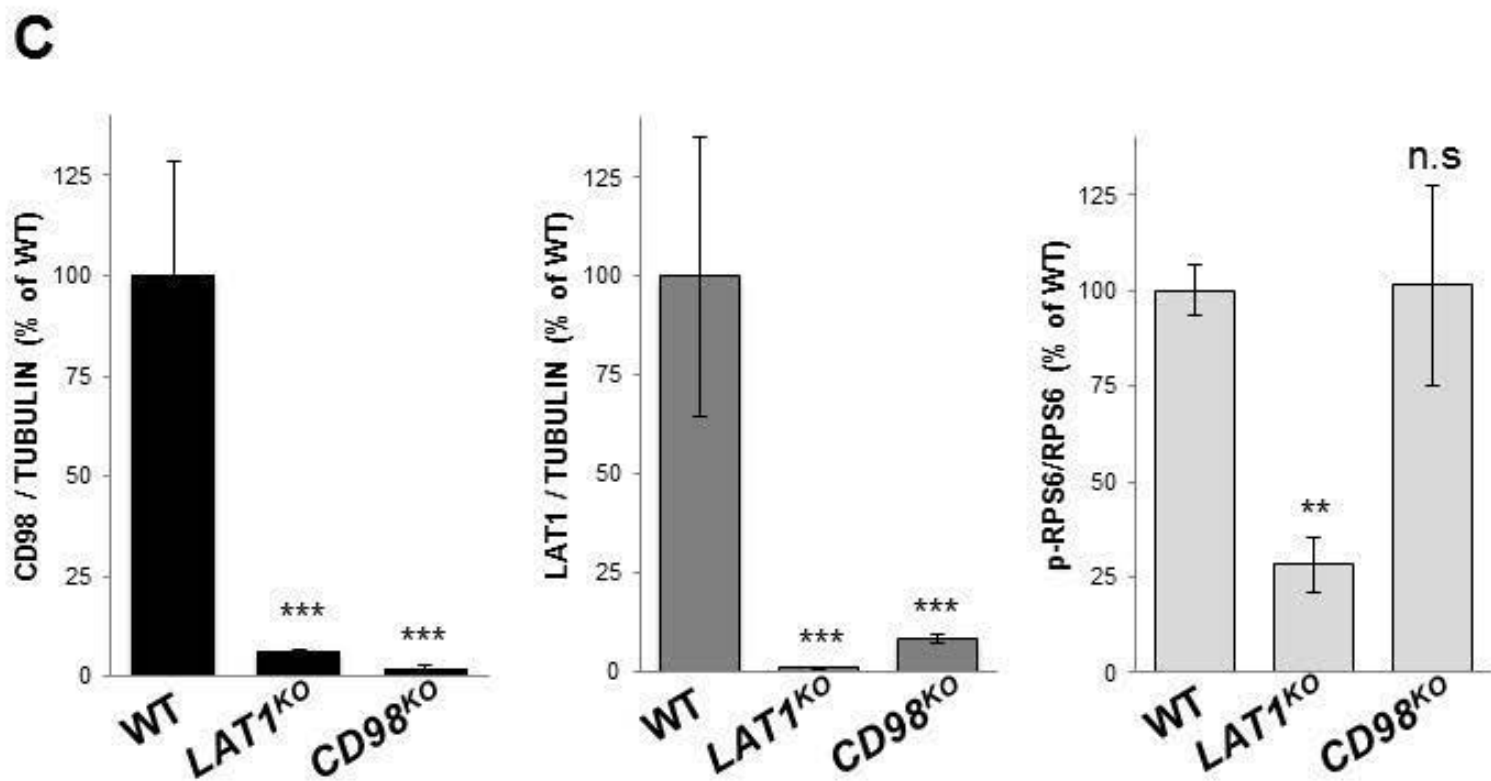
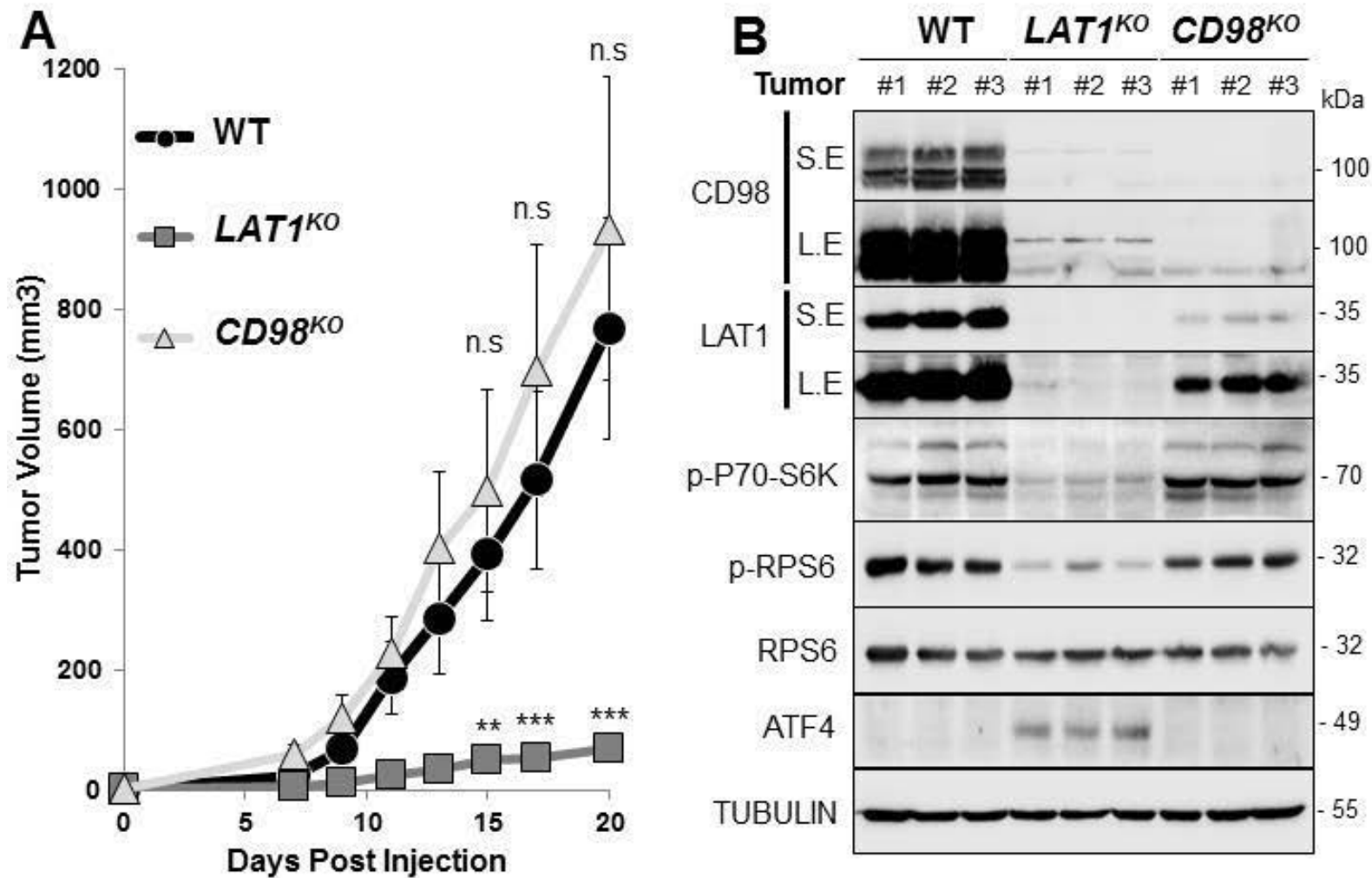


Figure 6 Cormerais et al.

	DMEM			
	1X	0.3X *	F12**	Plasma ***
Glycine	400	400	100	198
L-Alanyl- Glutamine	3972	3972	1000	592
L-Arginine, HCl	398	398	1000	98,5
L-Cystine	153	153	200	?
L-Histidine	200	200	100	81,6
<u>L-Isoleucine</u>	<u>802</u>	<u>267,33</u>	<u>30</u>	<u>66,9</u>
<u>L-Leucine</u>	<u>802</u>	<u>267,33</u>	<u>100</u>	<u>128,6</u>
L-Lysine, HCl	798	798	200	195,3
<u>L-Methionine</u>	<u>201</u>	<u>67</u>	<u>30</u>	27,3
<u>L-Phenylalanine</u>	<u>400</u>	<u>133,33</u>	<u>30</u>	<u>62,2</u>
L-Serine	400	400	100	106,7
L-Threonine	798	798	100	122,6
<u>L-Tryptophan</u>	<u>78</u>	<u>26</u>	<u>10</u>	<u>58,9</u>
L-Tyrosine	398	398	30	68,2
L-Valine	803	803	100	235,1

* : Note only LAT1 substrats have been reduced to 0.3X

** : F12 media also contains: Alanine (100µM), Asparagine (100µM), Aspartic Acid (100µM), Glutamic Acid (100µM), Proline (300µM)

*** : Yohei Miyagi et al. PLoS One. 2011

AA concentration in µM

Table S1: Comparison of the amino acid concentrations of the media/versus human plasma. Amino acid concentrations for each of the culture media used in this study are described. These concentrations are compared with physiological concentration determined by Miyagi et al. (PLoS One. 2011)

Clone	Allele	Mutation type	Mutation Sequence
LAT1 ^{KO} #1	1	Deletion	CGGGTGTACG
	2	Insertion	CGCT
LAT1 ^{KO} #2	1 & 2	Insertion	T
CD98 ^{KO} #1	1 & 2	Insertion	GCCTGCTAAAGAATTTCAACG GCCTAGACTTTGCAGGTAAGT GAAAAAGAAGGGTTTTTTGTT GTAACCTGTTATGTTTACATTT TTTTCTACCCTACGGTGACAG CACAGGTTTGGGGTCCCACA TTGCTTGCCATAGAGATCTTT TCAAAACACACATCTGCCAAT TCCACCTTCCTGTTATAAAC CCTTCTGTGACTCCCCATTGC TTTCAGAATAAAGACCAAAT GATGAATGTGATCCACTGTTC CCAGCATGGTCTGGTTCCTT GCCACCTCTCACCATAG
CD98 ^{KO} #2	1 & 2	Deletion	TTAGAGCCCGAGAAGCAGC CGATGAACGCGGCGTCTGG GGCGGCCATGTCCC TGGCGG

Table S2 Cormerais et al.

Table S2: Analysis of the mutations generated by ZFN in each LS174T-derived cell line used.

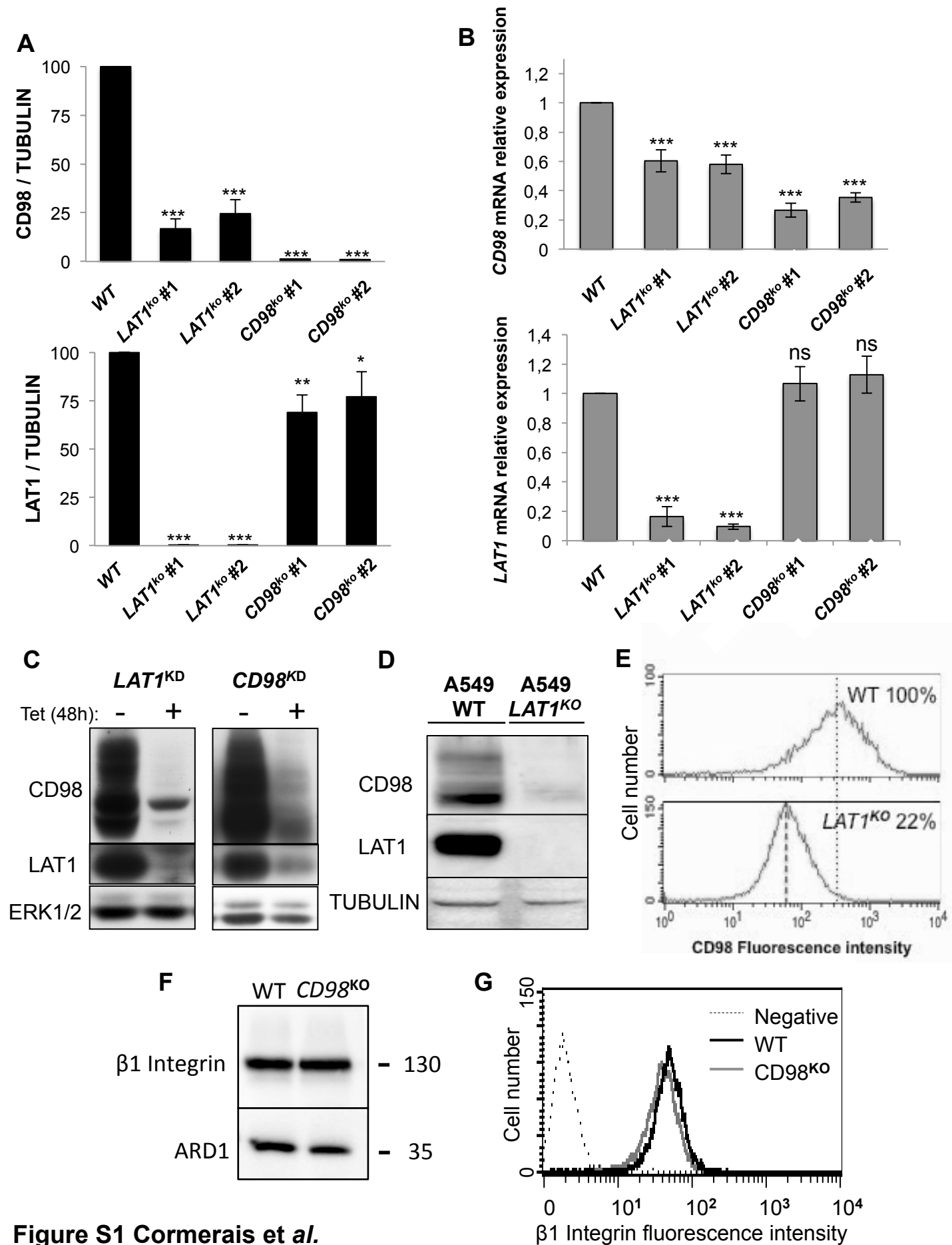
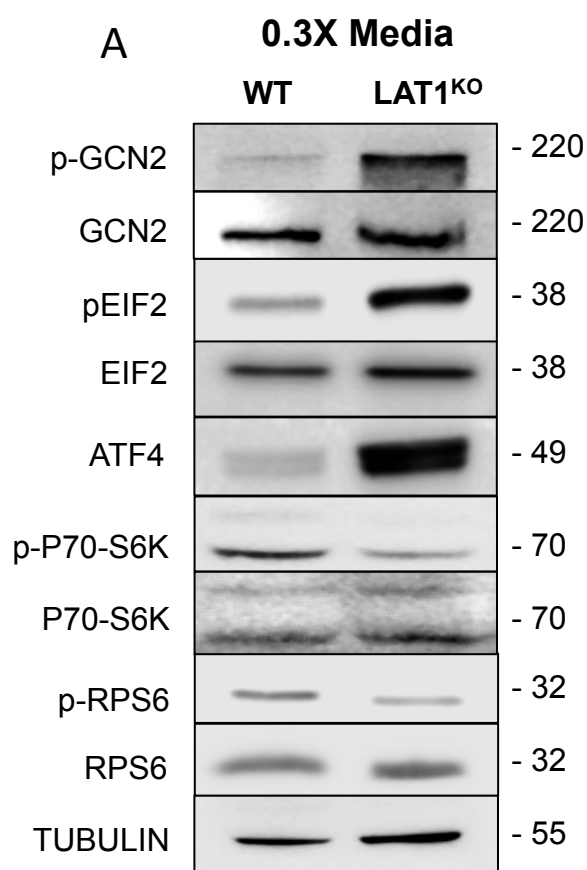


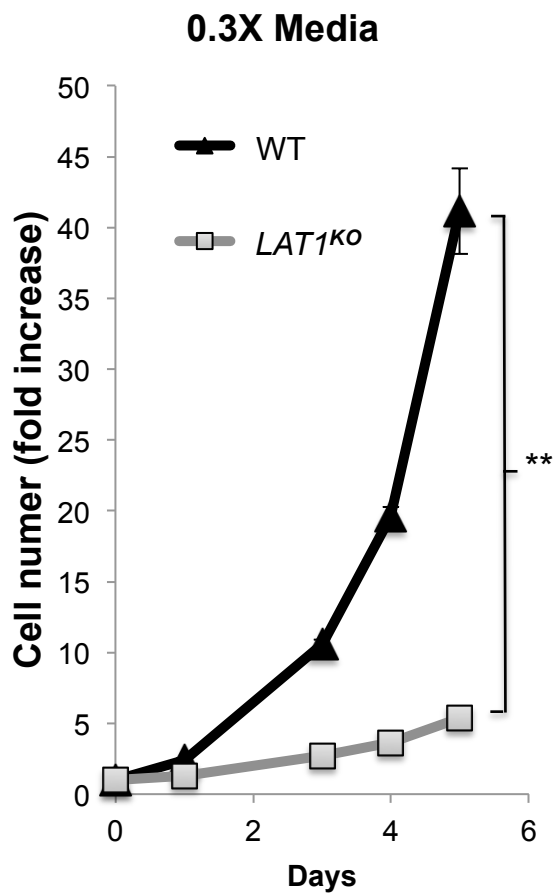
Figure S1 Cormerais et al.

Figure S1: Quantification of respective mRNA and protein expression of each member of the CD98/LAT1 complex and β 1 integrin in the various cell lines and knockout derivatives.

A: Quantification of LAT1 and CD98 total expression in LS174T WT, LAT1KO and CD98KO cells. Quantifications represent the average of three independent immunoblotting experiments. B: The LAT1 and CD98 mRNA expression were analyzed by RT-qPCR in LS174T WT, LAT1KO and CD98KO cells demonstrating a transcriptional regulation of CD98 in LAT1KO cells. 2 independent clonal cell lines of LAT1 and CD98 knockout are shown (#1, #2). RPLP0 was used as the control gene of reference. WT cells were used as the control sample reference. These results represent the average three independent experiments. C: LAT1 and CD98 protein expression were analyzed by immunoblotting in LS174T WT, LAT1KD and CD98KD cells. ERK 1/2 was used as a loading control. D: LAT1 and CD98 protein expression were analyzed by immunoblotting in A549 WT and LAT1KO cells demonstrating an interdependence of protein expression for CD98. Tubulin was used as a loading control. E: Plasma membrane expression of CD98 was analyzed by flow cytometry in A549 WT and LAT1KO cells. Relative membrane expression of CD98 is noted on each panel as a percentage (%) compared to WT cells. F: Total β 1 Integrin expression was analyzed by immunoblotting (RD systems, MAB1778) in LS174T WT and CD98KO cells with ARD1 used as a loading control. G: Plasma membrane expression of β 1 integrin was analyzed by flow cytometry in LS174T WT dans CD98KO cells. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$; n.s: not significant.



B



C **0.3X Media**

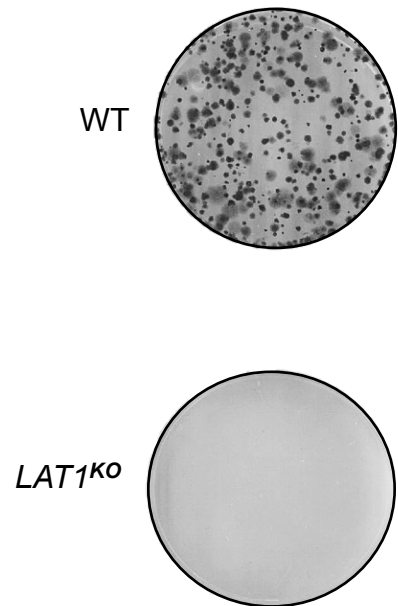


Figure S2 Cormerais et al.

Figure S2: Phenotypic analysis of the genetic disruption of LAT1 in the lung adenocarcinoma cell line: A549

A: A549 WT and LAT1KO cells were cultivated for 24h in 0.3X DMEM. Changes in phosphorylation status and protein abundance of members of the two major amino acid sensing pathways GCN2 (p-GCN2/p-EIF2a/ATF4) and mTORC1 (p-p70-S6K and p-RPS6) were analyzed by Western blot. Tubulin was used as a loading control. B: Cell proliferation of A549 WT (black) and LAT1KO (grey) cells. Cells were cultivated for 5 days in 0.3X DMEM and media was replaced at day 3. Proliferation rates are presented as fold increase (see methods for detailed description). C: Clonal growth of A549 WT and LAT1KO cells. Cells were cultivated 15 days in 0.3X DMEM and colored for visualization using Geimsa. Media was replaced every 3 days. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$; n.s: not significant.

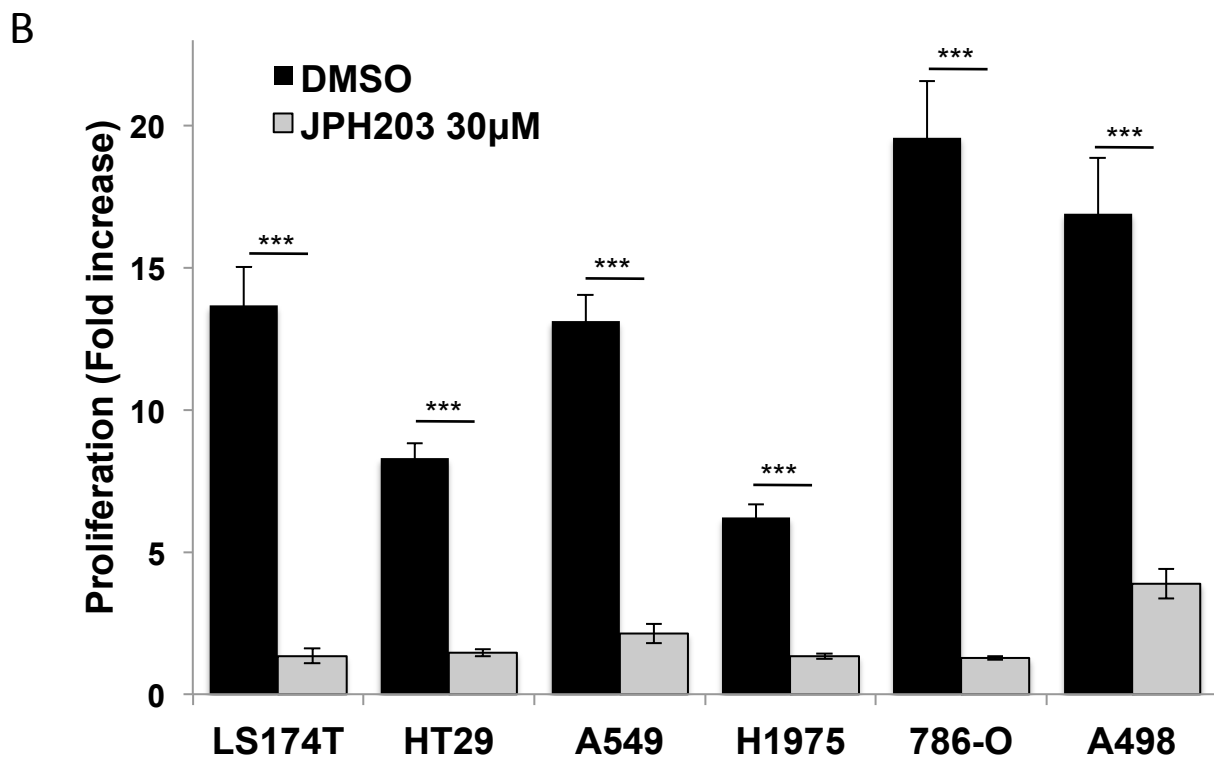
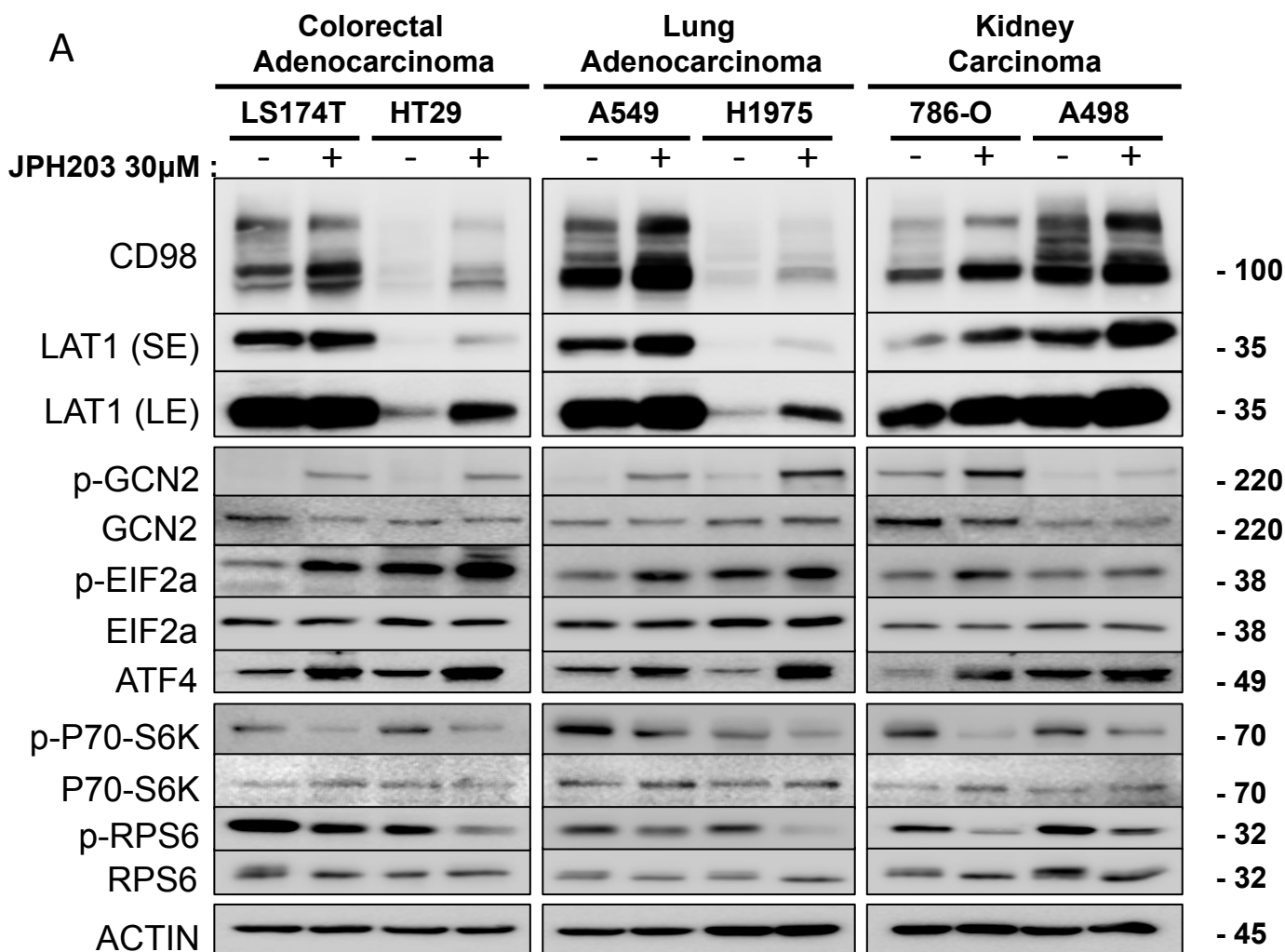
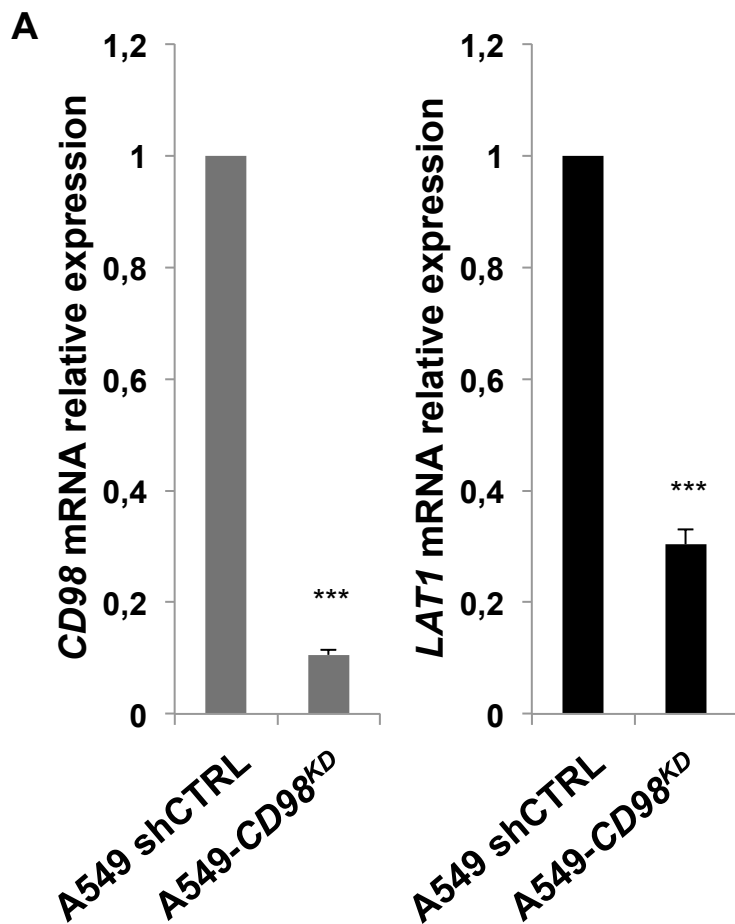


Figure S3 Cormerais et al.

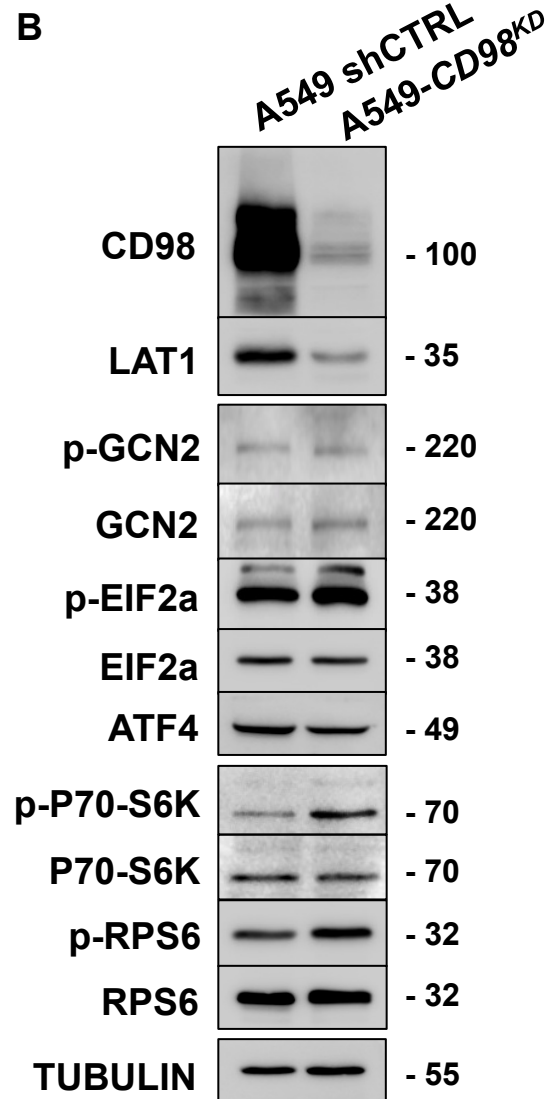
Figure S3: Disruption of CD98 in A549 cell line has not impact on AA sensing pathways and proliferation.

A: The LAT1 and CD98 mRNA expression were analyzed by RT-qPCR in A549 shCTRL and CD98KD cells demonstrating a transcriptional downregulation of CD98 and LAT1 mRNA in CD98KD cells. RPLP0 was used as the control gene of reference and WT cells acted as the control reference. These results represent the average of three independent experiments. B: A549 shCTRL and CD98KD cells were cultivated for 24 hours in 0.3X media. Changes in phosphorylation status and protein abundance of members of the two major amino acid sensing pathways GCN2 (p- GCN2/p-EIF2a/ATF4) and mTORC1 (p-p70-S6K and p-RPS6) were analyzed by Western blot. Tubulin was used as a loading control. C: Cell proliferation of A549 shCTRL (black) and CD98KD (grey) cells. Cells were cultivated for 5 days in 0.3X DMEM and media was replaced at day 3. Proliferation rates are presented as fold increase (see methods for detailed description). D: Clonal growth of A549 shCTRL and CD98KD cells cultivated for 15 days in 0.3X DMEM and treated with DMSO or different concentrations of JPH203 (10 μ M or 30 μ M) with visualization achieved via Giemsa staining. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$; n.s: not significant.

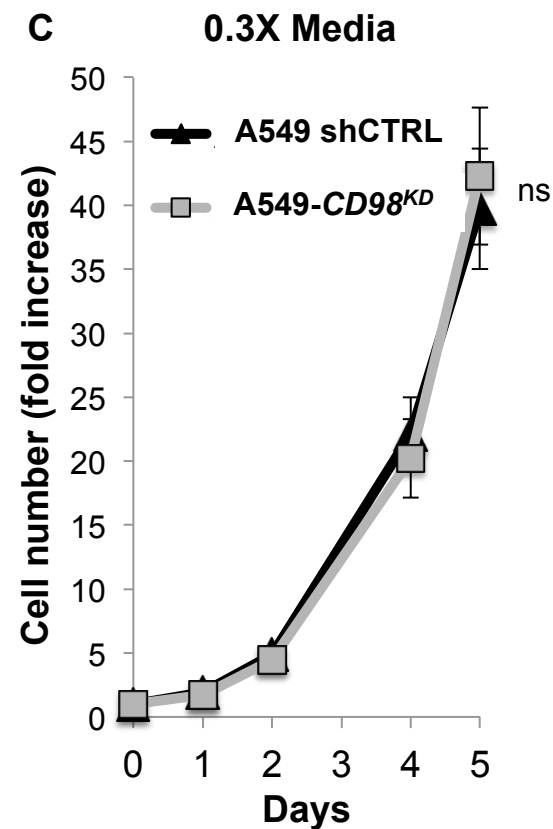
0.3X Media



0.3X Media



0.3X Media



0.3X Media

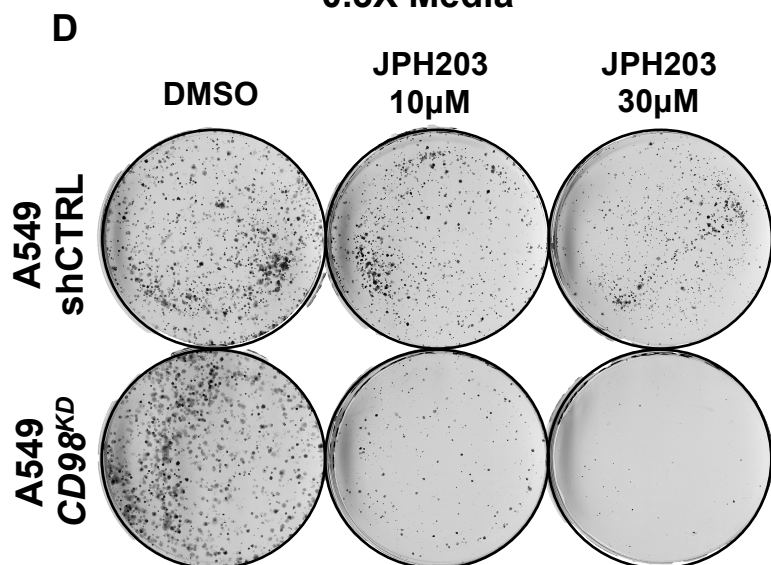


Figure S4 Cormerais et al.

Figure S4: LAT1 activity is a key limiting step for AA homeostasis and proliferation in multiple cancer types.

JPH203 is a LAT1 competitive inhibitor and its effect is directly linked to the AA concentration in the media and expression level of the transporter. Therefore in order to observe a magnified effect of the JPH203 the following experiments were performed using the commercial F12 media that contains low EAA concentration (see Table S2) and a rather high JPH203 concentration (30 μ M).

A: 6 independent cancer cell lines (Colon adenocarcinoma: LS174T and HT29, Lung adenocarcinoma: A549 and H1975, Kidney carcinoma: 786-O and A498) cells were cultivated for 48 hours with DMSO (-) or JPH203 (+) (30 μ M). Changes in phosphorylation status and protein abundance of members of the two major amino acid sensing pathways GCN2 (p-GCN2/p-EIF2a/ATF4) and mTORC1 (p-p70-S6K and p-RPS6) were analyzed by Western blot. Actin was used as a loading control. B: Proliferation assays of the 6 cell lines were conducted in presence of vehicle (DMSO) or JPH203 (30 μ M). Cells were counted after 72 hours and data are presented as fold increase (see methods for detailed description).

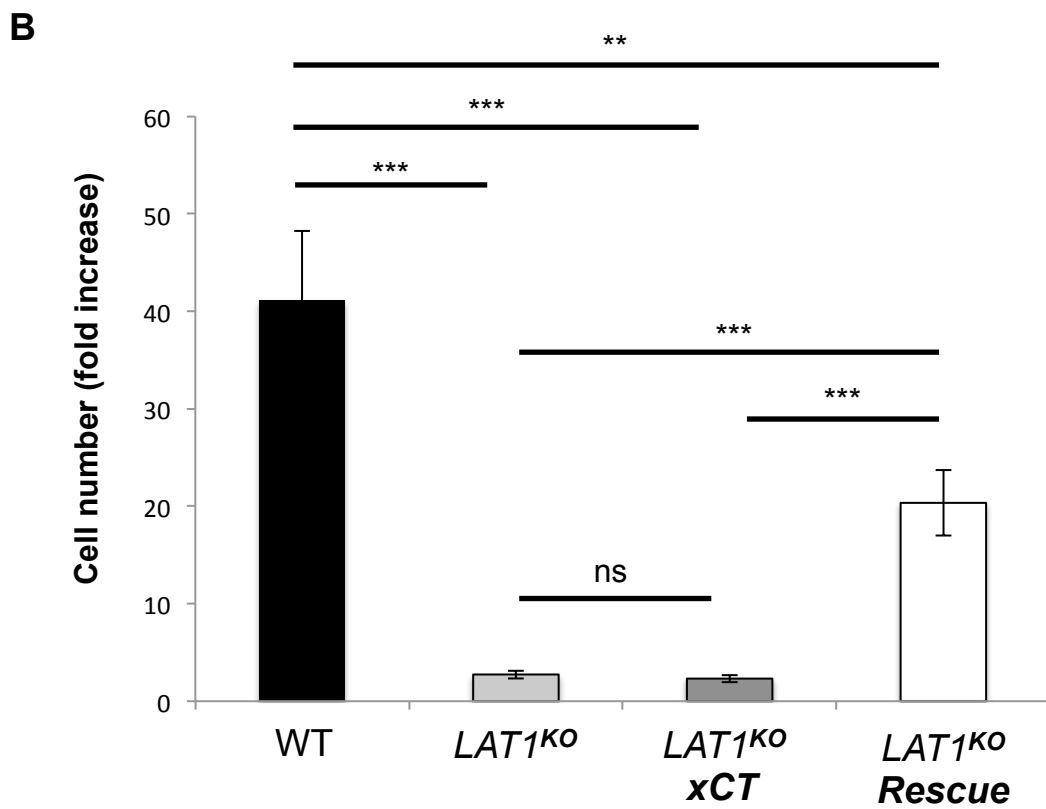
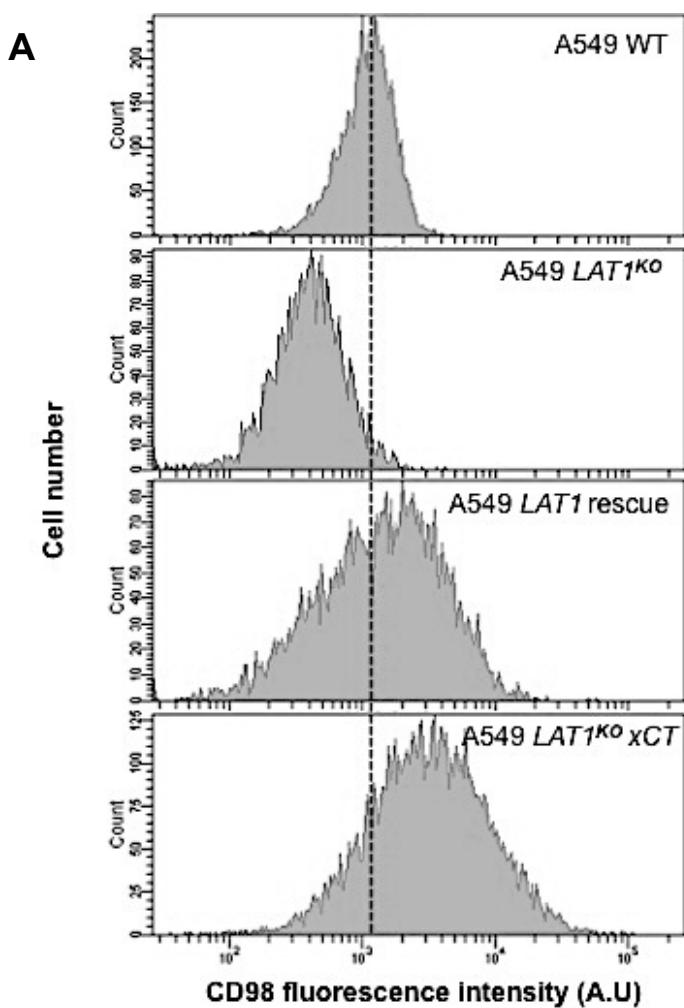


Figure S5 Cormerais et al.

Figure S5: Rescue of CD98 expression in A549 LAT1KO cells

A: Plasma membrane expression of CD98 was analyzed by flow cytometry in A549 WT, LAT1KO cells and LAT1KO cells transiently expressing either the xCT or LAT1 cDNA to observe rescue of CD98 expression. B: Cell proliferation analysis of A549 LAT1KO and LAT1KO cells transiently expressing either xCT or LAT1. Cells were counted after 3 days of culture in 0.3X DMEM. These results represent the average of two independent experiments. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$; n.s: not significant.

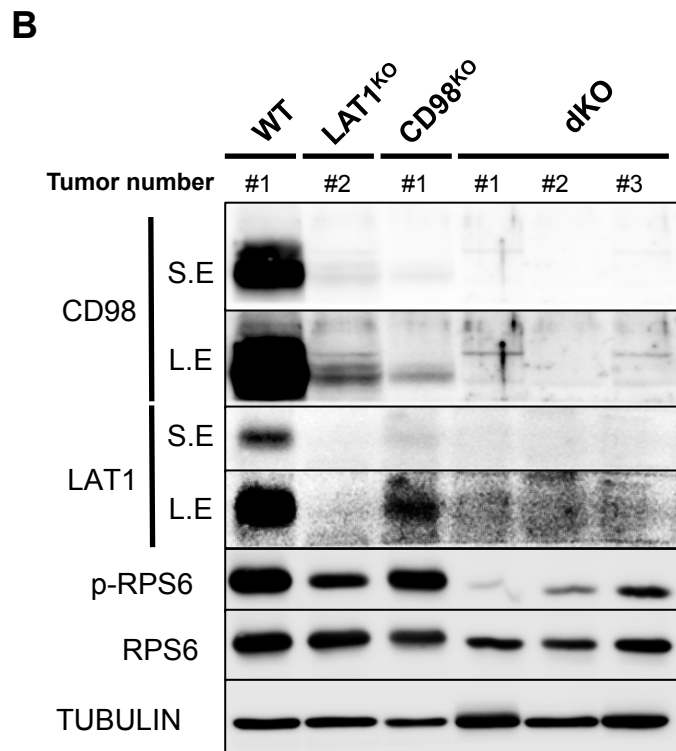
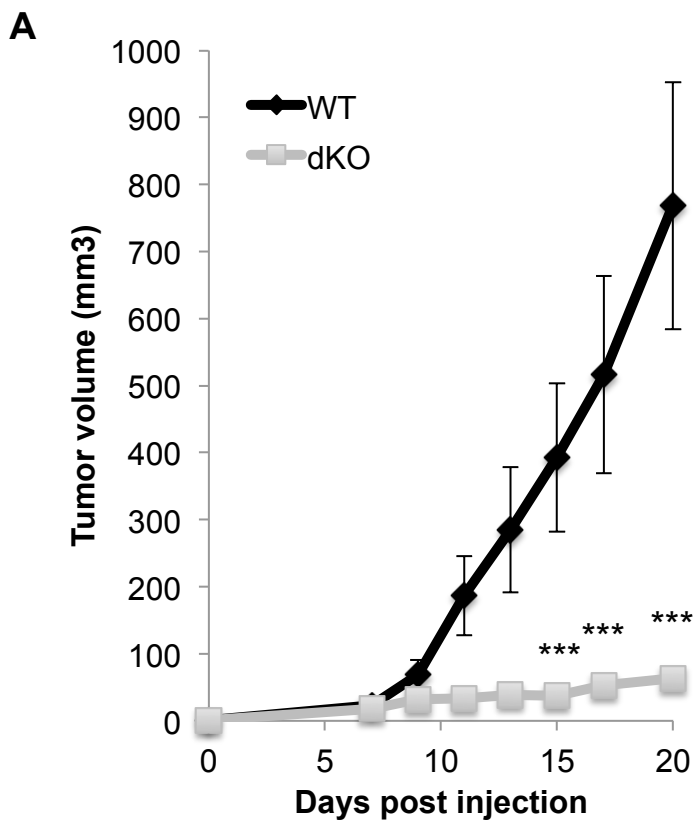


Figure S6 Cormerais et al.

Figure S6: Tumorigenicity and mTORC1 activity of WT and double CD98KO/LAT1KO cells.

A: Tumor volumes of nude mice injected subcutaneously with LS174T WT (black) or LAT1KO / CD98KO (dKO, grey) cells revealed dramatic inhibition of tumor growth with dKO cells. B: Protein levels of LAT1, CD98 and mTORC1 (p-RPS6, RPS6) were analyzed by immunoblotting in WT and dKO tumors. Tubulin acted as a protein loading control. SE: Short exposition, LE: Long exposition *** = $P < 0.001$

PROJET EN COURS

Etude du transporteur ASCT2 dans la croissance tumorale et analyse génétique d'un couplage fonctionnel ASCT2::LAT1

Y. Cormerais*, P. A. Massard* et J. Pouyssegur

** Ces deux auteurs ont contribué de façon équivalente à ce projet*

Contexte et objectif de la recherche

Ce projet développé en collaboration avec Pierre-André Massard, que j'ai encadré lors de ses années de Master I et II, représente la continuité de mon premier travail de thèse qui a démontré le rôle clé du transporteur d'acide aminé LAT1 dans le maintien de l'homéostasie des acides aminés, l'activité mTORC1 et la progression tumorale.

Une étude de 2009 a suggéré que LAT1 était fonctionnellement couplé au transporteur ASCT2 (voir Introduction Chapitre 2 Partie 2.1 et 2.4)(Nicklin, Bergman et al. 2009). D'après ce modèle, le transporteur ASCT2 serait responsable de l'entrée de glutamine qui sera ensuite échangé *via* LAT1 contre la leucine permettant ainsi l'activation de mTORC1. Puisque nous disposons déjà de deux lignées cellulaires cancéreuses LAT1^{KO}, nous avons décidé de valider ce couplage fonctionnel en réalisant en parallèle une invalidation génétique d'ASCT2 afin de comparer les phénotypes des cellules LAT1^{KO} versus ASCT2^{KO}. Si ce couplage fonctionnel est opérationnel on s'attend à reproduire les mêmes effets phénotypiques chez les cellules LAT1^{KO}.

Matériels et méthodes

La majorité des méthodes expérimentales utilisées pour ce projet sont les mêmes que celles utilisées pour la publication précédente, à la seule différence que l'invalidation génétique fut réalisée en utilisant la technique CRISPR-Cas9 ciblant l'exon 5 du gène *ASCT2*. Egalement, lorsque ce n'est pas précisé, les expériences présentées

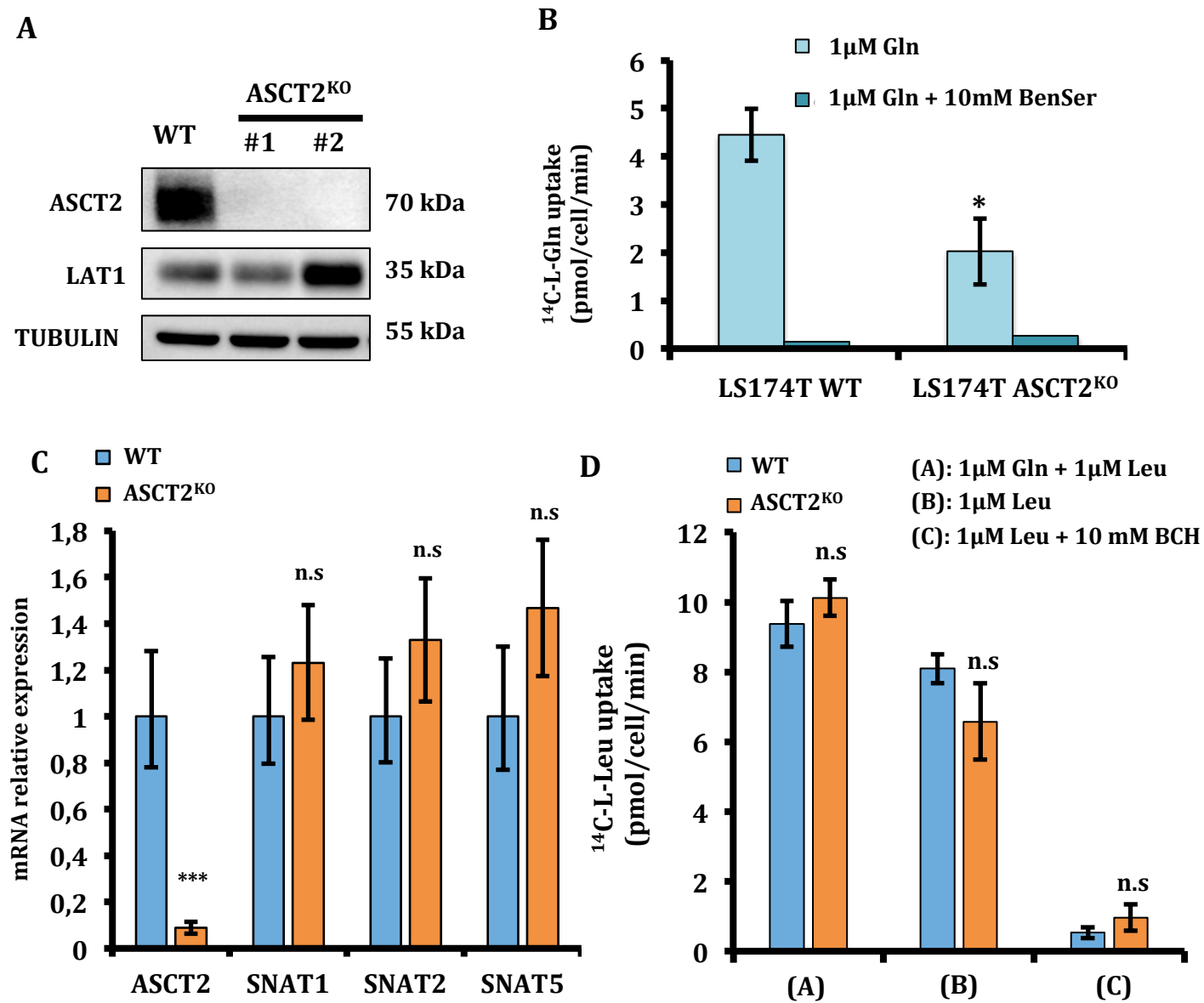


Figure 1 : L'invalidation d'ASCT2 n'a aucun effet sur l'expression et l'activité de LAT1 in vitro.

A : Les expressions d'ASCT2 et LAT1 ont été analysées par western blot dans les cellules LS174T WT et ASCT2^{KO}. Deux clones ASCT2^{KO} indépendants ont été utilisés (#1 et #2). La TUBULIN a été utilisée comme contrôle de charge. **B** : L'activité totale de transport de glutamine des cellules LS174T WT et ASCT2^{KO} a été analysée en mesurant l'entrée de glutamine radio-marquée au carbone 14 dans un milieu HBSS contenant 1 μM de glutamine. L'utilisation de 10mM de BenSer (Benzyl Serine), un inhibiteur de la majorité des transporteurs de glutamine, permet de quantifier le « bruit de fond » expérimental. **C** : Analyse de l'expression relative des ARNm de ASCT2, SNAT1, SNAT2 et SNAT5 dans les cellules LS174T WT et ASCT2^{KO}. *RPLP0* a été utilisé comme gène de ménage. **D** : L'activité de transport de LAT1 a été analysée en mesurant l'entrée de leucine radio-marquée au carbone 14 dans un milieu HBSS dépourvu en Na⁺ et contenant 1 μM de leucine avec (A) ou sans (B) pré-incubation dans un milieu contenant de la glutamine. En condition (C) 10mM de BCH, un inhibiteur des transporteurs LATs a été utilisé pour déterminer le bruit de fond expérimental. * = P < 0,05 , n.s = non significatif

dans cette étude ont été réalisées avec un milieu de culture DMEM 0.3X EAA utilisé précédemment dans notre publication.

Résultats et conclusions

L'invalidation d'ASCT2 n'a aucun effet sur l'expression et l'activité de LAT1 in vitro.

Dans le but d'analyser le potentiel couplage fonctionnel entre LAT1 et ASCT2 suggéré par l'étude de Nicklin *et al.*, nous avons réalisé une invalidation génétique du transporteur ASCT2 dans une lignée d'adénocarcinome colique LS174T en utilisant la technique CRISPR/Cas9 et nous avons sélectionné deux clones indépendants pour cette étude (Fig.1A). Le clone ASCT2^{KO} #1 présente une légère diminution de l'expression de LAT1 (Fig. 1A) tandis que le clone #2 présente quant à lui une forte augmentation de l'expression de LAT1 (Fig. 1A). Ces différences sont très certainement causées par un effet d'hétérogénéité clonal plutôt qu'une conséquence directe de l'invalidation d'ASCT2 suggérant ainsi que l'expression de LAT1 et d'ASCT2 sont indépendantes.

Par la suite nous avons étudié l'impact de l'invalidation d'ASCT2 sur les activités de transport d'acides aminés. La délétion d'ASCT2 a entraîné une chute de 55% du transport total de glutamine (Fig. 1B). La persistance de 45% d'activité de transport suggère donc que ASCT2 n'est pas le seul transporteur de glutamine exprimé dans les cellules LS174T ASCT2^{KO}. Une étude publiée très récemment a démontré que l'invalidation génétique d'ASCT2 dans une lignée cellulaire d'ostéosarcome entraînait la surexpression des transporteurs de glutamine de type SNAT (Sodium Neutral Amino acid Transporters) (Broer, Rahimi *et al.* 2016). De ce fait, nous avons donc cherché à savoir si un mécanisme adaptatif comparable était mis en place dans notre modèle cellulaire. Une analyse par RT-qPCR nous a permis de mettre en évidence l'expression des ARNm de SNAT1, 2 et 5 (Fig. 1C). Cependant, ces résultats ne démontrent aucune différence significative d'expression entre les cellules WT et ASCT2^{KO} (Fig. 1C) suggérant ainsi que les 45% de transport restant des cellules ASCT2^{KO} n'est pas causé par un mécanisme adaptatif mais représente une redondance fonctionnelle déjà présente au sein des cellules WT. Cependant, le niveau d'expression d'un ARNm ne représente pas toujours l'expression protéique. Il nous faudra donc confirmer ces résultats par western

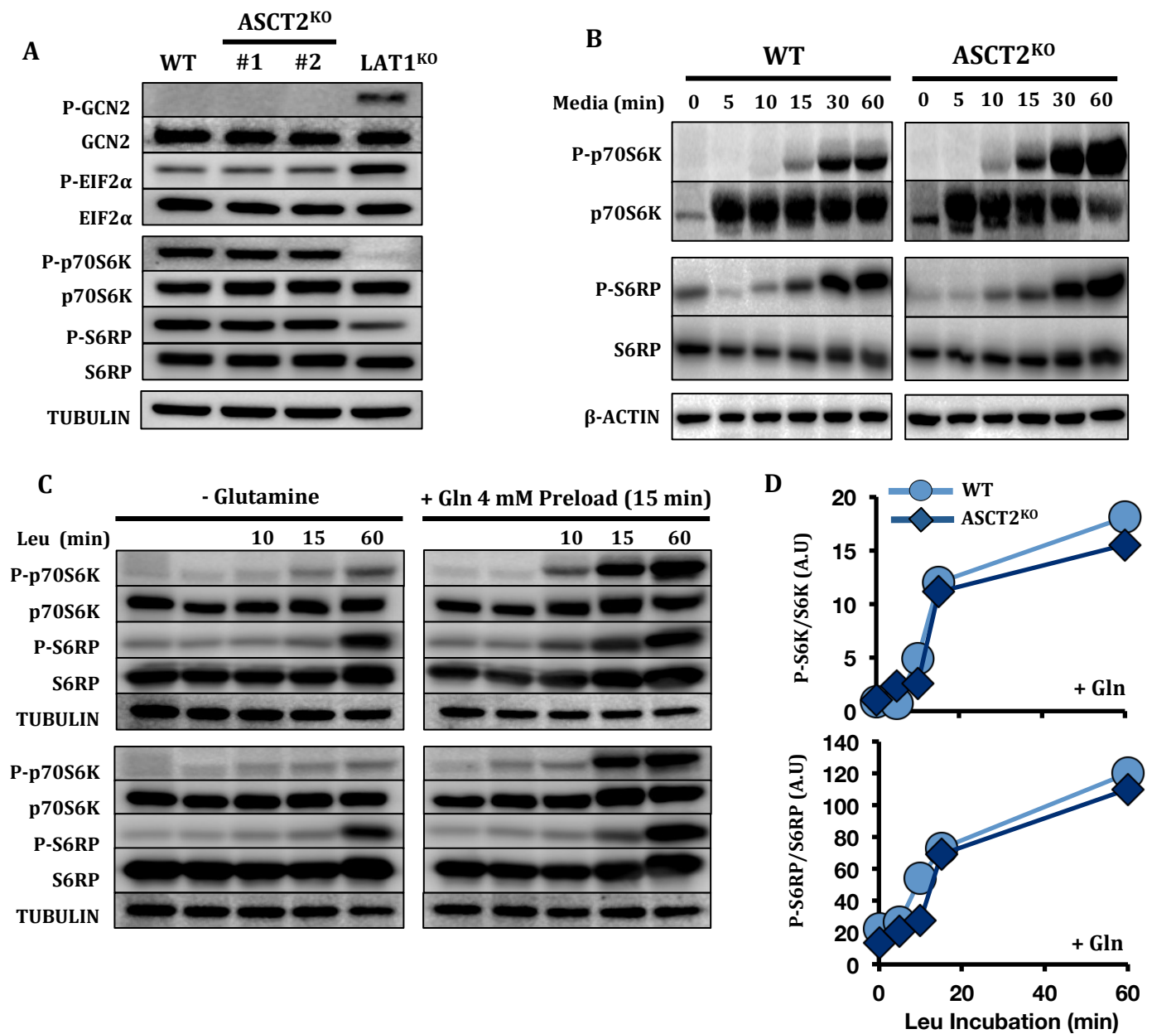


Figure 2 : L'invalidation d'ASCT2 n'a pas d'effet sur les voies mTORC1 et GCN2
A : Les activités des voies de signalisation GCN2 (p-GCN2 et p-EIF2α) et mTORC1 (P-p70S6K et P-S6RP) ont été analysées par western blot dans les cellules LS174T WT, ASCT2^{KO}(#1 et #2) et LAT1^{KO}. Les cellules ont été cultivées 48 heures dans un milieu 0.3X EAA avant d'être lysées pour analyse. La TUBULIN a été utilisée comme contrôle de charge. **B** : Analyse de la cinétique de réactivation de mTORC1 des lignées LS174T WT et ASCT2^{KO}. Les cellules ont été carencées une nuit en acides aminés avant d'être incubées dans un milieu 0.3X EAA. Les cellules sont ensuite lysées à différents temps et le taux d'activation de mTORC1 est représenté par le niveau de phosphorylation de p70S6K et S6RP. La β-ACTIN a été utilisée comme contrôle de charge. **C** : Analyse de la cinétique d'activation de mTORC1 par la leucine des lignées LS174T WT et ASCT2^{KO} avec ou sans pré-incubation de glutamine. Les cellules ont été carencées une nuit en acides aminés avant d'être pré-incubées (droite) ou non (gauche) durant 15 min avec un milieu DMEM carencé pour tous les acides aminés mis à part la glutamine (4mM). Les cellules sont ensuite rincées au PBS avant d'être incubées avec un milieu DMEM ne contenant de la leucine comme seul acide aminé (800μM). Les cellules sont ensuite lysées à différents temps et le taux d'activation de mTORC1 est représenté par le niveau de phosphorylation de p70S6K et S6RP. La TUBULIN a été utilisée comme contrôle de charge. **D** : Quantification des niveau de phosphorylation / protéine totale de p70S6K et S6RP analysés dans la figure C. Ces courbes représentent uniquement la réactivation de mTORC1 avec la pré-incubation de glutamine.

blot, cytométrie de flux et surtout par inhibition pharmacologique du transport de glutamine Na⁺-dépendant catalysé par les SNATs.

D'après le modèle de couplage fonctionnel suggéré par l'étude de Nicklin *et al.*, le transport de leucine par LAT1 nécessite au préalable une entrée de glutamine par l'intermédiaire du transporteur ASCT2. Dans le but de tester ce modèle nous avons mesuré le transport de leucine Na⁺-indépendant réalisé par LAT1 avec (Fig. 1D diagramme A) ou sans (Fig. 1D diagramme B) pré-incubation de glutamine. Nos résultats ne démontrent aucune différence significative entre les cellules WT et ASCT2^{KO} dans toutes les conditions expérimentales testées suggérant ainsi que l'activité de LAT1 n'est pas altérée par l'inactivation d'ASCT2. Ainsi, il est probable que les 45% de transport résiduel de glutamine des cellules ASCT2^{KO} soient suffisant pour maintenir l'activité de LAT1.

L'inactivation d'ASCT2 n'a pas d'effet sur les voies mTORC1 et GCN2

Afin de confirmer nos précédentes conclusions quant à l'indépendance fonctionnelle de LAT1 vis-à-vis de ASCT2 dans notre modèle d'étude, nous avons analysé les voies de signalisations GCN2 et mTORC1 qui sont fortement altérées en réponse à l'inactivation du transporteur LAT1 (cf. Résultat Partie Publication). A l'inverse des cellules invalidées pour LAT1, les cellules ASCT2^{KO} ne présentent aucune modification de ces deux voies de signalisation comparé aux cellules WT en condition basale (Fig. 2A). Par la suite, nous nous sommes intéressés à la cinétique d'activation de la voie mTORC1 en réponse aux acides aminés. Après une carence en acides aminés pendant une nuit, nous avons incubé les cellules WT et ASCT2^{KO} dans un milieu DMEM 0.3XEAA. La cinétique d'activation de mTORC1 a été mesurée en analysant les niveaux de phosphorylation des protéines p70-S6K et S6RP à différents temps (Fig. 2B). Tout comme pour l'expérience précédente, aucune différence significative dans la vitesse de réactivation de mTORC1 n'a été détectée entre les cellules WT et ASCT2^{KO}; une phosphorylation des substrats de mTORC1 commençant à réapparaître entre 10 et 15 minutes (Fig. 2B). Finalement, dans le but d'étudier spécifiquement la réactivation de mTORC1 dépendante des activités de LAT1 et ASCT2 et d'écarter l'implication d'autres acides aminés capables d'activer mTORC1 tels que l'arginine, nous avons réitéré cette expérience mais cette fois ci en utilisant uniquement la glutamine et la leucine. Après une carence en acides aminés d'une nuit, les cellules WT et ASCT2^{KO} ont été pré-

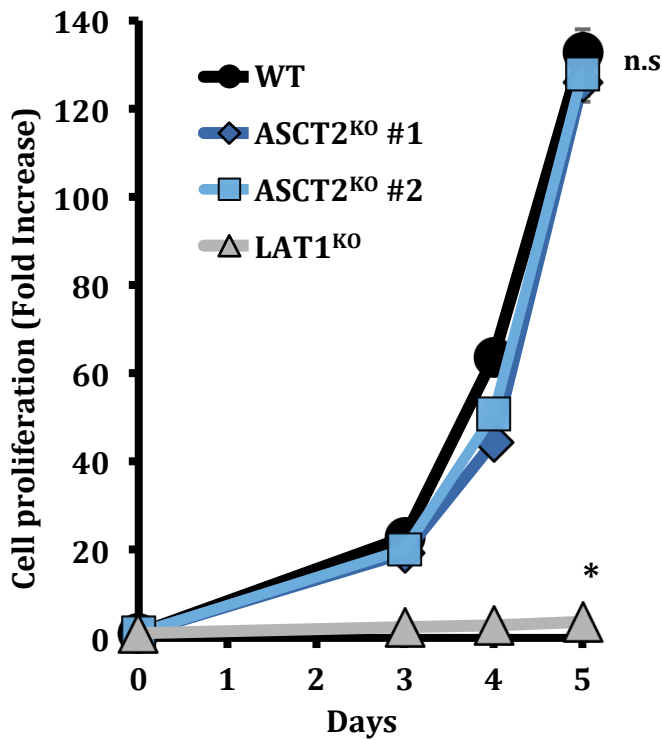
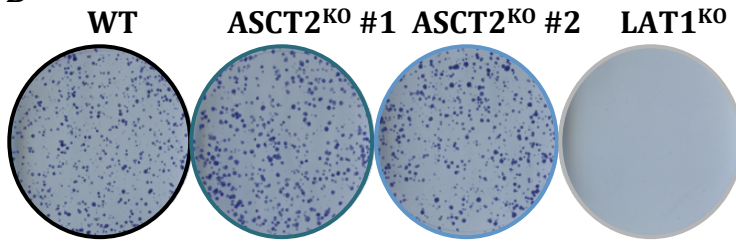
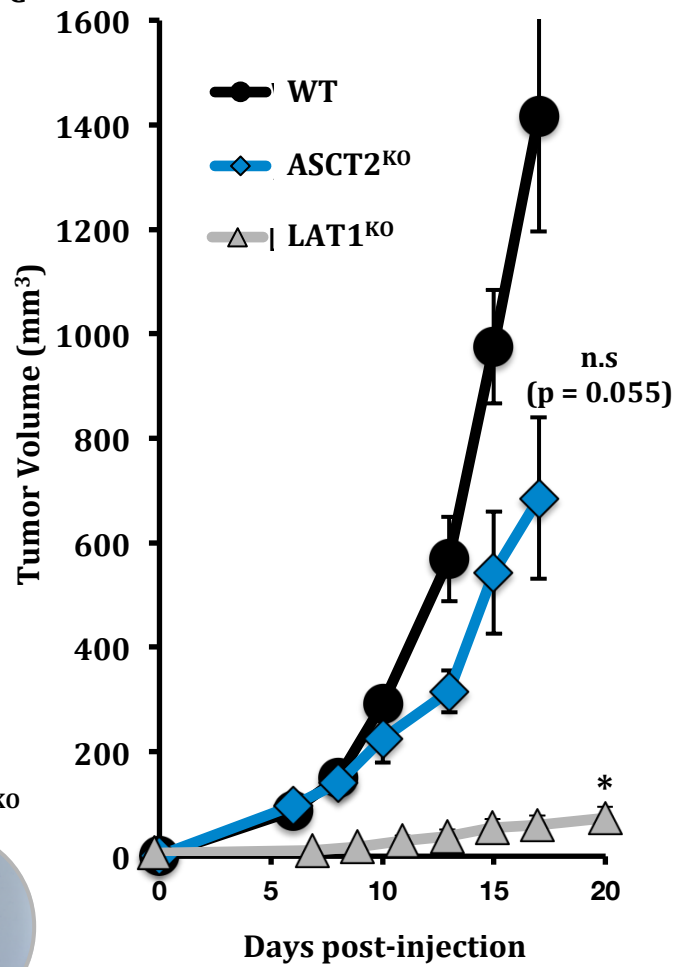
A**B****C**

Figure 3 : L'inactivation d'ASCT2 n'impacte pas la prolifération in vitro mais semble ralentir la croissance tumorale in vivo.

A : Prolifération cellulaire des cellules LS174T WT, ASCT2^{KO} (#1 et #2) et LAT1^{KO}. Les cellules ont été cultivées 5 jours dans un milieu 0.3X EAA et un changement de milieu a été réalisé au jour 3. La vitesse de prolifération est présentée ici en « fold increase » (voir matériel et méthode de la publication 1 pour plus d'information). **B :** Croissance clonale des cellules LS174T WT, ASCT2^{KO} (#1 et #2) et LAT1^{KO}. Les cellules ont été cultivées 15 jours dans un milieu 0.3X EAA avec changement du milieu tous les 3 jours. Au bout des 15 jours les cellules sont colorées pour visualisation à l'aide de GIEMSA. **C :** Courbes de croissance tumorale chez des souris nude injectées en sous cutanée avec 1 million de cellules LS174T WT, ASCT2^{KO} et LAT1^{KO}. * = P < 0,05 , n.s = non significatif

incubées ou non dans un milieu contenant 4mM de glutamine durant 15min avant d'être rincées et incubées avec un milieu contenant 800 μ M de leucine (ces concentrations correspondent aux concentrations d'un milieu DMEM classique). Dans les deux lignées cellulaires utilisées (WT et ASCT2^{KO}) la pré-incubation de glutamine permet une réactivation de la voie mTORC1 plus précoce avec un retour de la phosphorylation des protéines p70-S6K et S6RP débutant entre 10 et 15min contre environ 60min sans pré-incubation (Fig. 2C) démontrant ainsi le rôle essentiel de la glutamine dans l'activation de mTORC1 par la leucine. Cependant, bien que les cellules ASCT2^{KO} présentent une réduction de 55% du transport de glutamine (Fig. 1B), aucune différence majeure d'activation de mTORC1 n'est observée comparé aux cellules WT (Fig. 2C, D). Ces résultats démontrent que, dans les conditions expérimentales citées, l'activité d'ASCT2 n'est pas nécessaire à l'import de leucine nécessaire à l'activation de mTORC1.

L'invalidation d'ASCT2 n'impacte pas la prolifération in vitro mais ralentit la croissance tumorale in vivo.

Nous avons par la suite porté notre attention sur le phénotype prolifératif des cellules ASCT2^{KO}. En accord avec nos résultats de transport et d'activité de mTORC1 et GCN2, les cellules invalidées pour ASCT2 ne présentent aucune différence de prolifération *in vitro* avec les cellules WT, contrairement aux cellules LAT1^{KO} qui sont incapables de proliférer *in vitro* dans un milieu réduit en acides aminés essentiels (0.3X EAA) (Fig. 3 A, B). Cependant, bien que ces résultats ne soient pas significatifs à cause du faible nombre de souris utilisé (n=3), la croissance des tumeurs ASCT2^{KO} est altérée avec une diminution moyenne de leur taille de plus de 50% à 17jours (Fig. 3C). A l'heure actuelle, la raison de cette différence entre résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* nous reste inconnue mais il est probable que les différences entre les concentrations en nutriments *in vitro* comparées à celles retrouvées *in vivo* joue un rôle prépondérant dans ce phénomène (cf. Table S1 de la publication précédente). De plus, il n'est pas certain que la diminution de la croissance des tumeurs ASCT2^{KO} soit directement causée par une diminution d'activité de LAT1. En effet, la croissance des tumeurs ASCT2^{KO} reste plus rapide que celle des tumeurs invalidées pour LAT1^{KO} (Fig. 3C). La glutamine transportée par ASCT2 et les SNATs est un acide aminé également essentiel à de multiples processus métaboliques tels que le cycle de Krebs, la synthèse protéique, nucléotidique et lipidique. Son rôle dans le développement tumoral n'est donc pas limité à être le

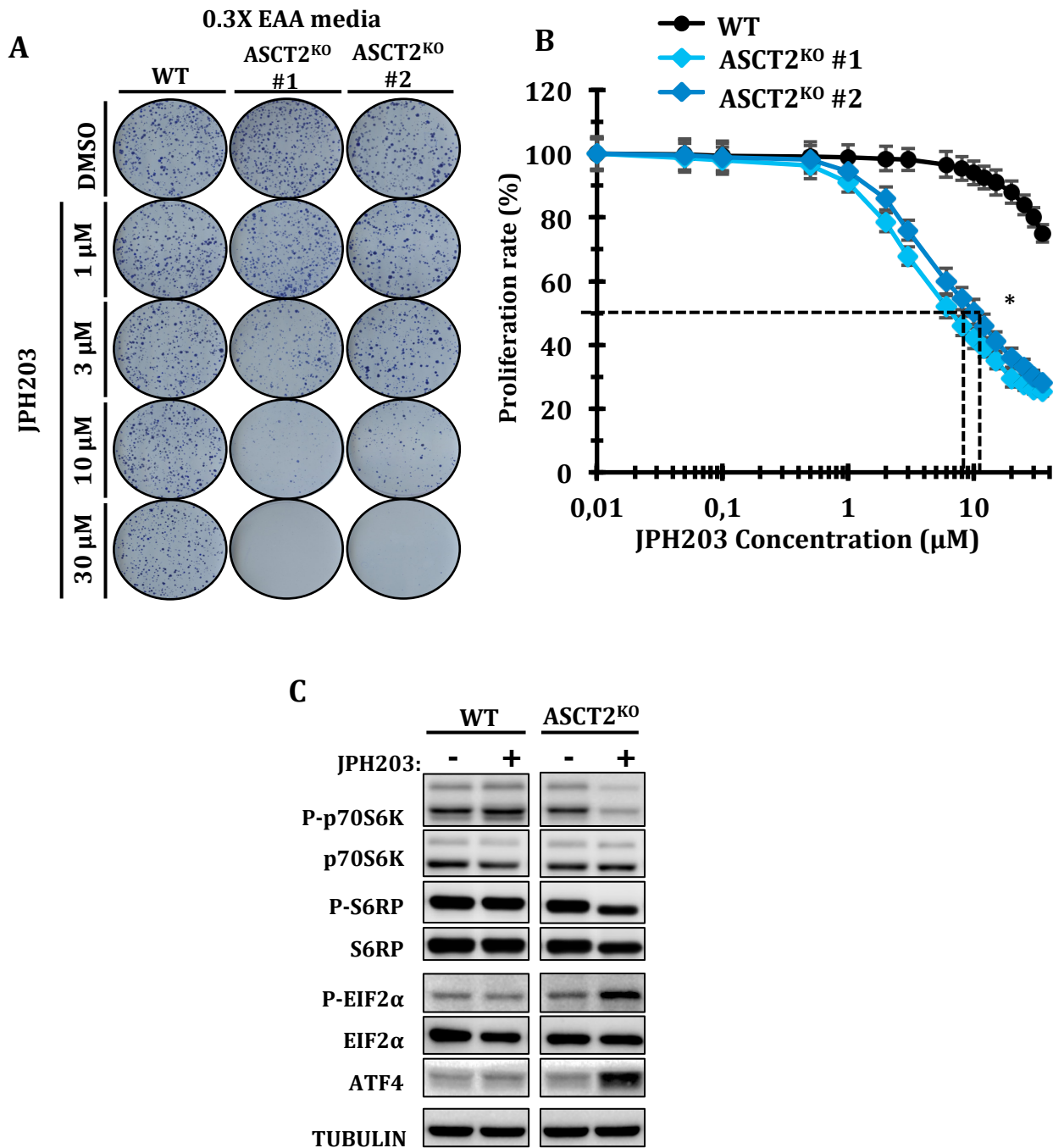


Figure 4 : L'invalidation génétique d'ASCT2 sensibilise les cellules LS174T au JPH203

A: Croissance clonale des cellules LS174T WT et ASCT2^{KO} (#1 et #2). Les cellules ont été cultivées 15 jours dans un milieu DMEM 0.3X EAA et traitées avec du DMSO ou différentes concentrations en inhibiteur de LAT1 (JPH203) avec changement du milieu tous les 3 jours. Au bout des 15 jours les cellules sont colorées pour visualisation à l'aide de GIEMSA. **B:** Analyse de la dose réponse au JPH203 des cellules LS174T WT et ASCT2^{KO} (#1 et #2). Les cellules sont cultivées 3 jours en milieu DMEM 0.3X EAA contenant différentes concentrations de JPH203 et les cellules sont comptées pour déterminer le niveau de prolifération (exprimé en pourcentage). **C:** Les activités des voies de signalisation GCN2 (p-EIF2α et ATF4) et mTORC1 (P-p70S6K et P-S6RP) ont été analysées par westernblot dans les cellules LS174T WT, ASCT2^{KO} traitées ou non avec 15μM de JPH203. TUBULIN a été utilisé comme contrôle de charge. * = P < 0,05, n.s = non significatif.

substrat 'moteur' des imports *via* LAT1. Egalement, ASCT2 est capable de transporter la sérine, un acide aminé essentiel à la croissance de nombreux type de tumeurs. Il sera donc nécessaire de réitérer cette expérience avec un nombre de souris suffisant pour obtenir des résultats statistiques mais également de compléter nos résultats à l'aide d'analyses histologiques, biochimiques et moléculaires de ces tumeurs afin de déterminer quelles sont les causes exactes de la réduction de croissance des tumeurs ASCT2^{KO}.

L'invalidation génétique d'ASCT2 sensibilise les cellules LS174T à l'inhibiteur de LAT1 : le JPH203.

Afin de poursuivre l'étude du couplage fonctionnel ASCT2 ::LAT1, nous avons souhaité étudier l'effet de l'inhibition combinée de ces deux transporteurs ; pour ce faire, nous avons utilisé l'inhibiteur spécifique de LAT1, le JPH203. De façon intéressante, l'utilisation de 10 μ M de JPH203 est suffisante pour diminuer de 50% la prolifération des cellules ASCT2^{KO} tandis que cette dose n'a que très peu d'effet sur les cellules WT (Fig. 4A, B). Cette diminution de prolifération est associée à une chute de l'activité mTORC1 ainsi que l'induction de la voie GCN2 (représentée ici par la phosphorylation d'eIF2 et l'expression d'ATF4) (Fig. 4C). Ces résultats montrant que l'invalidation d'ASCT2 sensibilise les cellules LS174T au JPH203 plaident en faveur d'un couplage fonctionnel entre ces 2 échangeurs transmembranaires d'acide aminés.

Conclusion

A l'heure actuelle notre étude reste incomplète et nécessite des expériences supplémentaires afin d'expliquer et confirmer ces résultats avec une lignée indépendante. Cependant, notre travail suggère que les cellules LS174T sont bien dépendantes de la glutamine pour l'activation de mTORC1 par LAT1 (Figure 2C) mais que ASCT2 n'est pas essentiel à ce mécanisme ou du moins que son abolition est potentiellement compensée par l'expression d'autres transporteurs tels que les SNATs. Cependant, nos résultats démontrant que les cellules invalidées pour ASCT2 sont plus sensibles au JPH203, un inhibiteur de LAT1, tendent à confirmer qu'il existe une relation fonctionnelle entre LAT1 et ASCT2. De ce fait, notre étude nous permet ainsi de nuancer le modèle de couplage fonctionnel proposé par Nicklin *et al.* et suggère que ce modèle nécessite l'implication potentielle d'autres acteurs tels que les transporteurs SNATs.

Nous avons récemment réalisé l'inactivation d'ASCT2 dans une lignée de carcinome pulmonaire (A549). Ce nouveau modèle cellulaire va nous permettre soit de valider les conclusions présentées ici ou au contraire de renforcer le modèle de couplage ASCT2::LAT1 en fonction du contexte tumoral.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Le microenvironnement tumoral est extrêmement dynamique et en perpétuelle évolution. Au cours de son développement, la tumeur doit faire face à des conditions drastiques tels que le développement de zone hypoxiques dépourvues en nutriments et doit s'adapter, dans pour survivre et proliférer, à maintenir un métabolisme actif (McCracken and Edinger 2013, Parks, Cormerais et al. 2016). Par ailleurs la survie tumorale en milieu hostile s'accompagne par la sécrétion de molécules pro-angiogéniques favorisant le développement d'un réseau vasculaire tumoral chaotique permettant néanmoins un apport accru de nutriments facilitant son expansion (Brahimi-Horn, Chiche et al. 2007). Durant ces 20 dernières années, les connaissances fondamentales sur la biologie vasculaire ont rapidement explosé permettant le développement de molécules anti-angiogéniques devant supprimer la croissance tumorale par la suppression des apports nutritifs. Aujourd'hui, ces molécules sont considérées comme un des traitements anticancéreux de référence dans de nombreux types de cancers mais malheureusement, les effets bénéfiques pour les patients restent très limités avec l'apparition de nombreux mécanismes de résistance (Welti, Loges et al. 2013).

Dans le but de développer des stratégies alternatives basées sur cette même idée conductrice de supprimer les apports nutritifs aux cellules tumorales, notre laboratoire ainsi que de nombreux autres dans le monde se sont intéressés au potentiel thérapeutique que représentent les transporteurs de nutriments essentiels (Ganapathy, Thangaraju et al. 2009, McCracken and Edinger 2013). Certains transporteurs sont largement surexprimés dans les cancers à développement rapide et certains tels que les transporteurs de glucose GLUTs sont déjà utilisés de façon indirecte en clinique comme outils diagnostique avec l'utilisation du dérivé radioactif du glucose, le ^{18}F -deoxyglucose, dans la technique de PET scan. Lors de ma thèse je me suis plus particulièrement intéressé aux transporteurs d'acides aminés, nutriments absolument essentiels à la croissance tumorale (Tsun and Possemato 2015). Parmi la trentaine de transporteurs d'acides aminés exprimés chez l'homme (Broer 2002, Makrides, Camargo et al. 2014), trois antiporteurs ont été décrit comme jouant un rôle fondamental dans la croissance et l'agressivité tumorale : les complexe CD98/LAT1, CD98/xCT et ASCT2 (cf. Introduction Chapitre II Partie 2).

Mon objectif de thèse a été de re-évaluer les activités pro-tumorales décrites pour les membres du complexe multifonctionnel CD98/LAT1. Dans un premier temps, j'ai démontré que l'inactivation génétique ou pharmacologique de LAT1 dans diverses lignées tumorales perturbe l'homéostasie des acides aminés ce qui se traduit par l'induction de l'axe de signalisation GCN2-eIF2-ATF4, une chute d'activité mTORC1 et l'abolition de la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo*. Contrairement aux idées développées dans la littérature, l'inactivation génétique de CD98, bien que conduisant à une forte réduction de l'activité de transport LAT1, ne présente aucun phénotype détectable. De plus, l'inhibition de l'activité résiduelle de LAT1 des cellules invalidées pour CD98 supprime totalement leur prolifération démontrant ainsi que LAT1 est l'élément pro-tumoral clé de l'hétéro-dimère et place ce transporteur comme cible thérapeutique à fort potentiel. Cependant, bien que répondant à une question longuement débattue dans la littérature, mes résultats laissent plusieurs questions en suspens. Cette partie sera donc consacrée à la discussion de ces interrogations ainsi qu'à la proposition de différentes idées permettant d'y répondre et de révéler totalement le potentiel thérapeutique que représente le ciblage de LAT1 dans la lutte contre le cancer.

Le transporteur LAT1 est-il une cible thérapeutique physiologiquement viable ?

Mes résultats de thèse m'ont permis de clairement placer LAT1 comme une cible thérapeutique à fort potentiel capable d'inhiber très fortement la progression tumorale. Cependant, les différentes approches expérimentales utilisées dans notre étude (*in vitro* et xénogreffe de cellules *KO in vivo*) ne nous ont pas permis d'étudier les effets délétères potentiels que pourrait avoir une inhibition de LAT1 sur les tissus sains de l'organisme. En effet, il a été démontré que l'inactivation génétique de LAT1 chez la souris était létale au stade embryonnaire démontrant le rôle essentiel de ce transporteur au cours du développement. De plus, une étude a suggéré un rôle critique de LAT1 au niveau du cerveau en permettant le transport et le maintien de l'homéostasie des acides aminés au travers la barrière hémato-encéphalique (Dolgodilina, Imobersteg et al. 2015). Également, LAT1 a été caractérisé comme transporteur des hormones thyroïdienne (Zevenbergen, Meima et al. 2015), molécules de signalisation essentielles à la régulation de l'activité et du métabolisme de nombreux organes tels que le cerveau, les muscles ou le cœur. Il apparaît essentiel d'étudier les effets néfastes que pourrait entraîner

l'inhibition de LAT1 chez l'homme avant de valider cette stratégie de ciblage de LAT1 pour le traitement des cancers. De façon intéressante, lors d'une étude pilote menée au laboratoire visant à étudier l'efficacité du JPH203 *in vivo* nous avons pu observer un changement comportemental chez les souris traitées au JPH203 comparées au groupe contrôle. Ces souris présentaient un état de stress important avec une augmentation de l'agitation, de l'agressivité ainsi qu'une tendance à fuir la main de l'expérimentateur par tous les moyens (les souris courent, sautent et cherchent à se cacher). Nous avons également noté un changement de posture avec la queue constamment en position courbée en l'air. Bien entendu, je reste conscient que ces observations restent très préliminaires et que je ne suis pas un expert dans l'étude comportementale des modèles animaux, toutefois, ces résultats suggèrent un effet indésirable du JPH203 chez la souris. Il reste possible que cette modification comportementale soit indépendante de l'inhibition de LAT1, en effet il n'est pas rare qu'un inhibiteur soit capable de toucher plusieurs cibles cellulaires, cependant la génération de modèles murins présentant une invalidation conditionnelle de LAT1 dans différents organes tels que la barrière hémato-encéphalique nous permettrait de clairement déterminer les effets physiologiques que peut avoir l'inhibition de LAT1 chez l'adulte.

LAT1 un transporteur pour deux protéines chaperons ?

Un résultat surprenant obtenu lors de mon travail de thèse fut l'obtention de cellules invalidées pour CD98 ne présentant pas d'altération de croissance. En effet, ces cellules, bien que démontrant une diminution de l'activité de LAT1 de l'ordre de 90%, présentent une activité mTORC1 et une croissance tumorale semblables aux cellules WT. J'ai testé l'hypothèse selon laquelle ces cellules auraient acquis l'expression d'un autre transporteur tel que SLC6A14 qui est capable de transporter les mêmes acides aminés que LAT1 (Karunakaran, Ramachandran et al. 2011, Babu, Bhutia et al. 2015). Cependant, je n'ai pas pu observer de modification de son expression dans les modèles cellulaires de mon étude. A l'inverse, nous avons démontré que ces cellules invalidées pour CD98 sont dépendantes d'une activité résiduelle de LAT1 puisque son invalidation génétique ou pharmacologique est suffisante pour supprimer l'activité mTORC1 et la croissance tumorale. De façon intéressante, une étude récente du laboratoire du Dr. Rotin a démontré que le complexe LAT1/CD98 était également capable de se complexer avec la protéine LAPTM4b entraînant ainsi sa relocalisation au niveau de la surface du

lysosome, une augmentation du transport de leucine dans le lysosome et l'activation de mTORC1 (Milkereit, Persaud et al. 2015). Cette étude ne définit pas clairement le rôle de CD98 dans ce mécanisme, il est donc possible que LAT1 soit le premier transporteur d'acides aminés possédant deux protéines chaperons indépendantes contrôlant sa localisation avec CD98 pour la membrane plasmique et LAPTM4b pour la membrane du lysosome. De ce fait, si cette hypothèse est correcte, l'invalidation de CD98 dans nos cellules aurait permis le maintien de l'activité mTORC1 et la croissance tumorale en favorisant la relocalisation de LAT1 au niveau du lysosome par l'intermédiaire de LAPTM4b. Cette idée est notamment soutenue par mes résultats ainsi que ceux d'une autre étude indépendante démontrant que l'invalidation de CD98 dans une lignée cellulaire de cancer du poumon (A549) ainsi que des fibroblastes embryonnaires de souris entraîne une augmentation de la signalisation mTORC1 (de la Ballina, Cano-Crespo et al. 2016). Cependant, une étude plus approfondie par microscopie confocale de la localisation subcellulaire de LAT1 et LAPTM4b au sein des cellules invalidés pour CD98 sera nécessaire afin de confirmer cette hypothèse.

Peut-on potentialiser l'effet de l'inhibition de LAT1 ?

Il est également important de noter que la suppression de l'activité de LAT1 *in vitro* et *in vivo* ne présente qu'un effet cytotatique. En effet, contrairement à ce qu'il a été récemment publié dans un modèle de lymphome T (Rosilio, Nebout et al. 2015), l'invalidation génétique ou pharmacologique de LAT1 dans toutes les lignées de tumeur solide que nous avons testées n'entraîne pas de mort cellulaire. De plus, les cellules invalidées pour LAT1 sont capables de former des tumeurs *in vivo*. Ces résultats démontrent que l'utilisation d'une stratégie visant uniquement à inhiber LAT1 ne ferait que ralentir la progression tumorale et une interruption du traitement entrainerait la reprise rapide de la croissance. De ce fait, étant conscient qu'une drogue cytotatique ne représente pas une stratégie curative optimale pour le traitement du cancer, j'ai étudié les effets synergiques potentiels entre inhibition de LAT1 et l'utilisation d'autres drogues afin d'obtenir un effet cytotoxique. Ma première idée fut d'étudier une potentielle synergie entre l'invalidation de LAT1 et l'inhibition d'autres mécanismes cellulaires servant au maintien du pool intracellulaire d'acides aminés : l'autophagie et le protéasome. Cependant, l'utilisation de Chloroquine et de Bafilomycine, deux inhibiteurs de l'autophagie ainsi que de MG132 et de Bortezomib, deux inhibiteurs du

protéasome, ne m'a pas permis de démontrer une sensibilité accrue à ces traitements dans les cellules invalidées pour LAT1. De façon similaire, l'utilisation de drogues touchants d'autres cibles indépendantes du pool d'acides aminés tels que la tunicamycine (inhibiteur de la glycosylation), le sunitinib (inhibiteur des récepteurs tyrosine kinase) ou encore le cisplatine (agent alkylant capable d'inhiber la réplication de l'ADN) n'ont également démontré aucun effet synergique avec l'inactivation génétique de LAT1. Ces résultats furent pour moi une réelle frustration lors de ma thèse, cependant il est tout à fait possible que l'utilisation de lignées cellulaires génétiquement invalidées pour LAT1 présente un biais expérimental. En effet, ces cellules présentent un stress chronique d'inhibition de LAT1 avec une expression constitutive d'ATF4 ainsi que l'inhibition de mTORC1. Comme nous l'avons vu dans l'Introduction Chapitre 2 Partie 3, l'induction de la voie GCN2 ainsi que l'inhibition de mTORC1 sont capables d'induire un état cytoprotecteur pour la cellule en modifiant le métabolisme et en induisant un programme transcriptionnel d'adaptation aux stress cellulaires. Il est donc possible que ces cellules soient adaptées et préprogrammées pour résister à ces différentes drogues. De ce fait, il sera important pour moi de répéter ces différentes combinaisons en utilisant le JPH203 plutôt que nos cellules invalidées génétiquement pour LAT1. Ceci permettra une inhibition spontanée de LAT1 et l'induction d'un stress aigu qui permettra de potentiellement révéler certains effets synergiques et cytotoxiques.

Parallèlement à ces tests de combinaison de drogue, il serait également intéressant d'évaluer l'implication des voies de signalisation GCN2 et mTORC1 dans la survie des cellules invalidées pour LAT1. L'inhibition de mTORC1 en période de carence en nutriment est un mécanisme protecteur pour les cellules. En effet, une diminution d'activité mTORC1 dans ce contexte permet une réduction de la synthèse protéique qui permettra de limiter la consommation en acides aminés et en énergie et ainsi permettre la survie cellulaire. Egalement, une réduction d'activité mTORC1 permet l'activation de l'autophagie (Cf : Introduction Chapitre I Partie 4.1.5) ainsi que de la macropinocytose dans certains types de cancers (Cf : Introduction Chapitre II Partie 3.2) ce qui permet l'apport d'acides aminés à partir de la dégradation de protéines intra- et extracellulaires. Il est donc logique de supposer que l'inhibition de mTORC1 en réponse au JPH203, bien que réduisant fortement la croissance tumorale, puisse permettre la survie et la résistance des cellules tumorales *via* l'autophagie et la macropinocytose. De plus, différentes études utilisant des cellules normales ou transformées invalidées pour le

complexe TSC (présentant donc une activation constitutive de mTORC1) ont démontré que l'activation de mTORC1 en période de carence en glucose conduit à la mort cellulaire (Lee, Inoki et al. 2007, Choo, Kim et al. 2010, Ng, Leprivier et al. 2012). De la même façon, une autre étude a suggéré que l'inactivation de Sestrin2 (ce qui rend l'activité mTORC1 insensible à la chute de concentration en leucine) entraîne la mort cellulaire de fibroblastes embryonnaires de souris en cas de carence de cet acide aminé (Ye, Palm et al. 2015). Bien que cette dernière étude ait été réalisée sur des cellules non-transformées, il est fort probable que, comme pour le glucose, ce mécanisme cytoprotecteur d'inactivation de mTORC1 en cas de carence en acides aminés soit conservé dans certains types de cancer. De façon intéressante, il a été montré chez certains patients ainsi dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses, la présence de différentes mutations du complexe GATOR1 conduisant à une activation de mTORC1 indépendante de la disponibilité des acides aminés (Bar-Peled, Chantranupong et al. 2013). De ce fait l'utilisation de ces différents modèles pourrait donc permettre : 1) De confirmer ou d'infirmer le rôle protecteur de l'inhibition de mTORC1 en réponse à l'inactivation génétique et pharmacologique de LAT1, 2) Si mon hypothèse est correcte, de mettre en évidence un facteur pronostic ainsi qu'une nouvelle stratégie thérapeutique visant à potentialiser l'efficacité anti tumorale du JPH203 *via* le maintien de l'activité mTORC1.

De la même façon, l'étude de l'implication de la voie GCN2-eIF2-ATF4 dans la l'adaptation et la survie des cellules inhibées pour LAT1 pourrait se révéler de première importance. En effet, il a été démontré que cet axe de signalisation est capable d'augmenter l'apport d'acides aminés en période de carence notamment en induisant l'expression de différents transporteurs tels que LAT1. De façon comparable, mes résultats démontrent une surexpression de LAT1 concordant avec l'activation de la voie de signalisation GCN2-eIF2-ATF4 en réponse à un traitement au JPH203 et ceci dans 6 lignées cellulaires cancéreuses indépendantes (Cf : Résultats Publication figure S4). Il est donc fortement possible que l'activation de la voie GCN2-eIF2-ATF4 soit responsable de la surexpression de LAT1 en réponse au JPH203 et de ce fait de la résistance de ces cellules à de plus faibles concentrations de cette drogue. Ainsi l'inhibition de GCN2 ou d'ATF4 devrait permettre de potentialiser les effets du JPH203.

Couplage fonctionnel de ASCT2 et LAT1, un modèle incomplet.

Lors de la seconde partie de ma thèse je me suis intéressé avec Pierre-André Massard au couplage fonctionnel entre ASCT2 et LAT1 qui avait déjà été proposé par Nicklin et *al.* en 2009. Ce modèle largement accepté dans la littérature malgré le fait qu'il n'ait jamais été reproduit, propose que ASCT2 *via* le transport de glutamine, faciliterait l'entrée de leucine *via* LAT1 et de ce fait l'activation du complexe mTORC1. Cependant, même si notre étude reste incomplète et que plusieurs questions restent en suspens, nos résultats remettent en question ce modèle d'interaction fonctionnelle. En effet, bien que présentant une réduction de transport de glutamine d'environ 50% (Projet en cours, Figure 1B), les LS174T invalidée pour ASCT2 ne démontrent aucune réduction de transport de leucine (Projet en cours, Figure 1D), d'activité mTORC1 (Projet en cours, Figure 2A) et de prolifération (Figure 3A,B) *in vitro*. De plus, nous avons également confirmé que les cellules LS174T WT et ASCT2^{KO} restent dépendantes d'une entrée de glutamine précédant l'entrée de leucine pour permettre l'activation de mTORC1 par la leucine (Figure 2C). Ces résultats suggèrent donc que d'autres transporteurs de glutamine sont exprimés au sein des cellules LS174T et que ceux-ci sont capables de maintenir le transport de glutamine et l'activité de LAT1. Dans cette optique nous avons détecté une forte expression de l'ARNm de deux transporteurs de glutamine SNAT1 et SNAT2 par les cellules LS174T qui pourraient être responsable du maintien de l'activité mTORC1 et de la croissance. Il est probable que les différences entre nos conclusions et celles apportées par les travaux de Nicklin et ses collègues soient causées par la différence de modèle cellulaire. En effet, il est possible que les cellules HeLa qu'ils ont utilisées dans leur étude n'expriment pas de transporteurs de glutamine capables de prendre le relais d'ASCT2 et de maintenir l'activité de LAT1 expliquant ainsi la dépendance spécifique de ces cellules à ASCT2.

De façon intéressante une publication du laboratoire du Dr. Broer publiée il y a 2 mois démontre que l'inactivation d'ASCT2 ne perturbe pas la prolifération et l'activité mTORC1 dans une lignée cellulaire d'ostéosarcome (143B)(Broer, Rahimi et al. 2016). A l'inverse, la suppression d'ASCT2 cause la surexpression de SNAT1 par l'intermédiaire de l'induction de la voie GCN2 permettant ainsi le maintien du transport de glutamine et la prolifération cellulaire. Ces résultats sont (en partie) en concordance avec notre étude, puisque l'inactivation d'ASCT2 dans les LS174T n'altère pas l'activation mTORC1 et la prolifération. Cependant, nous n'avons observé aucune induction de la voie GCN2 ou de l'expression de SNAT1 dans les cellules LS174T invalidées pour ASCT2 dans notre

modèle. Il est possible que l'expression basale de SNAT1 dans notre modèle cellulaire soit déjà suffisante pour maintenir le transport de glutamine et de ce fait aucun stress n'affecte les LS174T ASCT2^{KO}. Ces différences entre notre étude et les travaux cités ci-dessus suggèrent donc que l'expression ainsi que la régulation des différents transporteurs de glutamine sont strictement dépendants du type cellulaire. Ainsi, cela confirme que le modèle de couplage fonctionnel entre ASCT2 et LAT1 proposé par Nicklin est incomplet ou 'contexte-dépendent' puisque l'inactivation d'ASCT2 ne perturbe pas l'activité mTORC1 et la croissance cellulaire de deux lignées tumorales. Cependant, nos résultats démontrent également que la sensibilité des cellules LS174T ASCT2^{KO} au JPH203 est significativement augmentée *in vitro*. Ce qui confirme que, bien que n'étant pas nécessaire à l'activité de LAT1, il existe une certaine interaction fonctionnelle entre LAT1 et ASCT2. Ces résultats sont d'un intérêt majeur en vue de l'utilisation du JPH203 et d'autres inhibiteurs de LAT1 comme traitement thérapeutique. En effet, notre travail suggère que le niveau d'expression d'ASCT2 pourrait être un facteur pronostic de l'efficacité de ces drogues. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur d'ASCT2 combiné au JPH203 permettrait de potentialiser l'efficacité de ce dernier et donc d'utiliser de plus faible dose d'inhibiteur de LAT1 et de limiter ses potentiels effets indésirables sur les tissus sains.

Des investigations complémentaires concernant nos résultats de croissance tumorale *in vivo* sont également nécessaires. En effet, bien que le faible nombre d'animaux utilisé dans cette expérience ne nous permet pas d'avoir des résultats statistiquement significatifs, nos résultats suggèrent que l'inactivation génétique d'ASCT2 réduit la croissance tumorale de 50%. Cette différence avec nos résultats obtenus *in vitro* est probablement causée par le fait que la croissance tumorale *in vivo* intègre des paramètres physiologiques potentiellement capables d'altérer la croissance des tumeurs ASCT2^{KO} tels que les gradients d'oxygène et de nutriments (glucose, acides aminés). Également, à l'inverse d'ASCT2, l'activité des transporteurs SNATs est sensible à une baisse de pH extracellulaire (Mackenzie and Erickson 2004). De ce fait, s'il est vrai que les transporteurs SNATs sont responsables du maintien du transport de glutamine des cellules ASCT2^{KO}, il est possible que les phénomènes d'acidose tumorale présents dans toutes les tumeurs hautement glycolytiques (Parks, Chiche et al. 2013) perturbent fortement leur activité *in vivo*. Ainsi, cela limiterait leur capacité à compenser l'inactivation d'ASCT2 *in vivo*. De ce fait, contrairement aux

conclusions obtenues *in vitro*, il est possible que ASCT2 joue un rôle essentiel dans la croissance tumorale en permettant le maintien du transport de glutamine en période d'acidose. Cependant, il sera nécessaire dans un premier temps de reproduire notre expérience de croissance tumorale avec un nombre plus important d'animaux afin de confirmer nos résultats préliminaires. Dans un second temps, si nos conclusions concernant la chute de croissance tumorale *in vivo* causée par l'inactivation de ASCT2 se confirment, plusieurs expériences telles que l'étude biochimique et histologique des tumeurs ainsi que l'utilisation de conditions de culture cellulaire *in vitro* permettant de mimer les différentes conditions physiologique (hypoxie, faible concentration en nutriment, acidose) seront nécessaires. Ces différentes expériences nous permettront ainsi d'identifier les véritables raisons de ces différences entre nos résultats obtenus *in vitro* et *in vivo*. Cette étude devrait à terme nous permettre de mieux pleinement comprendre le rôle potentiel d'ASCT2 dans la croissance tumorale *in vivo*, facteur manquant dans les deux études discutées précédemment.

Conclusion générale

L'ensemble de mon travail de thèse a permis de confirmer l'idée selon laquelle le ciblage des transporteurs d'acides aminés surexprimés dans les cancers tels que LAT1 et potentiellement ASCT2 représente une stratégie thérapeutique prometteuse pour le traitement des cancers. En effet, l'inhibition génétique ou pharmacologique de ces transporteurs conduit à l'arrêt de la croissance tumorale notamment en perturbant l'homéostasie des acides aminés ainsi que différentes voies de signalisation dépendantes de ces nutriments (GCN2 et mTORC1). Au cours de ces dernières années l'étude des transporteurs d'acides aminés en tant que cible thérapeutique est devenu un sujet en plein essor (Ganapathy, Thangaraju et al. 2009, McCracken and Edinger 2013, Bhutia, Babu et al. 2015, Selwan, Finicle et al. 2016). Plusieurs inhibiteurs pharmacologiques ciblant ces transporteurs tels que le JPH203 ont été développés et apportent des résultats prometteurs dans différents modèles d'études précliniques (Bhutia, Babu et al. 2015). Pourtant à ce jour, seuls le JPH203 et la sulfasalazine (inhibiteur de xCT) sont actuellement testés en clinique pour le traitement des cancers. Malgré cela, compte tenu de la nécessité croissante de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de compenser les échecs rencontrés par les traitements actuels, il est probable que l'intérêt

pour le développement d'agents inhibiteurs des transporteurs d'acides aminés
connaisse une croissance exponentielle dans les années à venir.

REFERENCES

Aboul-Fadl, T., S. S. Al-Hamad, K. Lee, N. Li, B. D. Gary, A. B. Keeton, G. A. Piazza and M. K. Abdel-Hamid (2014). "Novel non-cyclooxygenase inhibitory derivatives of naproxen for colorectal cancer chemoprevention." Medicinal Chemistry Research **23**(9): 4177-4188.

Aggarwal, D., M. L. Fernandez and G. A. Soliman (2006). "Rapamycin, an mTOR inhibitor, disrupts triglyceride metabolism in guinea pigs." Metabolism **55**(6): 794-802.

Ait Ghezala, H., B. Jolles, S. Salhi, K. Castrillo, W. Carpentier, N. Cagnard, A. Bruhat, P. Fafournoux and O. Jean-Jean (2012). "Translation termination efficiency modulates ATF4 response by regulating ATF4 mRNA translation at 5' short ORFs." Nucleic Acids Res **40**(19): 9557-9570.

Anthony, T. G., B. J. McDaniel, R. L. Byerley, B. C. McGrath, D. R. Cavener, M. A. McNurlan and R. C. Wek (2004). "Preservation of liver protein synthesis during dietary leucine deprivation occurs at the expense of skeletal muscle mass in mice deleted for eIF2 kinase GCN2." J Biol Chem **279**(35): 36553-36561.

Arias, E., H. Koga, A. Diaz, E. Mocholi, B. Patel and A. M. Cuervo (2015). "Lysosomal mTORC2/PHLPP1/Akt Regulate Chaperone-Mediated Autophagy." Mol Cell **59**(2): 270-284.

B'Chir, W., C. Chaveroux, V. Carraro, J. Averous, A. C. Maurin, C. Jousse, Y. Muranishi, L. Parry, P. Fafournoux and A. Bruhat (2014). "Dual role for CHOP in the crosstalk between autophagy and apoptosis to determine cell fate in response to amino acid deprivation." Cell Signal **26**(7): 1385-1391.

B'Chir, W., A. C. Maurin, V. Carraro, J. Averous, C. Jousse, Y. Muranishi, L. Parry, G. Stepien, P. Fafournoux and A. Bruhat (2013). "The eIF2alpha/ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression." Nucleic Acids Res **41**(16): 7683-7699.

Babu, E., Y. D. Bhutia, S. Ramachandran, J. P. Gnanaprakasam, P. D. Prasad, M. Thangaraju and V. Ganapathy (2015). "Deletion of the amino acid transporter Slc6a14 suppresses tumour growth in spontaneous mouse models of breast cancer." Biochem J **469**(1): 17-23.

Ballif, B. A., P. P. Roux, S. A. Gerber, J. P. MacKeigan, J. Blenis and S. P. Gygi (2005). "Quantitative phosphorylation profiling of the ERK/p90 ribosomal S6 kinase-signaling cassette and its targets, the tuberous sclerosis tumor suppressors." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(3): 667-672.

Bandyopadhyay, U., S. Sridhar, S. Kaushik, R. Kiffin and A. M. Cuervo (2010). "Identification of regulators of chaperone-mediated autophagy." Mol Cell **39**(4): 535-547.

Bannai, S., H. Sato, T. Ishii and Y. Sugita (1989). "Induction of cystine transport activity in human fibroblasts by oxygen." J Biol Chem **264**(31): 18480-18484.

Bannai, S. and N. Tateishi (1986). "Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals." J Membr Biol **89**(1): 1-8.

Bar-Peled, L., L. Chantranupong, A. D. Cherniack, W. W. Chen, K. A. Ottina, B. C. Grabiner, E. D. Spear, S. L. Carter, M. Meyerson and D. M. Sabatini (2013). "A Tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1." Science **340**(6136): 1100-1106.

Bar-Peled, L., L. D. Schweitzer, R. Zoncu and D. M. Sabatini (2012). "Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1." Cell **150**(6): 1196-1208.

Bassi, M. T., E. Gasol, M. Manzoni, M. Pineda, M. Riboni, R. Martin, A. Zorzano, G. Borsani and M. Palacin (2001). "Identification and characterisation of human xCT that co-expresses, with 4F2 heavy chain, the amino acid transport activity system xc." Pflugers Arch **442**(2): 286-296.

Bellacosa, A., C. C. Kumar, A. Di Cristofano and J. R. Testa (2005). "Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting." Adv Cancer Res **94**: 29-86.

Ben-Sahra, I., J. J. Howell, J. M. Asara and B. D. Manning (2013). "Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1." Science **339**(6125): 1323-1328.

Ben-Sahra, I., G. Hoxhaj, S. J. Ricoult, J. M. Asara and B. D. Manning (2016). "mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle." Science **351**(6274): 728-733.

Ben Sahra, I., C. Regazzetti, G. Robert, K. Laurent, Y. Le Marchand-Brustel, P. Auberger, J. F. Tanti, S. Giorgetti-Peraldi and F. Bost (2011). "Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1." Cancer Res **71**(13): 4366-4372.

Betsunoh, H., T. Fukuda, N. Anzai, D. Nishihara, T. Mizuno, H. Yuki, A. Masuda, Y. Yamaguchi, H. Abe, M. Yashi, Y. Fukabori, K. Yoshida and T. Kamai (2013). "Increased expression of system large amino acid transporter (LAT)-1 mRNA is associated with invasive potential and unfavorable prognosis of human clear cell renal cell carcinoma." BMC Cancer **13**: 509.

Bhaskar, P. T. and N. Hay (2007). "The two TORCs and Akt." Dev Cell **12**(4): 487-502.

Bhutia, Y. D., E. Babu, S. Ramachandran and V. Ganapathy (2015). "Amino Acid transporters in cancer and their relevance to "glutamine addiction": novel targets for the design of a new class of anticancer drugs." Cancer Res **75**(9): 1782-1788.

Biondi, R. M., A. Kieloch, R. A. Currie, M. Deak and D. R. Alessi (2001). "The PIF-binding pocket in PDK1 is essential for activation of S6K and SGK, but not PKB." EMBO J **20**(16): 4380-4390.

Blum, D., H. Hao, M. McCarthy and B. Reproducibility Project: Cancer (2015). "Registered report: transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc." Elife **4**.

Brachmann, S., C. Fritsch, S. M. Maira and C. Garcia-Echeverria (2009). "PI3K and mTOR inhibitors: a new generation of targeted anticancer agents." Curr Opin Cell Biol **21**(2): 194-198.

Brachmann, S. M., I. Hofmann, C. Schnell, C. Fritsch, S. Wee, H. Lane, S. Wang, C. Garcia-Echeverria and S. M. Maira (2009). "Specific apoptosis induction by the dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 in HER2 amplified and PIK3CA mutant breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(52): 22299-22304.

Brahimi-Horn, M. C., J. Chiche and J. Pouyssegur (2007). "Hypoxia and cancer." J Mol Med (Berl) **85**(12): 1301-1307.

Broer, A., F. Rahimi and S. Broer (2016). "Deletion of Amino Acid Transporter ASCT2 (SLC1A5) Reveals an Essential Role for Transporters SNAT1 (SLC38A1) and SNAT2 (SLC38A2) to Sustain Glutaminolysis in Cancer Cells." J Biol Chem.

Broer, S. (2002). "Adaptation of plasma membrane amino acid transport mechanisms to physiological demands." Pflugers Arch **444**(4): 457-466.

Broer, S. and N. Brookes (2001). "Transfer of glutamine between astrocytes and neurons." J Neurochem **77**(3): 705-719.

Bunpo, P., A. Dudley, J. K. Cundiff, D. R. Cavener, R. C. Wek and T. G. Anthony (2009). "GCN2 protein kinase is required to activate amino acid deprivation responses in mice treated with the anti-cancer agent L-asparaginase." J Biol Chem **284**(47): 32742-32749.

Burdo, J., R. Dargusch and D. Schubert (2006). "Distribution of the cystine/glutamate antiporter system xc⁻ in the brain, kidney, and duodenum." J Histochem Cytochem **54**(5): 549-557.

Cai, S. L., A. R. Tee, J. D. Short, J. M. Bergeron, J. Kim, J. Shen, R. Guo, C. L. Johnson, K. Kiguchi and C. L. Walker (2006). "Activity of TSC2 is inhibited by AKT-mediated phosphorylation and membrane partitioning." J Cell Biol **173**(2): 279-289.

Cairns, R. A., I. S. Harris and T. W. Mak (2011). "Regulation of cancer cell metabolism." Nat Rev Cancer **11**(2): 85-95.

Calnan, D. R. and A. Brunet (2008). "The FoxO code." Oncogene **27**(16): 2276-2288.

Cantor, J. M. and M. H. Ginsberg (2012). "CD98 at the crossroads of adaptive immunity and cancer." J Cell Sci **125**(Pt 6): 1373-1382.

Carracedo, A., L. Ma, J. Teruya-Feldstein, F. Rojo, L. Salmena, A. Alimonti, A. Egia, A. T. Sasaki, G. Thomas, S. C. Kozma, A. Papa, C. Nardella, L. C. Cantley, J. Baselga and P. P. Pandolfi (2008). "Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer." J Clin Invest **118**(9): 3065-3074.

Carriere, A., M. Cargnello, L. A. Julien, H. Gao, E. Bonneil, P. Thibault and P. P. Roux (2008). "Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation." Curr Biol **18**(17): 1269-1277.

Carriere, A., Y. Romeo, H. A. Acosta-Jaquez, J. Moreau, E. Bonneil, P. Thibault, D. C. Fingar and P. P. Roux (2011). "ERK1/2 phosphorylate Raptor to promote Ras-dependent activation of mTOR complex 1 (mTORC1)." J Biol Chem **286**(1): 567-577.

Castilho, B. A., R. Shanmugam, R. C. Silva, R. Ramesh, B. M. Himme and E. Sattlegger (2014). "Keeping the eIF2 alpha kinase Gcn2 in check." Biochim Biophys Acta **1843**(9): 1948-1968.

Chakrabarti, P., T. English, J. Shi, C. M. Smas and K. V. Kandror (2010). "Mammalian target of rapamycin complex 1 suppresses lipolysis, stimulates lipogenesis, and promotes fat storage." Diabetes **59**(4): 775-781.

Chakrabarti, P., J. Y. Kim, M. Singh, Y. K. Shin, J. Kim, J. Kumbrink, Y. Wu, M. J. Lee, K. H. Kirsch, S. K. Fried and K. V. Kandror (2013). "Insulin inhibits lipolysis in adipocytes via the evolutionarily conserved mTORC1-Egr1-ATGL-mediated pathway." Mol Cell Biol **33**(18): 3659-3666.

Chan, S. W., C. J. Lim, K. Guo, C. P. Ng, I. Lee, W. Hunziker, Q. Zeng and W. Hong (2008). "A role for TAZ in migration, invasion, and tumorigenesis of breast cancer cells." Cancer Res **68**(8): 2592-2598.

Chantranupong, L., S. M. Scaria, R. A. Saxton, M. P. Gygi, K. Shen, G. A. Wyant, T. Wang, J. W. Harper, S. P. Gygi and D. M. Sabatini (2016). "The CASTOR Proteins Are Arginine Sensors for the mTORC1 Pathway." Cell **165**(1): 153-164.

Chauvin, C., V. Koka, A. Nouschi, V. Mieulet, C. Hoareau-Aveilla, A. Dreazen, N. Cagnard, W. Carpentier, T. Kiss, O. Meyuhas and M. Pende (2014). "Ribosomal protein S6 kinase

activity controls the ribosome biogenesis transcriptional program." *Oncogene* **33**(4): 474-483.

Chen, H., Y. X. Pan, E. E. Dudenhausen and M. S. Kilberg (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**(49): 50829-50839.

Chen, L., X. Li, L. Liu, B. Yu, Y. Xue and Y. Liu (2015). "Erastin sensitizes glioblastoma cells to temozolomide by restraining xCT and cystathionine-gamma-lyase function." *Oncol Rep* **33**(3): 1465-1474.

Chen, R. S., Y. M. Song, Z. Y. Zhou, T. Tong, Y. Li, M. Fu, X. L. Guo, L. J. Dong, X. He, H. X. Qiao, Q. M. Zhan and W. Li (2009). "Disruption of xCT inhibits cancer cell metastasis via the caveolin-1/beta-catenin pathway." *Oncogene* **28**(4): 599-609.

Cherkasova, V. A. and A. G. Hinnebusch (2003). "Translational control by TOR and TAP42 through dephosphorylation of eIF2alpha kinase GCN2." *Genes Dev* **17**(7): 859-872.

Choo, A. Y., S. G. Kim, M. G. Vander Heiden, S. J. Mahoney, H. Vu, S. O. Yoon, L. C. Cantley and J. Blenis (2010). "Glucose addiction of TSC null cells is caused by failed mTORC1-dependent balancing of metabolic demand with supply." *Mol Cell* **38**(4): 487-499.

Chresta, C. M., B. R. Davies, I. Hickson, T. Harding, S. Cosulich, S. E. Critchlow, J. P. Vincent, R. Ellston, D. Jones, P. Sini, D. James, Z. Howard, P. Dudley, G. Hughes, L. Smith, S. Maguire, M. Hummersone, K. Malagu, K. Menear, R. Jenkins, M. Jacobsen, G. C. Smith, S. Guichard and M. Pass (2010). "AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity." *Cancer Res* **70**(1): 288-298.

Chung, W. J., S. A. Lyons, G. M. Nelson, H. Hamza, C. L. Gladson, G. Y. Gillespie and H. Sontheimer (2005). "Inhibition of cystine uptake disrupts the growth of primary brain tumors." *J Neurosci* **25**(31): 7101-7110.

Commisso, C., S. M. Davidson, R. G. Soydaner-Azeloglu, S. J. Parker, J. J. Kamphorst, S. Hackett, E. Grabocka, M. Nofal, J. A. Drebin, C. B. Thompson, J. D. Rabinowitz, C. M. Metallo, M. G. Vander Heiden and D. Bar-Sagi (2013). "Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells." *Nature* **497**(7451): 633-637.

Cunningham, J. T., J. T. Rodgers, D. H. Arlow, F. Vazquez, V. K. Mootha and P. Puigserver (2007). "mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex." *Nature* **450**(7170): 736-740.

Curatolo, P., R. Bombardieri and S. Jozwiak (2008). "Tuberous sclerosis." Lancet **372**(9639): 657-668.

Curtis, D. R., J. W. Phillis and J. C. Watkins (1960). "The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids." J Physiol **150**: 656-682.

Dang, C. V. (2010). "Rethinking the Warburg effect with Myc micromanaging glutamine metabolism." Cancer Res **70**(3): 859-862.

Dang, C. V. (2013). "MYC, metabolism, cell growth, and tumorigenesis." Cold Spring Harb Perspect Med **3**(8).

de la Ballina, L. R., S. Cano-Crespo, E. Gonzalez-Munoz, S. Bial, S. Estrach, L. Cailleateau, F. Tissot, H. Daniel, A. Zorzano, M. H. Ginsberg, M. Palacin and C. C. Feral (2016). "Amino Acid Transport Associated to Cluster of Differentiation 98 Heavy Chain (CD98hc) Is at the Cross-road of Oxidative Stress and Amino Acid Availability." J Biol Chem **291**(18): 9700-9711.

DeBerardinis, R. J. and T. Cheng (2010). "Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer." Oncogene **29**(3): 313-324.

Degenhardt, K., R. Mathew, B. Beaudoin, K. Bray, D. Anderson, G. Chen, C. Mukherjee, Y. Shi, C. Gelinas, Y. Fan, D. A. Nelson, S. Jin and E. White (2006). "Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis." Cancer Cell **10**(1): 51-64.

Deitmer, J. W., A. Broer and S. Broer (2003). "Glutamine efflux from astrocytes is mediated by multiple pathways." J Neurochem **87**(1): 127-135.

Demetriades, C., M. Plescher and A. A. Teleman (2016). "Lysosomal recruitment of TSC2 is a universal response to cellular stress." Nat Commun **7**: 10662.

Dennis, P. B., A. Jaeschke, M. Saitoh, B. Fowler, S. C. Kozma and G. Thomas (2001). "Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor." Science **294**(5544): 1102-1105.

Dever, T. E., J. J. Chen, G. N. Barber, A. M. Cigan, L. Feng, T. F. Donahue, I. M. London, M. G. Katze and A. G. Hinnebusch (1993). "Mammalian eukaryotic initiation factor 2 alpha kinases functionally substitute for GCN2 protein kinase in the GCN4 translational control mechanism of yeast." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(10): 4616-4620.

DeYoung, M. P., P. Horak, A. Sofer, D. Sgroi and L. W. Ellisen (2008). "Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling." Genes Dev **22**(2): 239-251.

Dolgodilina, E., S. Imobersteg, E. Laczko, T. Welt, F. Verrey and V. Makrides (2015). "Brain interstitial fluid glutamine homeostasis is controlled by blood-brain barrier SLC7A5/LAT1 amino acid transporter." J Cereb Blood Flow Metab.

Dong, J., H. Qiu, M. Garcia-Barrio, J. Anderson and A. G. Hinnebusch (2000). "Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain." Mol Cell **6**(2): 269-279.

Donnelly, N., A. M. Gorman, S. Gupta and A. Samali (2013). "The eIF2alpha kinases: their structures and functions." Cell Mol Life Sci **70**(19): 3493-3511.

Dorrello, N. V., A. Peschiaroli, D. Guardavaccaro, N. H. Colburn, N. E. Sherman and M. Pagano (2006). "S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth." Science **314**(5798): 467-471.

Duran, R. V., E. D. MacKenzie, H. Boulahbel, C. Frezza, L. Heiserich, S. Tardito, O. Bussolati, S. Rocha, M. N. Hall and E. Gottlieb (2013). "HIF-independent role of prolyl hydroxylases in the cellular response to amino acids." Oncogene **32**(38): 4549-4556.

Duran, R. V., W. Oppliger, A. M. Robitaille, L. Heiserich, R. Skendaj, E. Gottlieb and M. N. Hall (2012). "Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling." Mol Cell **47**(3): 349-358.

Duvel, K., J. L. Yecies, S. Menon, P. Raman, A. I. Lipovsky, A. L. Souza, E. Triantafellow, Q. Ma, R. Gorski, S. Cleaver, M. G. Vander Heiden, J. P. MacKeigan, P. M. Finan, C. B. Clish, L. O. Murphy and B. D. Manning (2010). "Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1." Mol Cell **39**(2): 171-183.

Efeyan, A. and D. M. Sabatini (2010). "mTOR and cancer: many loops in one pathway." Curr Opin Cell Biol **22**(2): 169-176.

El-Chaar, D., A. Gagnon and A. Sorisky (2004). "Inhibition of insulin signaling and adipogenesis by rapamycin: effect on phosphorylation of p70 S6 kinase vs eIF4E-BP1." Int J Obes Relat Metab Disord **28**(2): 191-198.

Elorza, A., I. Soro-Arnaiz, F. Melendez-Rodriguez, V. Rodriguez-Vaello, G. Marsboom, G. de Carcer, B. Acosta-Iborra, L. Albacete-Albacete, A. Ordonez, L. Serrano-Oviedo, J. M. Gimenez-Bachs, A. Vara-Vega, A. Salinas, R. Sanchez-Prieto, R. Martin del Rio, F. Sanchez-Madrid, M. Malumbres, M. O. Landazuri and J. Aragonés (2012). "HIF2alpha acts as an mTORC1 activator through the amino acid carrier SLC7A5." Mol Cell **48**(5): 681-691.

Engelman, J. A., L. Chen, X. Tan, K. Crosby, A. R. Guimaraes, R. Upadhyay, M. Maira, K. McNamara, S. A. Perera, Y. Song, L. R. Chirieac, R. Kaur, A. Lightbown, J. Simendinger, T. Li, R. F. Padera, C. Garcia-Echeverria, R. Weissleder, U. Mahmood, L. C. Cantley and K. K. Wong (2008). "Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers." Nat Med **14**(12): 1351-1356.

Engelman, J. A., J. Luo and L. C. Cantley (2006). "The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism." Nat Rev Genet **7**(8): 606-619.

Estrach, S., S. A. Lee, E. Boulter, S. Pisano, A. Errante, F. S. Tissot, L. Cailleteau, C. Pons, M. H. Ginsberg and C. C. Feral (2014). "CD98hc (SLC3A2) loss protects against ras-driven tumorigenesis by modulating integrin-mediated mechanotransduction." Cancer Res **74**(23): 6878-6889.

Fawcett, T. W., J. L. Martindale, K. Z. Guyton, T. Hai and N. J. Holbrook (1999). "Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response." Biochem J **339** (Pt 1): 135-141.

Feldman, M. E., B. Apsel, A. Uotila, R. Loewith, Z. A. Knight, D. Ruggiero and K. M. Shokat (2009). "Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2." PLoS Biol **7**(2): e38.

Fenczik, C. A., R. Zent, M. Dellos, D. A. Calderwood, J. Satriano, C. Kelly and M. H. Ginsberg (2001). "Distinct domains of CD98hc regulate integrins and amino acid transport." J Biol Chem **276**(12): 8746-8752.

Feng, Z., H. Zhang, A. J. Levine and S. Jin (2005). "The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(23): 8204-8209.

Feral, C. C., N. Nishiya, C. A. Fenczik, H. Stuhlmann, M. Slepak and M. H. Ginsberg (2005). "CD98hc (SLC3A2) mediates integrin signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(2): 355-360.

Fischer, C., J. Johnson, B. Stillwell, J. Conner, Z. Cerovac, J. Wilson-Rawls and A. Rawls (2004). "Activating transcription factor 4 is required for the differentiation of the lamina propria layer of the vas deferens." Biol Reprod **70**(2): 371-378.

Fleury, C., B. Mignotte and J. L. Vayssiere (2002). "Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling." Biochimie **84**(2-3): 131-141.

Fonseca, B. D., E. M. Smith, V. H. Lee, C. MacKintosh and C. G. Proud (2007). "PRAS40 is a target for mammalian target of rapamycin complex 1 and is required for signaling downstream of this complex." J Biol Chem **282**(34): 24514-24524.

Frias, M. A., C. C. Thoreen, J. D. Jaffe, W. Schroder, T. Sculley, S. A. Carr and D. M. Sabatini (2006). "mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s." Curr Biol **16**(18): 1865-1870.

Fruehauf, J. P. and F. L. Meyskens, Jr. (2007). "Reactive oxygen species: a breath of life or death?" Clin Cancer Res **13**(3): 789-794.

Furuya, M., J. Horiguchi, H. Nakajima, Y. Kanai and T. Oyama (2012). "Correlation of L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression with triple negative breast cancer prognosis." Cancer Sci **103**(2): 382-389.

Ganapathy, V., M. Thangaraju and P. D. Prasad (2009). "Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond." Pharmacol Ther **121**(1): 29-40.

Gangloff, Y. G., M. Mueller, S. G. Dann, P. Svoboda, M. Sticker, J. F. Spetz, S. H. Um, E. J. Brown, S. Cereghini, G. Thomas and S. C. Kozma (2004). "Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development." Mol Cell Biol **24**(21): 9508-9516.

Ganley, I. G., H. Lam du, J. Wang, X. Ding, S. Chen and X. Jiang (2009). "ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy." J Biol Chem **284**(18): 12297-12305.

Gao, D., H. Inuzuka, M. K. Tan, H. Fukushima, J. W. Locasale, P. Liu, L. Wan, B. Zhai, Y. R. Chin, S. Shaik, C. A. Lyssiotis, S. P. Gygi, A. Tokar, L. C. Cantley, J. M. Asara, J. W. Harper and W. Wei (2011). "mTOR drives its own activation via SCF(betaTrCP)-dependent degradation of the mTOR inhibitor DEPTOR." Mol Cell **44**(2): 290-303.

Garcia-Barrio, M., J. Dong, S. Ufano and A. G. Hinnebusch (2000). "Association of GCN1-GCN20 regulatory complex with the N-terminus of eIF2alpha kinase GCN2 is required for GCN2 activation." EMBO J **19**(8): 1887-1899.

Garcia-Echeverria, C. (2011). "Blocking the mTOR pathway: a drug discovery perspective." Biochem Soc Trans **39**(2): 451-455.

Garcia-Martinez, J. M. and D. R. Alessi (2008). "mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1)." Biochem J **416**(3): 375-385.

Gaugitsch, H. W., E. E. Prieschl, F. Kalthoff, N. E. Huber and T. Baumruker (1992). "A novel transiently expressed, integral membrane protein linked to cell activation. Molecular cloning via the rapid degradation signal AUUUA." J Biol Chem **267**(16): 11267-11273.

Geier, E. G., A. Schlessinger, H. Fan, J. E. Gable, J. J. Irwin, A. Sali and K. M. Giacomini (2013). "Structure-based ligand discovery for the Large-neutral Amino Acid Transporter 1, LAT-1." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(14): 5480-5485.

Gera, J. F., I. K. Mellingshoff, Y. Shi, M. B. Rettig, C. Tran, J. H. Hsu, C. L. Sawyers and A. K. Lichtenstein (2004). "AKT activity determines sensitivity to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors by regulating cyclin D1 and c-myc expression." J Biol Chem **279**(4): 2737-2746.

Ghosh, A. P., B. J. Klocke, M. E. Ballestas and K. A. Roth (2012). "CHOP potentially cooperates with FOXO3a in neuronal cells to regulate PUMA and BIM expression in response to ER stress." PLoS One **7**(6): e39586.

Giannoni, E., F. Buricchi, G. Raugei, G. Ramponi and P. Chiarugi (2005). "Intracellular reactive oxygen species activate Src tyrosine kinase during cell adhesion and anchorage-dependent cell growth." Mol Cell Biol **25**(15): 6391-6403.

Gibson, C. J. and R. J. Wurtman (1977). "Physiological control of brain catechol synthesis by brain tyrosine concentration." Biochem Pharmacol **26**(12): 1137-1142.

Gingras, A. C., B. Raught and N. Sonenberg (2001). "Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR." Genes Dev **15**(7): 807-826.

Gliddon, C. M., Z. Shao, J. L. LeMaistre and C. M. Anderson (2009). "Cellular distribution of the neutral amino acid transporter subtype ASCT2 in mouse brain." J Neurochem **108**(2): 372-383.

Gout, P. W., A. R. Buckley, C. R. Simms and N. Bruchovsky (2001). "Sulfasalazine, a potent suppressor of lymphoma growth by inhibition of the x(c)- cystine transporter: a new action for an old drug." Leukemia **15**(10): 1633-1640.

Gout, P. W., Y. J. Kang, D. J. Buckley, N. Bruchovsky and A. R. Buckley (1997). "Increased cystine uptake capability associated with malignant progression of Nb2 lymphoma cells." Leukemia **11**(8): 1329-1337.

Guan, J., M. Lo, P. Dockery, S. Mahon, C. M. Karp, A. R. Buckley, S. Lam, P. W. Gout and Y. Z. Wang (2009). "The xc- cystine/glutamate antiporter as a potential therapeutic target for small-cell lung cancer: use of sulfasalazine." Cancer Chemother Pharmacol **64**(3): 463-472.

Guertin, D. A. and D. M. Sabatini (2009). "The pharmacology of mTOR inhibition." Sci Signal **2**(67): pe24.

Guertin, D. A., D. M. Stevens, M. Saitoh, S. Kinkel, K. Crosby, J. H. Sheen, D. J. Mullholland, M. A. Magnuson, H. Wu and D. M. Sabatini (2009). "mTOR complex 2 is required for the development of prostate cancer induced by Pten loss in mice." Cancer Cell **15**(2): 148-159.

Guertin, D. A., D. M. Stevens, C. C. Thoreen, A. A. Burds, N. Y. Kalaany, J. Moffat, M. Brown, K. J. Fitzgerald and D. M. Sabatini (2006). "Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1." Dev Cell **11**(6): 859-871.

Guo, F. and D. R. Cavener (2007). "The GCN2 eIF2alpha kinase regulates fatty-acid homeostasis in the liver during deprivation of an essential amino acid." Cell Metab **5**(2): 103-114.

Guo, W., Y. Zhao, Z. Zhang, N. Tan, F. Zhao, C. Ge, L. Liang, D. Jia, T. Chen, M. Yao, J. Li and X. He (2011). "Disruption of xCT inhibits cell growth via the ROS/autophagy pathway in hepatocellular carcinoma." Cancer Lett **312**(1): 55-61.

Gwinn, D. M., D. B. Shackelford, D. F. Egan, M. M. Mihaylova, A. Mery, D. S. Vasquez, B. E. Turk and R. J. Shaw (2008). "AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint." Mol Cell **30**(2): 214-226.

Habib, E., K. Linher-Melville, H. X. Lin and G. Singh (2015). "Expression of xCT and activity of system xc(-) are regulated by NRF2 in human breast cancer cells in response to oxidative stress." Redox Biol **5**: 33-42.

Hagiwara, A., M. Cornu, N. Cybulski, P. Polak, C. Betz, F. Trapani, L. Terracciano, M. H. Heim, M. A. Ruegg and M. N. Hall (2012). "Hepatic mTORC2 activates glycolysis and lipogenesis through Akt, glucokinase, and SREBP1c." Cell Metab **15**(5): 725-738.

Haining, Z., N. Kawai, K. Miyake, M. Okada, S. Okubo, X. Zhang, Z. Fei and T. Tamiya (2012). "Relation of LAT1/4F2hc expression with pathological grade, proliferation and angiogenesis in human gliomas." BMC Clin Pathol **12**: 4.

Han, J. M., S. J. Jeong, M. C. Park, G. Kim, N. H. Kwon, H. K. Kim, S. H. Ha, S. H. Ryu and S. Kim (2012). "Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway." Cell **149**(2): 410-424.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.

Hannan, K. M., Y. Brandenburger, A. Jenkins, K. Sharkey, A. Cavanaugh, L. Rothblum, T. Moss, G. Poortinga, G. A. McArthur, R. B. Pearson and R. D. Hannan (2003). "mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF." Mol Cell Biol **23**(23): 8862-8877.

Hansen, C. G., Y. L. Ng, W. L. Lam, S. W. Plouffe and K. L. Guan (2015). "The Hippo pathway effectors YAP and TAZ promote cell growth by modulating amino acid signaling to mTORC1." Cell Res **25**(12): 1299-1313.

Hao, S., J. W. Sharp, C. M. Ross-Inta, B. J. McDaniel, T. G. Anthony, R. C. Wek, D. R. Cavener, B. C. McGrath, J. B. Rudell, T. J. Koehnle and D. W. Gietzen (2005). "Uncharged tRNA and sensing of amino acid deficiency in mammalian piriform cortex." Science **307**(5716): 1776-1778.

Hara, K., Y. Maruki, X. Long, K. Yoshino, N. Oshiro, S. Hidayat, C. Tokunaga, J. Avruch and K. Yonezawa (2002). "Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action." Cell **110**(2): 177-189.

Hara, K., K. Yonezawa, Q. P. Weng, M. T. Kozlowski, C. Belham and J. Avruch (1998). "Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism." J Biol Chem **273**(23): 14484-14494.

Hardie, D. G. (2005). "New roles for the LKB1-->AMPK pathway." Curr Opin Cell Biol **17**(2): 167-173.

Harding, H. P., I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira and D. Ron (2000). "Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells." Mol Cell **6**(5): 1099-1108.

Harding, H. P., Y. Zhang, H. Zeng, I. Novoa, P. D. Lu, M. Calton, N. Sadri, C. Yun, B. Popko, R. Paules, D. F. Stojdl, J. C. Bell, T. Hettmann, J. M. Leiden and D. Ron (2003). "An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress." Mol Cell **11**(3): 619-633.

Hassanein, M., J. Qian, M. D. Hoeksema, J. Wang, M. Jacobovitz, X. Ji, F. T. Harris, B. K. Harris, K. L. Boyd, H. Chen, R. Eisenberg and P. P. Massion (2015). "Targeting SLC1a5-mediated glutamine dependence in non-small cell lung cancer." Int J Cancer **137**(7): 1587-1597.

Hatanaka, T., M. Haramura, Y. J. Fei, S. Miyauchi, C. C. Bridges, P. S. Ganapathy, S. B. Smith, V. Ganapathy and M. E. Ganapathy (2004). "Transport of amino acid-based prodrugs by the Na⁺- and Cl⁻-coupled amino acid transporter ATB_{0,+} and expression of the transporter in tissues amenable for drug delivery." J Pharmacol Exp Ther **308**(3): 1138-1147.

Hay, N. and N. Sonenberg (2004). "Upstream and downstream of mTOR." Genes Dev **18**(16): 1926-1945.

Hayashi, K., P. Jutabha, H. Endou and N. Anzai (2012). "c-Myc is crucial for the expression of LAT1 in MIA Paca-2 human pancreatic cancer cells." Oncol Rep **28**(3): 862-866.

He, C. H., P. Gong, B. Hu, D. Stewart, M. E. Choi, A. M. Choi and J. Alam (2001). "Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation." J Biol Chem **276**(24): 20858-20865.

Hettmann, T., K. Barton and J. M. Leiden (2000). "Microphthalmia due to p53-mediated apoptosis of anterior lens epithelial cells in mice lacking the CREB-2 transcription factor." Dev Biol **222**(1): 110-123.

Hidalgo, M., G. Rodriguez, J. G. Kuhn, T. Brown, G. Weiss, J. P. MacGovren, D. D. Von Hoff and E. K. Rowinsky (1998). "A Phase I and pharmacological study of the glutamine antagonist acivicin with the amino acid solution aminosyn in patients with advanced solid malignancies." Clin Cancer Res **4**(11): 2763-2770.

Hietakangas, V. and S. M. Cohen (2008). "TOR complex 2 is needed for cell cycle progression and anchorage-independent growth of MCF7 and PC3 tumor cells." BMC Cancer **8**: 282.

Holcik, M. and N. Sonenberg (2005). "Translational control in stress and apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(4): 318-327.

Holz, M. K., B. A. Ballif, S. P. Gygi and J. Blenis (2005). "mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events." Cell **123**(4): 569-580.

Hornstein, E., H. Tang and O. Meyuhas (2001). "Mitogenic and nutritional signals are transduced into translational efficiency of TOP mRNAs." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **66**: 477-484.

Horton, J. D., J. L. Goldstein and M. S. Brown (2002). "SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver." J Clin Invest **109**(9): 1125-1131.

Hosokawa, N., T. Hara, T. Kaizuka, C. Kishi, A. Takamura, Y. Miura, S. Iemura, T. Natsume, K. Takehana, N. Yamada, J. L. Guan, N. Oshiro and N. Mizushima (2009). "Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy." Mol Biol Cell **20**(7): 1981-1991.

Houde, V. P., S. Brule, W. T. Festuccia, P. G. Blanchard, K. Bellmann, Y. Deshaies and A. Marette (2010). "Chronic rapamycin treatment causes glucose intolerance and hyperlipidemia by upregulating hepatic gluconeogenesis and impairing lipid deposition in adipose tissue." Diabetes **59**(6): 1338-1348.

Howell, J. J., S. J. Ricoult, I. Ben-Sahra and B. D. Manning (2013). "A growing role for mTOR in promoting anabolic metabolism." Biochem Soc Trans **41**(4): 906-912.

Hsieh, A. C., Y. Liu, M. P. Edlind, N. T. Ingolia, M. R. Janes, A. Sher, E. Y. Shi, C. R. Stumpf, C. Christensen, M. J. Bonham, S. Wang, P. Ren, M. Martin, K. Jessen, M. E. Feldman, J. S. Weissman, K. M. Shokat, C. Rommel and D. Ruggero (2012). "The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis." Nature **485**(7396): 55-61.

Huang, F., Y. Zhao, J. Zhao, S. Wu, Y. Jiang, H. Ma and T. Zhang (2014). "Upregulated SLC1A5 promotes cell growth and survival in colorectal cancer." Int J Clin Exp Pathol **7**(9): 6006-6014.

Huang, J., C. C. Dibble, M. Matsuzaki and B. D. Manning (2008). "The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2." Mol Cell Biol **28**(12): 4104-4115.

Hung, C. M., C. M. Calejman, J. Sanchez-Gurmaches, H. Li, C. B. Clish, S. Hettmer, A. J. Wagers and D. A. Guertin (2014). "Rictor/mTORC2 loss in the Myf5 lineage reprograms brown fat metabolism and protects mice against obesity and metabolic disease." Cell Rep **8**(1): 256-271.

Inoki, K., Y. Li, T. Zhu, J. Wu and K. L. Guan (2002). "TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling." Nat Cell Biol **4**(9): 648-657.

Inoki, K., T. Zhu and K. L. Guan (2003). "TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival." Cell **115**(5): 577-590.

Jacinto, E., V. Facchinetti, D. Liu, N. Soto, S. Wei, S. Y. Jung, Q. Huang, J. Qin and B. Su (2006). "SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity." Cell **127**(1): 125-137.

Jacinto, E., R. Loewith, A. Schmidt, S. Lin, M. A. Ruegg, A. Hall and M. N. Hall (2004). "Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive." Nat Cell Biol **6**(11): 1122-1128.

Janes, M. R., J. J. Limon, L. So, J. Chen, R. J. Lim, M. A. Chavez, C. Vu, M. B. Lilly, S. Mallya, S. T. Ong, M. Konopleva, M. B. Martin, P. Ren, Y. Liu, C. Rommel and D. A. Fruman (2010). "Effective and selective targeting of leukemia cells using a TORC1/2 kinase inhibitor." Nat Med **16**(2): 205-213.

Jiang, H. Y., S. A. Wek, B. C. McGrath, D. Lu, T. Hai, H. P. Harding, X. Wang, D. Ron, D. R. Cavener and R. C. Wek (2004). "Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response." Mol Cell Biol **24**(3): 1365-1377.

Jin, H. O., S. K. Seo, Y. S. Kim, S. H. Woo, K. H. Lee, J. Y. Yi, S. J. Lee, T. B. Choe, J. H. Lee, S. An, S. I. Hong and I. C. Park (2011). "TXNIP potentiates Redd1-induced mTOR suppression through stabilization of Redd1." Oncogene **30**(35): 3792-3801.

Jin, H. O., S. K. Seo, S. H. Woo, E. S. Kim, H. C. Lee, D. H. Yoo, S. An, T. B. Choe, S. J. Lee, S. I. Hong, C. H. Rhee, J. I. Kim and I. C. Park (2009). "Activating transcription factor 4 and CCAAT/enhancer-binding protein-beta negatively regulate the mammalian target of rapamycin via Redd1 expression in response to oxidative and endoplasmic reticulum stress." Free Radic Biol Med **46**(8): 1158-1167.

Jin, H. O., S. K. Seo, S. H. Woo, E. S. Kim, H. C. Lee, D. H. Yoo, T. B. Choe, S. I. Hong, J. I. Kim and I. C. Park (2009). "SP600125 negatively regulates the mammalian target of rapamycin via ATF4-induced Redd1 expression." FEBS Lett **583**(1): 123-127.

Johannessen, C. M., E. E. Reczek, M. F. James, H. Brems, E. Legius and K. Cichowski (2005). "The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(24): 8573-8578.

Jones, R. G. and C. B. Thompson (2009). "Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth." Genes Dev **23**(5): 537-548.

Jung, J., H. M. Genau and C. Behrends (2015). "Amino Acid-Dependent mTORC1 Regulation by the Lysosomal Membrane Protein SLC38A9." Mol Cell Biol **35**(14): 2479-2494.

Kaira, K., N. Oriuchi, H. Imai, K. Shimizu, N. Yanagitani, N. Sunaga, T. Hisada, O. Kawashima, Y. Kamide, T. Ishizuka, Y. Kanai, T. Nakajima and M. Mori (2010). "Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (CD98) expression in surgically resectable stage III non-small cell lung cancer." Exp Ther Med **1**(5): 799-808.

Kaira, K., N. Oriuchi, H. Imai, K. Shimizu, N. Yanagitani, N. Sunaga, T. Hisada, S. Tanaka, T. Ishizuka, Y. Kanai, H. Endou, T. Nakajima and M. Mori (2008). "L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression in primary and metastatic sites of human neoplasms." Cancer Sci **99**(12): 2380-2386.

Kaira, K., Y. Sunose, K. Arakawa, T. Ogawa, N. Sunaga, K. Shimizu, H. Tominaga, N. Oriuchi, H. Itoh, S. Nagamori, Y. Kanai, A. Segawa, M. Furuya, M. Mori, T. Oyama and I. Takeyoshi (2012). "Prognostic significance of L-type amino-acid transporter 1 expression in surgically resected pancreatic cancer." Br J Cancer **107**(4): 632-638.

Kaizuka, T., T. Hara, N. Oshiro, U. Kikkawa, K. Yonezawa, K. Takehana, S. Iemura, T. Natsume and N. Mizushima (2010). "Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly." J Biol Chem **285**(26): 20109-20116.

Kamphorst, J. J., M. Nofal, C. Commisso, S. R. Hackett, W. Lu, E. Grabocka, M. G. Vander Heiden, G. Miller, J. A. Drebin, D. Bar-Sagi, C. B. Thompson and J. D. Rabinowitz (2015). "Human pancreatic cancer tumors are nutrient poor and tumor cells actively scavenge extracellular protein." Cancer Res **75**(3): 544-553.

Kanai, Y., B. Clemençon, A. Simonin, M. Leuenberger, M. Lochner, M. Weisstanner and M. A. Hediger (2013). "The SLC1 high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family." Mol Aspects Med **34**(2-3): 108-120.

Kanai, Y., H. Segawa, K. Miyamoto, H. Uchino, E. Takeda and H. Endou (1998). "Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids

activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98)." J Biol Chem **273**(37): 23629-23632.

Karpinski, B. A., G. D. Morle, J. Huggenvik, M. D. Uhler and J. M. Leiden (1992). "Molecular cloning of human CREB-2: an ATF/CREB transcription factor that can negatively regulate transcription from the cAMP response element." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(11): 4820-4824.

Karunakaran, S., S. Ramachandran, V. Coothankandaswamy, S. Elangovan, E. Babu, S. Periyasamy-Thandavan, A. Gurav, J. P. Gnanaprakasam, N. Singh, P. V. Schoenlein, P. D. Prasad, M. Thangaraju and V. Ganapathy (2011). "SLC6A14 (ATB0,+) protein, a highly concentrative and broad specific amino acid transporter, is a novel and effective drug target for treatment of estrogen receptor-positive breast cancer." J Biol Chem **286**(36): 31830-31838.

Kaushik, S. and A. M. Cuervo (2012). "Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world." Trends Cell Biol **22**(8): 407-417.

Kensler, T. W., N. Wakabayashi and S. Biswal (2007). "Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway." Annu Rev Pharmacol Toxicol **47**: 89-116.

Kerr, M. C. and R. D. Teasdale (2009). "Defining macropinocytosis." Traffic **10**(4): 364-371.

Kilberg, M. S., J. Shan and N. Su (2009). "ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation." Trends Endocrinol Metab **20**(9): 436-443.

Killian, D. M. and P. J. Chikhale (2001). "Predominant functional activity of the large, neutral amino acid transporter (LAT1) isoform at the cerebrovasculature." Neurosci Lett **306**(1-2): 1-4.

Kim, D. H., D. D. Sarbassov, S. M. Ali, J. E. King, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. M. Sabatini (2002). "mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery." Cell **110**(2): 163-175.

Kim, E., P. Goraksha-Hicks, L. Li, T. P. Neufeld and K. L. Guan (2008). "Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response." Nat Cell Biol **10**(8): 935-945.

Kim, J., J. H. Lee and V. R. Iyer (2008). "Global identification of Myc target genes reveals its direct role in mitochondrial biogenesis and its E-box usage in vivo." PLoS One **3**(3): e1798.

Kim, J. S., S. H. Ro, M. Kim, H. W. Park, I. A. Semple, H. Park, U. S. Cho, W. Wang, K. L. Guan, M. Karin and J. H. Lee (2015). "Sestrin2 inhibits mTORC1 through modulation of GATOR complexes." Sci Rep **5**: 9502.

Kim, K., S. Pyo and S. H. Um (2012). "S6 kinase 2 deficiency enhances ketone body production and increases peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity in the liver." Hepatology **55**(6): 1727-1737.

Kleppe, R., A. Martinez, S. O. Doskeland and J. Haavik (2011). "The 14-3-3 proteins in regulation of cellular metabolism." Semin Cell Dev Biol **22**(7): 713-719.

Kojima, E., A. Takeuchi, M. Haneda, A. Yagi, T. Hasegawa, K. Yamaki, K. Takeda, S. Akira, K. Shimokata and K. Isobe (2003). "The function of GADD34 is a recovery from a shutoff of protein synthesis induced by ER stress: elucidation by GADD34-deficient mice." FASEB J **17**(11): 1573-1575.

Koltin, Y., L. Faucette, D. J. Bergsma, M. A. Levy, R. Cafferkey, P. L. Koser, R. K. Johnson and G. P. Livi (1991). "Rapamycin sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase related to human FK506-binding protein." Mol Cell Biol **11**(3): 1718-1723.

Koren, I., E. Reem and A. Kimchi (2010). "DAP1, a novel substrate of mTOR, negatively regulates autophagy." Curr Biol **20**(12): 1093-1098.

Kozak, M. (1987). "An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs." Nucleic Acids Res **15**(20): 8125-8148.

Kubota, H., T. Obata, K. Ota, T. Sasaki and T. Ito (2003). "Rapamycin-induced translational derepression of GCN4 mRNA involves a novel mechanism for activation of the eIF2 alpha kinase GCN2." J Biol Chem **278**(23): 20457-20460.

Kuhne, A., M. V. Tzvetkov, Y. Hagos, H. Lage, G. Burckhardt and J. Brockmoller (2009). "Influx and efflux transport as determinants of melphalan cytotoxicity: Resistance to melphalan in MDR1 overexpressing tumor cell lines." Biochem Pharmacol **78**(1): 45-53.

Kung, A. L., S. Wang, J. M. Klco, W. G. Kaelin and D. M. Livingston (2000). "Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription." Nat Med **6**(12): 1335-1340.

Labuschagne, C. F., N. J. van den Broek, G. M. Mackay, K. H. Vousden and O. D. Maddocks (2014). "Serine, but not glycine, supports one-carbon metabolism and proliferation of cancer cells." Cell Rep **7**(4): 1248-1258.

Laplante, M. and D. M. Sabatini (2012). "mTOR signaling in growth control and disease." Cell **149**(2): 274-293.

Lazaris-Karatzas, A., K. S. Montine and N. Sonenberg (1990). "Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap." *Nature* **345**(6275): 544-547.

Lee, C. H., K. Inoki, M. Karbowniczek, E. Petroulakis, N. Sonenberg, E. P. Henske and K. L. Guan (2007). "Constitutive mTOR activation in TSC mutants sensitizes cells to energy starvation and genomic damage via p53." *EMBO J* **26**(23): 4812-4823.

Lee, S. R., K. S. Yang, J. Kwon, C. Lee, W. Jeong and S. G. Rhee (2002). "Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H2O2." *J Biol Chem* **277**(23): 20336-20342.

Lee, Y. Y., R. C. Cevallos and E. Jan (2009). "An upstream open reading frame regulates translation of GADD34 during cellular stresses that induce eIF2alpha phosphorylation." *J Biol Chem* **284**(11): 6661-6673.

Leprivier, G., B. Rotblat, D. Khan, E. Jan and P. H. Sorensen (2015). "Stress-mediated translational control in cancer cells." *Biochim Biophys Acta* **1849**(7): 845-860.

Leprivier, G. and P. H. Sorensen (2014). "How does oncogene transformation render tumor cells hypersensitive to nutrient deprivation?" *Bioessays* **36**(11): 1082-1090.

Lewerenz, J., S. J. Hewett, Y. Huang, M. Lambros, P. W. Gout, P. W. Kalivas, A. Massie, I. Smolders, A. Methner, M. Pergande, S. B. Smith, V. Ganapathy and P. Maher (2013). "The cystine/glutamate antiporter system x(c)(-) in health and disease: from molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities." *Antioxid Redox Signal* **18**(5): 522-555.

Li, J., J. Qiang, S. F. Chen, X. Wang, J. Fu and Y. Chen (2013). "The impact of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) in human hepatocellular carcinoma." *Tumour Biol* **34**(5): 2977-2981.

Li, J., F. Wang, K. Haraldson, A. Protopopov, F. M. Duh, L. Geil, I. Kuzmin, J. D. Minna, E. Stanbridge, E. Braga, V. I. Kashuba, G. Klein, M. I. Lerman and E. R. Zabarovsky (2004). "Functional characterization of the candidate tumor suppressor gene NPRL2/G21 located in 3p21.3C." *Cancer Res* **64**(18): 6438-6443.

Li, S., M. S. Brown and J. L. Goldstein (2010). "Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(8): 3441-3446.

Liao, D., C. Corle, T. N. Seagroves and R. S. Johnson (2007). "Hypoxia-inducible factor-1alpha is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression." *Cancer Res* **67**(2): 563-572.

Liao, D. and R. S. Johnson (2007). "Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer." Cancer Metastasis Rev **26**(2): 281-290.

Lin, C. Y., J. Loven, P. B. Rahl, R. M. Paranal, C. B. Burge, J. E. Bradner, T. I. Lee and R. A. Young (2012). "Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc." Cell **151**(1): 56-67.

Liu, L., T. P. Cash, R. G. Jones, B. Keith, C. B. Thompson and M. C. Simon (2006). "Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth." Mol Cell **21**(4): 521-531.

Liu, Q., C. Thoreen, J. Wang, D. Sabatini and N. S. Gray (2009). "mTOR Mediated Anti-Cancer Drug Discovery." Drug Discov Today Ther Strateg **6**(2): 47-55.

Liu, R., P. E. Blower, A. N. Pham, J. Fang, Z. Dai, C. Wise, B. Green, C. H. Teitel, B. Ning, W. Ling, B. D. Lyn-Cook, F. F. Kadlubar, W. Sadee and Y. Huang (2007). "Cystine-glutamate transporter SLC7A11 mediates resistance to geldanamycin but not to 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin." Mol Pharmacol **72**(6): 1637-1646.

Lo, M., V. Ling, C. Low, Y. Z. Wang and P. W. Gout (2010). "Potential use of the anti-inflammatory drug, sulfasalazine, for targeted therapy of pancreatic cancer." Curr Oncol **17**(3): 9-16.

Lo, M., V. Ling, Y. Z. Wang and P. W. Gout (2008). "The xc- cystine/glutamate antiporter: a mediator of pancreatic cancer growth with a role in drug resistance." Br J Cancer **99**(3): 464-472.

Locasale, J. W. (2013). "Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle." Nat Rev Cancer **13**(8): 572-583.

Locasale, J. W. and L. C. Cantley (2011). "Genetic selection for enhanced serine metabolism in cancer development." Cell Cycle **10**(22): 3812-3813.

Loewith, R., E. Jacinto, S. Wullschleger, A. Lorberg, J. L. Crespo, D. Bonenfant, W. Oppliger, P. Jenoe and M. N. Hall (2002). "Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control." Mol Cell **10**(3): 457-468.

Long, X., Y. Lin, S. Ortiz-Vega, K. Yonezawa and J. Avruch (2005). "Rheb binds and regulates the mTOR kinase." Curr Biol **15**(8): 702-713.

Lorsch, J. R. and T. E. Dever (2010). "Molecular view of 43 S complex formation and start site selection in eukaryotic translation initiation." J Biol Chem **285**(28): 21203-21207.

Lu, H., D. Samanta, L. Xiang, H. Zhang, H. Hu, I. Chen, J. W. Bullen and G. L. Semenza (2015). "Chemotherapy triggers HIF-1-dependent glutathione synthesis and copper

chelation that induces the breast cancer stem cell phenotype." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(33): E4600-4609.

Lu, P. D., H. P. Harding and D. Ron (2004). "Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response." J Cell Biol **167**(1): 27-33.

Lyons, S. A., W. J. Chung, A. K. Weaver, T. Ogunrinu and H. Sontheimer (2007). "Autocrine glutamate signaling promotes glioma cell invasion." Cancer Res **67**(19): 9463-9471.

Ma, L., Z. Chen, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and P. P. Pandolfi (2005). "Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis." Cell **121**(2): 179-193.

Ma, M. Z., G. Chen, P. Wang, W. H. Lu, C. F. Zhu, M. Song, J. Yang, S. Wen, R. H. Xu, Y. Hu and P. Huang (2015). "Xc- inhibitor sulfasalazine sensitizes colorectal cancer to cisplatin by a GSH-dependent mechanism." Cancer Lett **368**(1): 88-96.

Ma, X. M. and J. Blenis (2009). "Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(5): 307-318.

Mackenzie, B. and J. D. Erickson (2004). "Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family." Pflugers Arch **447**(5): 784-795.

Maddocks, O. D., C. R. Berkers, S. M. Mason, L. Zheng, K. Blyth, E. Gottlieb and K. H. Vousden (2013). "Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells." Nature **493**(7433): 542-546.

Makrides, V., S. M. Camargo and F. Verrey (2014). "Transport of amino acids in the kidney." Compr Physiol **4**(1): 367-403.

Manning, B. D. and L. C. Cantley (2007). "AKT/PKB signaling: navigating downstream." Cell **129**(7): 1261-1274.

Manning, B. D., A. R. Tee, M. N. Logsdon, J. Blenis and L. C. Cantley (2002). "Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway." Mol Cell **10**(1): 151-162.

Marciniak, S. J., C. Y. Yun, S. Oyadomari, I. Novoa, Y. Zhang, R. Jungreis, K. Nagata, H. P. Harding and D. Ron (2004). "CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum." Genes Dev **18**(24): 3066-3077.

Martina, J. A., Y. Chen, M. Gucek and R. Puertollano (2012). "MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB." Autophagy **8**(6): 903-914.

- Martindale, J. L. and N. J. Holbrook (2002). "Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival." J Cell Physiol **192**(1): 1-15.
- Masuoka, H. C. and T. M. Townes (2002). "Targeted disruption of the activating transcription factor 4 gene results in severe fetal anemia in mice." Blood **99**(3): 736-745.
- Maurin, A. C., C. Jousse, J. Averous, L. Parry, A. Bruhat, Y. Cherasse, H. Zeng, Y. Zhang, H. P. Harding, D. Ron and P. Fafournoux (2005). "The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores." Cell Metab **1**(4): 273-277.
- Mauvoisin, D., G. Rocque, O. Arfa, A. Radenne, P. Boissier and C. Mounier (2007). "Role of the PI3-kinase/mTOR pathway in the regulation of the stearoyl CoA desaturase (SCD1) gene expression by insulin in liver." J Cell Commun Signal **1**(2): 113-125.
- Mayers, J. R. and M. G. Vander Heiden (2015). "Famine versus feast: understanding the metabolism of tumors in vivo." Trends Biochem Sci **40**(3): 130-140.
- McCracken, A. N. and A. L. Edinger (2013). "Nutrient transporters: the Achilles' heel of anabolism." Trends Endocrinol Metab **24**(4): 200-208.
- Meijer, A. J. and P. Codogno (2004). "Regulation and role of autophagy in mammalian cells." Int J Biochem Cell Biol **36**(12): 2445-2462.
- Menendez, J. A. and R. Lupu (2007). "Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis." Nat Rev Cancer **7**(10): 763-777.
- Menon, S. and B. D. Manning (2008). "Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors." Oncogene **27 Suppl 2**: S43-51.
- Miki, D., H. Ochi, C. N. Hayes, H. Abe, T. Yoshima, H. Aikata, K. Ikeda, H. Kumada, J. Toyota, T. Morizono, T. Tsunoda, M. Kubo, Y. Nakamura, N. Kamatani and K. Chayama (2011). "Variation in the DEPDC5 locus is associated with progression to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus carriers." Nat Genet **43**(8): 797-800.
- Milkereit, R., A. Persaud, L. Vanoaica, A. Guetg, F. Verrey and D. Rotin (2015). "LAPTM4b recruits the LAT1-4F2hc Leu transporter to lysosomes and promotes mTORC1 activation." Nat Commun **6**: 7250.
- Morita, M., S. P. Gravel, V. Chenard, K. Sikstrom, L. Zheng, T. Alain, V. Gandin, D. Avizonis, M. Arguello, C. Zakaria, S. McLaughlan, Y. Nouet, A. Pause, M. Pollak, E. Gottlieb, O. Larsson, J. St-Pierre, I. Topisirovic and N. Sonenberg (2013). "mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation." Cell Metab **18**(5): 698-711.

Moroishi, T., C. G. Hansen and K. L. Guan (2015). "The emerging roles of YAP and TAZ in cancer." Nat Rev Cancer **15**(2): 73-79.

Morrisett, J. D., G. Abdel-Fattah and B. D. Kahan (2003). "Sirolimus changes lipid concentrations and lipoprotein metabolism in kidney transplant recipients." Transplant Proc **35**(3 Suppl): 143S-150S.

Nabeyama, A., A. Kurita, K. Asano, Y. Miyake, T. Yasuda, I. Miura, G. Nishitai, S. Arakawa, S. Shimizu, S. Wakana, H. Yoshida and M. Tanaka (2010). "xCT deficiency accelerates chemically induced tumorigenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(14): 6436-6441.

Nada, S., A. Hondo, A. Kasai, M. Koike, K. Saito, Y. Uchiyama and M. Okada (2009). "The novel lipid raft adaptor p18 controls endosome dynamics by anchoring the MEK-ERK pathway to late endosomes." EMBO J **28**(5): 477-489.

Nakaya, M., Y. Xiao, X. Zhou, J. H. Chang, M. Chang, X. Cheng, M. Blonska, X. Lin and S. C. Sun (2014). "Inflammatory T cell responses rely on amino acid transporter ASCT2 facilitation of glutamine uptake and mTORC1 kinase activation." Immunity **40**(5): 692-705.

Nedergaard, M., T. Takano and A. J. Hansen (2002). "Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter." Nat Rev Neurosci **3**(9): 748-755.

Ng, T. L., G. Leprivier, M. D. Robertson, C. Chow, M. J. Martin, K. R. Laderoute, E. Davicioni, T. J. Triche and P. H. Sorensen (2012). "The AMPK stress response pathway mediates anoikis resistance through inhibition of mTOR and suppression of protein synthesis." Cell Death Differ **19**(3): 501-510.

Nicklin, P., P. Bergman, B. Zhang, E. Triantafellow, H. Wang, B. Nyfeler, H. Yang, M. Hild, C. Kung, C. Wilson, V. E. Myer, J. P. MacKeigan, J. A. Porter, Y. K. Wang, L. C. Cantley, P. M. Finan and L. O. Murphy (2009). "Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy." Cell **136**(3): 521-534.

Nie, Z., G. Hu, G. Wei, K. Cui, A. Yamane, W. Resch, R. Wang, D. R. Green, L. Tessarollo, R. Casellas, K. Zhao and D. Levens (2012). "c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells." Cell **151**(1): 68-79.

Novoa, I., Y. Zhang, H. Zeng, R. Jungreis, H. P. Harding and D. Ron (2003). "Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression." EMBO J **22**(5): 1180-1187.

Oda, K., N. Hosoda, H. Endo, K. Saito, K. Tsujihara, M. Yamamura, T. Sakata, N. Anzai, M. F. Wempe, Y. Kanai and H. Endou (2010). "L-type amino acid transporter 1 inhibitors inhibit tumor cell growth." Cancer Sci **101**(1): 173-179.

Oh, W. J. and E. Jacinto (2011). "mTOR complex 2 signaling and functions." Cell Cycle **10**(14): 2305-2316.

Oshiro, N., R. Takahashi, K. Yoshino, K. Tanimura, A. Nakashima, S. Eguchi, T. Miyamoto, K. Hara, K. Takehana, J. Avruch, U. Kikkawa and K. Yonezawa (2007). "The proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) is a physiological substrate of mammalian target of rapamycin complex 1." J Biol Chem **282**(28): 20329-20339.

Oskarsson, T., E. Batlle and J. Massague (2014). "Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways." Cell Stem Cell **14**(3): 306-321.

Owen, J. L., Y. Zhang, S. H. Bae, M. S. Farooqi, G. Liang, R. E. Hammer, J. L. Goldstein and M. S. Brown (2012). "Insulin stimulation of SREBP-1c processing in transgenic rat hepatocytes requires p70 S6-kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(40): 16184-16189.

Padmanabhan, B., K. I. Tong, T. Ohta, Y. Nakamura, M. Scharlock, M. Ohtsuji, M. I. Kang, A. Kobayashi, S. Yokoyama and M. Yamamoto (2006). "Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer." Mol Cell **21**(5): 689-700.

Palam, L. R., T. D. Baird and R. C. Wek (2011). "Phosphorylation of eIF2 facilitates ribosomal bypass of an inhibitory upstream ORF to enhance CHOP translation." J Biol Chem **286**(13): 10939-10949.

Palego, L., L. Betti, A. Rossi and G. Giannaccini (2016). "Tryptophan Biochemistry: Structural, Nutritional, Metabolic, and Medical Aspects in Humans." J Amino Acids **2016**: 8952520.

Palm, W., Y. Park, K. Wright, N. N. Pavlova, D. A. Tuveson and C. B. Thompson (2015). "The Utilization of Extracellular Proteins as Nutrients Is Suppressed by mTORC1." Cell **162**(2): 259-270.

Pan, Y., H. Chen, F. Siu and M. S. Kilberg (2003). "Amino acid deprivation and endoplasmic reticulum stress induce expression of multiple activating transcription factor-3 mRNA species that, when overexpressed in HepG2 cells, modulate transcription by the human asparagine synthetase promoter." J Biol Chem **278**(40): 38402-38412.

Pan, Y. X., H. Chen, M. M. Thiaville and M. S. Kilberg (2007). "Activation of the ATF3 gene through a co-ordinated amino acid-sensing response programme that controls transcriptional regulation of responsive genes following amino acid limitation." Biochem J **401**(1): 299-307.

Park, Y. Y., B. H. Sohn, R. L. Johnson, M. H. Kang, S. B. Kim, J. J. Shim, L. S. Mangala, J. H. Kim, J. E. Yoo, C. Rodriguez-Aguayo, S. Pradeep, J. E. Hwang, H. J. Jang, H. S. Lee, R. Rupaimoole, G. Lopez-Berestein, W. Jeong, I. S. Park, Y. N. Park, A. K. Sood, G. B. Mills and J. S. Lee (2016). "Yes-associated protein 1 and transcriptional coactivator with PDZ-binding motif activate the mammalian target of rapamycin complex 1 pathway by

regulating amino acid transporters in hepatocellular carcinoma." *Hepatology* **63**(1): 159-172.

Parks, S. K., J. Chiche and J. Pouyssegur (2013). "Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy." *Nat Rev Cancer* **13**(9): 611-623.

Parks, S. K., Y. Cormerais, I. Marchiq and J. Pouyssegur (2016). "Hypoxia optimises tumour growth by controlling nutrient import and acidic metabolite export." *Mol Aspects Med* **47-48**: 3-14.

Patel, S. A., B. A. Warren, J. F. Rhoderick and R. J. Bridges (2004). "Differentiation of substrate and non-substrate inhibitors of transport system xc(-): an obligate exchanger of L-glutamate and L-cystine." *Neuropharmacology* **46**(2): 273-284.

Pearce, L. R., X. Huang, J. Boudeau, R. Pawlowski, S. Wullschleger, M. Deak, A. F. Ibrahim, R. Gourlay, M. A. Magnuson and D. R. Alessi (2007). "Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2." *Biochem J* **405**(3): 513-522.

Pearce, L. R., E. M. Sommer, K. Sakamoto, S. Wullschleger and D. R. Alessi (2011). "Protor-1 is required for efficient mTORC2-mediated activation of SGK1 in the kidney." *Biochem J* **436**(1): 169-179.

Pece, S., D. Tosoni, S. Confalonieri, G. Mazzarol, M. Vecchi, S. Ronzoni, L. Bernard, G. Viale, P. G. Pelicci and P. P. Di Fiore (2010). "Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content." *Cell* **140**(1): 62-73.

Pende, M., S. H. Um, V. Mieulet, M. Sticker, V. L. Goss, J. Mestan, M. Mueller, S. Fumagalli, S. C. Kozma and G. Thomas (2004). "S6K1(-/-)/S6K2(-/-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway." *Mol Cell Biol* **24**(8): 3112-3124.

Peng, T., T. R. Golub and D. M. Sabatini (2002). "The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation." *Mol Cell Biol* **22**(15): 5575-5584.

Pereira, M. J., J. Palming, M. Rizell, M. Aureliano, E. Carvalho, M. K. Svensson and J. W. Eriksson (2013). "The immunosuppressive agents rapamycin, cyclosporin A and tacrolimus increase lipolysis, inhibit lipid storage and alter expression of genes involved in lipid metabolism in human adipose tissue." *Mol Cell Endocrinol* **365**(2): 260-269.

Peterson, T. R., M. Laplante, C. C. Thoreen, Y. Sancak, S. A. Kang, W. M. Kuehl, N. S. Gray and D. M. Sabatini (2009). "DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival." *Cell* **137**(5): 873-886.

Peterson, T. R., S. S. Sengupta, T. E. Harris, A. E. Carmack, S. A. Kang, E. Balderas, D. A. Guertin, K. L. Madden, A. E. Carpenter, B. N. Finck and D. M. Sabatini (2011). "mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway." *Cell* **146**(3): 408-420.

Pham, A. N., P. E. Blower, O. Alvarado, R. Ravula, P. W. Gout and Y. Huang (2010). "Pharmacogenomic approach reveals a role for the x(c)- cystine/glutamate antiporter in growth and celestrol resistance of glioma cell lines." *J Pharmacol Exp Ther* **332**(3): 949-958.

Poncet, N., F. E. Mitchell, A. F. Ibrahim, V. A. McGuire, G. English, J. S. Arthur, Y. B. Shi and P. M. Taylor (2014). "The catalytic subunit of the system L1 amino acid transporter (slc7a5) facilitates nutrient signalling in mouse skeletal muscle." *PLoS One* **9**(2): e89547.

Porstmann, T., C. R. Santos, B. Griffiths, M. Cully, M. Wu, S. Leever, J. R. Griffiths, Y. L. Chung and A. Schulze (2008). "SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth." *Cell Metab* **8**(3): 224-236.

Possemato, R., K. M. Marks, Y. D. Shaul, M. E. Pacold, D. Kim, K. Birsoy, S. Sethumadhavan, H. K. Woo, H. G. Jang, A. K. Jha, W. W. Chen, F. G. Barrett, N. Stransky, Z. Y. Tsun, G. S. Cowley, J. Barretina, N. Y. Kalaany, P. P. Hsu, K. Ottina, A. M. Chan, B. Yuan, L. A. Garraway, D. E. Root, M. Mino-Kenudson, E. F. Brachtel, E. M. Driggers and D. M. Sabatini (2011). "Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer." *Nature* **476**(7360): 346-350.

Potter, C. J., L. G. Pedraza and T. Xu (2002). "Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2." *Nat Cell Biol* **4**(9): 658-665.

Pouyssegur, J., F. Dayan and N. M. Mazure (2006). "Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression." *Nature* **441**(7092): 437-443.

Prager, G. W., C. C. Feral, C. Kim, J. Han and M. H. Ginsberg (2007). "CD98hc (SLC3A2) interaction with the integrin beta subunit cytoplasmic domain mediates adhesive signaling." *J Biol Chem* **282**(33): 24477-24484.

Proud, C. G. (2001). "Regulation of eukaryotic initiation factor eIF2B." *Prog Mol Subcell Biol* **26**: 95-114.

Pullen, N., P. B. Dennis, M. Andjelkovic, A. Dufner, S. C. Kozma, B. A. Hemmings and G. Thomas (1998). "Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1." *Science* **279**(5351): 707-710.

Qiu, H., J. Dong, C. Hu, C. S. Francklyn and A. G. Hinnebusch (2001). "The tRNA-binding moiety in GCN2 contains a dimerization domain that interacts with the kinase domain and is required for tRNA binding and kinase activation." *EMBO J* **20**(6): 1425-1438.

Rebsamen, M., L. Pochini, T. Stasyk, M. E. de Araujo, M. Galluccio, R. K. Kandasamy, B. Snijder, A. Fauster, E. L. Rudashevskaya, M. Bruckner, S. Scorzoni, P. A. Filipek, K. V. Huber, J. W. Bigenzahn, L. X. Heinz, C. Kraft, K. L. Bennett, C. Indiveri, L. A. Huber and G. Superti-Furga (2015). "SLC38A9 is a component of the lysosomal amino acid sensing machinery that controls mTORC1." *Nature* **519**(7544): 477-481.

Ren, P., M. Yue, D. Xiao, R. Xiu, L. Gan, H. Liu and G. Qing (2015). "ATF4 and N-Myc coordinate glutamine metabolism in MYCN-amplified neuroblastoma cells through ASCT2 activation." *J Pathol* **235**(1): 90-100.

Reue, K. (2009). "The lipin family: mutations and metabolism." *Curr Opin Lipidol* **20**(3): 165-170.

Rimaniol, A. C., P. Mialocq, P. Clayette, D. Dormont and G. Gras (2001). "Role of glutamate transporters in the regulation of glutathione levels in human macrophages." *Am J Physiol Cell Physiol* **281**(6): C1964-1970.

Rintoul, R. C., R. C. Buttery, A. C. Mackinnon, W. S. Wong, D. Mosher, C. Haslett and T. Sethi (2002). "Cross-linking CD98 promotes integrin-like signaling and anchorage-independent growth." *Mol Biol Cell* **13**(8): 2841-2852.

Robe, P. A., D. H. Martin, M. T. Nguyen-Khac, M. Artesi, M. Deprez, A. Albert, S. Vanbelle, S. Califice, M. Bredel and V. Bours (2009). "Early termination of ISRCTN45828668, a phase 1/2 prospective, randomized study of sulfasalazine for the treatment of progressing malignant gliomas in adults." *BMC Cancer* **9**: 372.

Roberts, P. J. and C. J. Der (2007). "Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer." *Oncogene* **26**(22): 3291-3310.

Robitaille, A. M., S. Christen, M. Shimobayashi, M. Cornu, L. L. Fava, S. Moes, C. Prescianotto-Baschong, U. Sauer, P. Jenoe and M. N. Hall (2013). "Quantitative phosphoproteomics reveal mTORC1 activates de novo pyrimidine synthesis." *Science* **339**(6125): 1320-1323.

Rosilio, C., M. Nebout, V. Imbert, E. Griessinger, Z. Neffati, J. Benadiba, T. Hagenbeek, H. Spits, J. Reverso, D. Ambrosetti, J. F. Michiels, B. Bailly-Maitre, H. Endou, M. F. Wempe and J. F. Peyron (2015). "L-type amino-acid transporter 1 (LAT1): a therapeutic target supporting growth and survival of T-cell lymphoblastic lymphoma/T-cell acute lymphoblastic leukemia." *Leukemia* **29**(6): 1253-1266.

Roux, P. P., B. A. Ballif, R. Anjum, S. P. Gygi and J. Blenis (2004). "Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(37): 13489-13494.

Roybal, C. N., L. A. Hunsaker, O. Barbash, D. L. Vander Jagt and S. F. Abcouwer (2005). "The oxidative stressor arsenite activates vascular endothelial growth factor mRNA transcription by an ATF4-dependent mechanism." *J Biol Chem* **280**(21): 20331-20339.

Ruggero, D., L. Montanaro, L. Ma, W. Xu, P. Londei, C. Cordon-Cardo and P. P. Pandolfi (2004). "The translation factor eIF-4E promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis." *Nat Med* **10**(5): 484-486.

Rzymiski, T., M. Milani, L. Pike, F. Buffa, H. R. Mellor, L. Winchester, I. Pires, E. Hammond, I. Ragoussis and A. L. Harris (2010). "Regulation of autophagy by ATF4 in response to severe hypoxia." *Oncogene* **29**(31): 4424-4435.

Sabatini, D. M., H. Erdjument-Bromage, M. Lui, P. Tempst and S. H. Snyder (1994). "RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs." *Cell* **78**(1): 35-43.

Sakata, T., G. Ferdous, T. Tsuruta, T. Satoh, S. Baba, T. Muto, A. Ueno, Y. Kanai, H. Endou and I. Okayasu (2009). "L-type amino-acid transporter 1 as a novel biomarker for high-grade malignancy in prostate cancer." *Pathol Int* **59**(1): 7-18.

Sancak, Y., L. Bar-Peled, R. Zoncu, A. L. Markhard, S. Nada and D. M. Sabatini (2010). "Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids." *Cell* **141**(2): 290-303.

Sancak, Y., T. R. Peterson, Y. D. Shaul, R. A. Lindquist, C. C. Thoreen, L. Bar-Peled and D. M. Sabatini (2008). "The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1." *Science* **320**(5882): 1496-1501.

Sancak, Y., C. C. Thoreen, T. R. Peterson, R. A. Lindquist, S. A. Kang, E. Spooner, S. A. Carr and D. M. Sabatini (2007). "PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase." *Mol Cell* **25**(6): 903-915.

Sang, J., Y. P. Lim, M. Panzica, P. Finch and N. L. Thompson (1995). "TA1, a highly conserved oncofetal complementary DNA from rat hepatoma, encodes an integral membrane protein associated with liver development, carcinogenesis, and cell activation." *Cancer Res* **55**(5): 1152-1159.

Sarbassov, D. D., S. M. Ali, D. H. Kim, D. A. Guertin, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. M. Sabatini (2004). "Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton." *Curr Biol* **14**(14): 1296-1302.

Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali and D. M. Sabatini (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." *Science* **307**(5712): 1098-1101.

Sato, H., K. Fujiwara, J. Sagara and S. Bannai (1995). "Induction of cystine transport activity in mouse peritoneal macrophages by bacterial lipopolysaccharide." Biochem J **310 (Pt 2)**: 547-551.

Sato, H., S. Nomura, K. Maebara, K. Sato, M. Tamba and S. Bannai (2004). "Transcriptional control of cystine/glutamate transporter gene by amino acid deprivation." Biochem Biophys Res Commun **325(1)**: 109-116.

Sato, H., A. Shiiya, M. Kimata, K. Maebara, M. Tamba, Y. Sakakura, N. Makino, F. Sugiyama, K. Yagami, T. Moriguchi, S. Takahashi and S. Bannai (2005). "Redox imbalance in cystine/glutamate transporter-deficient mice." J Biol Chem **280(45)**: 37423-37429.

Savaskan, N. E., A. Heckel, E. Hahnen, T. Engelhorn, A. Doerfler, O. Ganslandt, C. Nimsky, M. Buchfelder and I. Y. Eyupoglu (2008). "Small interfering RNA-mediated xCT silencing in gliomas inhibits neurodegeneration and alleviates brain edema." Nat Med **14(6)**: 629-632.

Schieke, S. M., D. Phillips, J. P. McCoy, Jr., A. M. Aponte, R. F. Shen, R. S. Balaban and T. Finkel (2006). "The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity." J Biol Chem **281(37)**: 27643-27652.

Schroder, W. A., M. Buck, N. Cloonan, J. F. Hancock, A. Suhrbier, T. Sculley and G. Bushell (2007). "Human Sin1 contains Ras-binding and pleckstrin homology domains and suppresses Ras signalling." Cell Signal **19(6)**: 1279-1289.

Schurmann, A., A. Brauers, S. Massmann, W. Becker and H. G. Joost (1995). "Cloning of a novel family of mammalian GTP-binding proteins (RagA, RagBs, RagB1) with remote similarity to the Ras-related GTPases." J Biol Chem **270(48)**: 28982-28988.

Sekiguchi, T., E. Hirose, N. Nakashima, M. Ii and T. Nishimoto (2001). "Novel G proteins, Rag C and Rag D, interact with GTP-binding proteins, Rag A and Rag B." J Biol Chem **276(10)**: 7246-7257.

Selwan, E. M., B. T. Finicle, S. M. Kim and A. L. Edinger (2016). "Attacking the supply wagons to starve cancer cells to death." FEBS Lett **590(7)**: 885-907.

Semenza, G. L. (2013). "HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations." J Clin Invest **123(9)**: 3664-3671.

Sengupta, S., T. R. Peterson, M. Laplante, S. Oh and D. M. Sabatini (2010). "mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing." Nature **468(7327)**: 1100-1104.

Settembre, C., R. Zoncu, D. L. Medina, F. Vetrini, S. Erdin, S. Erdin, T. Huynh, M. Ferron, G. Karsenty, M. C. Vellard, V. Facchinetti, D. M. Sabatini and A. Ballabio (2012). "A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB." *EMBO J* **31**(5): 1095-1108.

Shahbazian, D., P. P. Roux, V. Mieulet, M. S. Cohen, B. Raught, J. Taunton, J. W. Hershey, J. Blenis, M. Pende and N. Sonenberg (2006). "The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity." *EMBO J* **25**(12): 2781-2791.

Shaw, R. J. and L. C. Cantley (2006). "Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth." *Nature* **441**(7092): 424-430.

Shaw, R. J., M. Kosmatka, N. Bardeesy, R. L. Hurley, L. A. Witters, R. A. DePinho and L. C. Cantley (2004). "The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(10): 3329-3335.

Shen, W. J., S. Patel, V. Natsu and F. B. Kraemer (1998). "Mutational analysis of structural features of rat hormone-sensitive lipase." *Biochemistry* **37**(25): 8973-8979.

Shima, H., M. Pende, Y. Chen, S. Fumagalli, G. Thomas and S. C. Kozma (1998). "Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase." *EMBO J* **17**(22): 6649-6659.

Shumway, S. D., Y. Li and Y. Xiong (2003). "14-3-3beta binds to and negatively regulates the tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) tumor suppressor gene product, tuberin." *J Biol Chem* **278**(4): 2089-2092.

Singh, A., V. Misra, R. K. Thimmulappa, H. Lee, S. Ames, M. O. Hoque, J. G. Herman, S. B. Baylin, D. Sidransky, E. Gabrielson, M. V. Brock and S. Biswal (2006). "Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer." *PLoS Med* **3**(10): e420.

Sipula, I. J., N. F. Brown and G. Perdomo (2006). "Rapamycin-mediated inhibition of mammalian target of rapamycin in skeletal muscle cells reduces glucose utilization and increases fatty acid oxidation." *Metabolism* **55**(12): 1637-1644.

Soliman, G. A., H. A. Acosta-Jaquez and D. C. Fingar (2010). "mTORC1 inhibition via rapamycin promotes triacylglycerol lipolysis and release of free fatty acids in 3T3-L1 adipocytes." *Lipids* **45**(12): 1089-1100.

Steinhardt, A. A., M. F. Gayyed, A. P. Klein, J. Dong, A. Maitra, D. Pan, E. A. Montgomery and R. A. Anders (2008). "Expression of Yes-associated protein in common solid tumors." *Hum Pathol* **39**(11): 1582-1589.

Stolboushkina, E. A. and M. B. Garber (2011). "Eukaryotic type translation initiation factor 2: structure-functional aspects." Biochemistry (Mosc) **76**(3): 283-294.

Stolovich, M., H. Tang, E. Hornstein, G. Levy, R. Cohen, S. S. Bae, M. J. Birnbaum and O. Meyuhas (2002). "Transduction of growth or mitogenic signals into translational activation of TOP mRNAs is fully reliant on the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathway but requires neither S6K1 nor rpS6 phosphorylation." Mol Cell Biol **22**(23): 8101-8113.

Su, N. and M. S. Kilberg (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**(50): 35106-35117.

Sung, S., J. Choi and H. Cheong (2015). "Catabolic pathways regulated by mTORC1 are pivotal for survival and growth of cancer cells expressing mutant Ras." Oncotarget **6**(38): 40405-40417.

Tanaka, K., I. Babic, D. Nathanson, D. Akhavan, D. Guo, B. Gini, J. Dang, S. Zhu, H. Yang, J. De Jesus, A. N. Amzajerdi, Y. Zhang, C. C. Dibble, H. Dan, A. Rinckenbaugh, W. H. Yong, H. V. Vinters, J. F. Gera, W. K. Cavenee, T. F. Cloughesy, B. D. Manning, A. S. Baldwin and P. S. Mischel (2011). "Oncogenic EGFR signaling activates an mTORC2-NF-kappaB pathway that promotes chemotherapy resistance." Cancer Discov **1**(6): 524-538.

Tang, H., E. Hornstein, M. Stolovich, G. Levy, M. Livingstone, D. Templeton, J. Avruch and O. Meyuhas (2001). "Amino acid-induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on phosphatidylinositol 3-kinase-mediated signaling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation." Mol Cell Biol **21**(24): 8671-8683.

Tee, A. R., R. Anjum and J. Blenis (2003). "Inactivation of the tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products occurs by phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent and -independent phosphorylation of tuberin." J Biol Chem **278**(39): 37288-37296.

Thedieck, K., P. Polak, M. L. Kim, K. D. Molle, A. Cohen, P. Jenö, C. Arriemerlou and M. N. Hall (2007). "PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis." PLoS One **2**(11): e1217.

Thiaville, M. M., E. E. Dudenhausen, C. Zhong, Y. X. Pan and M. S. Kilberg (2008). "Deprivation of protein or amino acid induces C/EBPbeta synthesis and binding to amino acid response elements, but its action is not an absolute requirement for enhanced transcription." Biochem J **410**(3): 473-484.

Thomas, G. (2000). "An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation." Nat Cell Biol **2**(5): E71-72.

Thoreen, C. C., L. Chantranupong, H. R. Keys, T. Wang, N. S. Gray and D. M. Sabatini (2012). "A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation." Nature **485**(7396): 109-113.

Thoreen, C. C., S. A. Kang, J. W. Chang, Q. Liu, J. Zhang, Y. Gao, L. J. Reichling, T. Sim, D. M. Sabatini and N. S. Gray (2009). "An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1." J Biol Chem **284**(12): 8023-8032.

Timmerman, L. A., T. Holton, M. Yuneva, R. J. Louie, M. Padro, A. Daemen, M. Hu, D. A. Chan, S. P. Ethier, L. J. van 't Veer, K. Polyak, F. McCormick and J. W. Gray (2013). "Glutamine sensitivity analysis identifies the xCT antiporter as a common triple-negative breast tumor therapeutic target." Cancer Cell **24**(4): 450-465.

Tsun, Z. Y., L. Bar-Peled, L. Chantranupong, R. Zoncu, T. Wang, C. Kim, E. Spooner and D. M. Sabatini (2013). "The folliculin tumor suppressor is a GAP for the RagC/D GTPases that signal amino acid levels to mTORC1." Mol Cell **52**(4): 495-505.

Tsun, Z. Y. and R. Possemato (2015). "Amino acid management in cancer." Semin Cell Dev Biol **43**: 22-32.

Ueda, K., H. Kawashima, S. Ohtani, W. G. Deng, M. Ravoori, J. Bankson, B. Gao, L. Girard, J. D. Minna, J. A. Roth, V. Kundra and L. Ji (2006). "The 3p21.3 tumor suppressor NPRL2 plays an important role in cisplatin-induced resistance in human non-small-cell lung cancer cells." Cancer Res **66**(19): 9682-9690.

Utsunomiya-Tate, N., H. Endou and Y. Kanai (1996). "Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na⁺-dependent neutral amino acid transporter." J Biol Chem **271**(25): 14883-14890.

van Geldermalsen, M., Q. Wang, R. Nagarajah, A. D. Marshall, A. Thoeng, D. Gao, W. Ritchie, Y. Feng, C. G. Bailey, N. Deng, K. Harvey, J. M. Beith, C. I. Selinger, S. A. O'Toole, J. E. Rasko and J. Holst (2015). "ASCT2/SLC1A5 controls glutamine uptake and tumour growth in triple-negative basal-like breast cancer." Oncogene.

Vattem, K. M. and R. C. Wek (2004). "Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(31): 11269-11274.

Verrey, F., E. I. Closs, C. A. Wagner, M. Palacin, H. Endou and Y. Kanai (2004). "CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters." Pflugers Arch **447**(5): 532-542.

Verschoor, M. L. and G. Singh (2013). "Ets-1 regulates intracellular glutathione levels: key target for resistant ovarian cancer." Mol Cancer **12**(1): 138.

Vezina, C., A. Kudelski and S. N. Sehgal (1975). "Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle." J Antibiot (Tokyo) **28**(10): 721-726.

Vilar, E., J. Perez-Garcia and J. Tabernero (2011). "Pushing the envelope in the mTOR pathway: the second generation of inhibitors." Mol Cancer Ther **10**(3): 395-403.

Wander, S. A., B. T. Hennessy and J. M. Slingerland (2011). "Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathway complexity informs therapeutic strategy." J Clin Invest **121**(4): 1231-1241.

Wang, L., T. E. Harris, R. A. Roth and J. C. Lawrence, Jr. (2007). "PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding." J Biol Chem **282**(27): 20036-20044.

Wang, Q., C. G. Bailey, C. Ng, J. Tiffen, A. Thoeng, V. Minhas, M. L. Lehman, S. C. Hendy, G. Buchanan, C. C. Nelson, J. E. Rasko and J. Holst (2011). "Androgen receptor and nutrient signaling pathways coordinate the demand for increased amino acid transport during prostate cancer progression." Cancer Res **71**(24): 7525-7536.

Wang, Q., K. A. Beaumont, N. J. Otte, J. Font, C. G. Bailey, M. van Geldermalsen, D. M. Sharp, J. C. Tiffen, R. M. Ryan, M. Jormakka, N. K. Haass, J. E. Rasko and J. Holst (2014). "Targeting glutamine transport to suppress melanoma cell growth." Int J Cancer **135**(5): 1060-1071.

Wang, Q., R. A. Hardie, A. J. Hoy, M. van Geldermalsen, D. Gao, L. Fazli, M. C. Sadowski, S. Balaban, M. Schreuder, R. Nagarajah, J. J. Wong, C. Metierre, N. Pinello, N. J. Otte, M. L. Lehman, M. Gleave, C. C. Nelson, C. G. Bailey, W. Ritchie, J. E. Rasko and J. Holst (2015). "Targeting ASCT2-mediated glutamine uptake blocks prostate cancer growth and tumour development." J Pathol **236**(3): 278-289.

Wang, S., Z. Y. Tsun, R. L. Wolfson, K. Shen, G. A. Wyant, M. E. Plovanich, E. D. Yuan, T. D. Jones, L. Chantranupong, W. Comb, T. Wang, L. Bar-Peled, R. Zoncu, C. Straub, C. Kim, J. Park, B. L. Sabatini and D. M. Sabatini (2015). "Metabolism. Lysosomal amino acid transporter SLC38A9 signals arginine sufficiency to mTORC1." Science **347**(6218): 188-194.

Wang, X., W. Li, M. Williams, N. Terada, D. R. Alessi and C. G. Proud (2001). "Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase." EMBO J **20**(16): 4370-4379.

Wang, X. Z., M. Kuroda, J. Sok, N. Batchvarova, R. Kimmel, P. Chung, H. Zinszner and D. Ron (1998). "Identification of novel stress-induced genes downstream of chop." EMBO J **17**(13): 3619-3630.

Wang, Y., Y. Ning, G. N. Alam, B. M. Jankowski, Z. Dong, J. E. Nor and P. J. Polverini (2013). "Amino acid deprivation promotes tumor angiogenesis through the GCN2/ATF4 pathway." Neoplasia **15**(8): 989-997.

Weiler, M., J. Blaes, S. Pusch, F. Sahm, M. Czabanka, S. Luger, L. Bunse, G. Solecki, V. Eichwald, M. Jugold, S. Hodecker, M. Osswald, C. Meisner, T. Hielscher, P. Rubmann, P. N. Pfenning, M. Ronellenfitsch, T. Kempf, M. Schnolzer, A. Abdollahi, F. Lang, M. Bendszus, A. von Deimling, F. Winkler, M. Weller, P. Vajkoczy, M. Platten and W. Wick (2014). "mTOR target NDRG1 confers MGMT-dependent resistance to alkylating chemotherapy." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(1): 409-414.

Welti, J., S. Loges, S. Dimmeler and P. Carmeliet (2013). "Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer." J Clin Invest **123**(8): 3190-3200.

Wendel, H. G., E. De Stanchina, J. S. Fridman, A. Malina, S. Ray, S. Kogan, C. Cordon-Cardo, J. Pelletier and S. W. Lowe (2004). "Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy." Nature **428**(6980): 332-337.

Whitney, M. L., L. S. Jefferson and S. R. Kimball (2009). "ATF4 is necessary and sufficient for ER stress-induced upregulation of REDD1 expression." Biochem Biophys Res Commun **379**(2): 451-455.

Willems, L., N. Jacque, A. Jacquet, N. Neveux, T. T. Maciel, M. Lambert, A. Schmitt, L. Poulain, A. S. Green, M. Uzunov, O. Kosmider, I. Radford-Weiss, I. C. Moura, P. Auburger, N. Ifrah, V. Bardet, N. Chapuis, C. Lacombe, P. Mayeux, J. Tamburini and D. Bouscary (2013). "Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia." Blood **122**(20): 3521-3532.

Wise, D. R., R. J. DeBerardinis, A. Mancuso, N. Sayed, X. Y. Zhang, H. K. Pfeiffer, I. Nissim, E. Daikhin, M. Yudkoff, S. B. McMahon and C. B. Thompson (2008). "Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(48): 18782-18787.

Wise, D. R. and C. B. Thompson (2010). "Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer." Trends Biochem Sci **35**(8): 427-433.

Wolf, D. A., S. Wang, M. A. Panzica, N. H. Bassily and N. L. Thompson (1996). "Expression of a highly conserved oncofetal gene, TA1/E16, in human colon carcinoma and other primary cancers: homology to *Schistosoma mansoni* amino acid permease and *Caenorhabditis elegans* gene products." Cancer Res **56**(21): 5012-5022.

Wolfson, R. L., L. Chantranupong, R. A. Saxton, K. Shen, S. M. Scaria, J. R. Cantor and D. M. Sabatini (2016). "Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway." Science **351**(6268): 43-48.

Wu, S. H., J. F. Bi, T. Cloughesy, W. K. Cavenee and P. S. Mischel (2014). "Emerging function of mTORC2 as a core regulator in glioblastoma: metabolic reprogramming and drug resistance." Cancer Biol Med **11**(4): 255-263.

Xiao, F., Z. Huang, H. Li, J. Yu, C. Wang, S. Chen, Q. Meng, Y. Cheng, X. Gao, J. Li, Y. Liu and F. Guo (2011). "Leucine deprivation increases hepatic insulin sensitivity via GCN2/mTOR/S6K1 and AMPK pathways." Diabetes **60**(3): 746-756.

Yamaguchi, H. and H. G. Wang (2004). "CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells." J Biol Chem **279**(44): 45495-45502.

Yanagida, O., Y. Kanai, A. Chairoungdua, D. K. Kim, H. Segawa, T. Nii, S. H. Cha, H. Matsuo, J. Fukushima, Y. Fukasawa, Y. Tani, Y. Taketani, H. Uchino, J. Y. Kim, J. Inatomi, I. Okayasu, K. Miyamoto, E. Takeda, T. Goya and H. Endou (2001). "Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines." Biochim Biophys Acta **1514**(2): 291-302.

Yanagisawa, N., M. Ichinoe, T. Mikami, N. Nakada, K. Hana, W. Koizumi, H. Endou and I. Okayasu (2012). "High expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinomas." J Clin Pathol **65**(11): 1019-1023.

Yang, X., K. Matsuda, P. Bialek, S. Jacquot, H. C. Masuoka, T. Schinke, L. Li, S. Brancorsini, P. Sassone-Corsi, T. M. Townes, A. Hanauer and G. Karsenty (2004). "ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome." Cell **117**(3): 387-398.

Yang, Z. and D. J. Klionsky (2010). "Eaten alive: a history of macroautophagy." Nat Cell Biol **12**(9): 814-822.

Ye, J., M. Kumanova, L. S. Hart, K. Sloane, H. Zhang, D. N. De Panis, E. Bobrovnikova-Marjon, J. A. Diehl, D. Ron and C. Koumenis (2010). "The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation." EMBO J **29**(12): 2082-2096.

Ye, J., A. Mancuso, X. Tong, P. S. Ward, J. Fan, J. D. Rabinowitz and C. B. Thompson (2012). "Pyruvate kinase M2 promotes de novo serine synthesis to sustain mTORC1 activity and cell proliferation." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(18): 6904-6909.

Ye, J., W. Palm, M. Peng, B. King, T. Lindsten, M. O. Li, C. Koumenis and C. B. Thompson (2015). "GCN2 sustains mTORC1 suppression upon amino acid deprivation by inducing Sestrin2." Genes Dev **29**(22): 2331-2336.

Ye, P., J. Mimura, T. Okada, H. Sato, T. Liu, A. Maruyama, C. Ohyama and K. Itoh (2014). "Nrf2- and ATF4-dependent upregulation of xCT modulates the sensitivity of T24 bladder carcinoma cells to proteasome inhibition." Mol Cell Biol **34**(18): 3421-3434.

Ye, Z. C. and H. Sontheimer (1999). "Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate." Cancer Res **59**(17): 4383-4391.

Yecies, J. L., H. H. Zhang, S. Menon, S. Liu, D. Yecies, A. I. Lipovsky, C. Gorgun, D. J. Kwiatkowski, G. S. Hotamisligil, C. H. Lee and B. D. Manning (2011). "Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways." Cell Metab **14**(1): 21-32.

Yogurtcu, B., I. Hatemi, I. Aydin and N. Buyru (2012). "NPRL2 gene expression in the progression of colon tumors." Genet Mol Res **11**(4): 4810-4816.

Yoshikawa, M., K. Tsuchihashi, T. Ishimoto, T. Yae, T. Motohara, E. Sugihara, N. Onishi, T. Masuko, K. Yoshizawa, S. Kawashiri, M. Mukai, S. Asoda, H. Kawana, T. Nakagawa, H. Saya and O. Nagano (2013). "xCT inhibition depletes CD44v-expressing tumor cells that are resistant to EGFR-targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma." Cancer Res **73**(6): 1855-1866.

Young, A. R., M. Narita, M. Ferreira, K. Kirschner, M. Sadaie, J. F. Darot, S. Tavaré, S. Arakawa, S. Shimizu, F. M. Watt and M. Narita (2009). "Autophagy mediates the mitotic senescence transition." Genes Dev **23**(7): 798-803.

Yu, F. X., B. Zhao and K. L. Guan (2015). "Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer." Cell **163**(4): 811-828.

Yu, K., L. Toral-Barza, C. Shi, W. G. Zhang, J. Lucas, B. Shor, J. Kim, J. Verheijen, K. Curran, D. J. Malwitz, D. C. Cole, J. Ellingboe, S. Ayrál-Kaloustian, T. S. Mansour, J. J. Gibbons, R. T. Abraham, P. Nowak and A. Zask (2009). "Biochemical, cellular, and in vivo activity of novel ATP-competitive and selective inhibitors of the mammalian target of rapamycin." Cancer Res **69**(15): 6232-6240.

Yuan, M., E. Pino, L. Wu, M. Kacergis and A. A. Soukas (2012). "Identification of Akt-independent regulation of hepatic lipogenesis by mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 2." J Biol Chem **287**(35): 29579-29588.

Yun, D. W., S. A. Lee, M. G. Park, J. S. Kim, S. K. Yu, M. R. Park, S. G. Kim, J. S. Oh, C. S. Kim, H. J. Kim, J. S. Kim, H. S. Chun, Y. Kanai, H. Endou, M. F. Wempe and D. K. Kim (2014). "JPH203, an L-type amino acid transporter 1-selective compound, induces apoptosis of YD-38 human oral cancer cells." J Pharmacol Sci **124**(2): 208-217.

Zaytseva, Y. Y., J. D. Valentino, P. Gulhati and B. M. Evers (2012). "mTOR inhibitors in cancer therapy." Cancer Lett **319**(1): 1-7.

Zevenbergen, C., M. E. Meima, E. C. Lima de Souza, R. P. Peeters, A. Kinne, G. Krause, W. E. Visser and T. J. Visser (2015). "Transport of Iodothyronines by Human L-Type Amino Acid Transporters." Endocrinology **156**(11): 4345-4355.

Zhang, P., B. C. McGrath, J. Reinert, D. S. Olsen, L. Lei, S. Gill, S. A. Wek, K. M. Vattam, R. C. Wek, S. R. Kimball, L. S. Jefferson and D. R. Cavener (2002). "The GCN2 eIF2alpha kinase is required for adaptation to amino acid deprivation in mice." Mol Cell Biol **22**(19): 6681-6688.

Zhang, P., A. Singh, S. Yegnasubramanian, D. Esopi, P. Kombairaju, M. Bodas, H. Wu, S. G. Bova and S. Biswal (2010). "Loss of Kelch-like ECH-associated protein 1 function in prostate cancer cells causes chemoresistance and radioresistance and promotes tumor growth." Mol Cancer Ther **9**(2): 336-346.

Zhang, Y., J. Nicholatos, J. R. Dreier, S. J. Ricoult, S. B. Widenmaier, G. S. Hotamisligil, D. J. Kwiatkowski and B. D. Manning (2014). "Coordinated regulation of protein synthesis and degradation by mTORC1." Nature **513**(7518): 440-443.

Zhao, B., X. Ye, J. Yu, L. Li, W. Li, S. Li, J. Yu, J. D. Lin, C. Y. Wang, A. M. Chinnaiyan, Z. C. Lai and K. L. Guan (2008). "TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control." Genes Dev **22**(14): 1962-1971.

Zhao, Y., X. Xiong and Y. Sun (2011). "DEPTOR, an mTOR inhibitor, is a physiological substrate of SCF(betaTrCP) E3 ubiquitin ligase and regulates survival and autophagy." Mol Cell **44**(2): 304-316.

Zinzalla, V., D. Stracka, W. Oppliger and M. N. Hall (2011). "Activation of mTORC2 by association with the ribosome." Cell **144**(5): 757-768.

Zoncu, R., L. Bar-Peled, A. Efeyan, S. Wang, Y. Sancak and D. M. Sabatini (2011). "mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase." Science **334**(6056): 678-683.

Zoncu, R., A. Efeyan and D. M. Sabatini (2011). "mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(1): 21-35.

ANNEXES

Cette section présente deux publications et un manuscrit :

PUBLICATIONS

(Giuliano S, Cormerais Y, *et al.* Autophagy 2015)

-

Resistance to sunitinib in renal clear cell carcinoma results from sequestration in lysosomes and inhibition of the autophagic flux

(Parks SK, Cormerais Y, *et al.* Mol Aspects Med. 2016)

-

Hypoxia optimizes tumour growth by controlling nutrient import and acidic metabolite export

MANUSCRIT

(Courtial L, Picco V, Grover R, Cormerais Y, *et al.*)

-

An evolutionarily conserved role for the MAP Kinase JNK in the prevention of adverse ROS production in early response to UV and thermal stresses

Resistance to sunitinib in renal clear cell carcinoma results from sequestration in lysosomes and inhibition of the autophagic flux

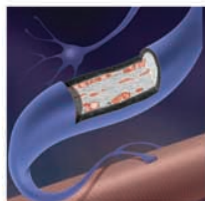
Giuliano S, **Cormerais Y**, Dufies M, Grépin R, Colosetti P, Belaid A, Parola J, Martin A, Lacas-Gervais S, Mazure NM, Benhida R, Auberger P, Mograbi B, Pagès G.

(Article publié dans le journal Autophagy en Aout 2015)

Abstract

Metastatic renal cell carcinomas (mRCC) are highly vascularized tumors that are a paradigm for the treatment with antiangiogenesis drugs targeting the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway. The available drugs increase the time to progression but are not curative and the patients eventually relapse. In this study we have focused our attention on the molecular mechanisms leading to resistance to sunitinib, the first line treatment of mRCC. Because of the anarchic vascularization of tumors the core of mRCC tumors receives only suboptimal concentrations of the drug. To mimic this in vivo situation, which is encountered in a neoadjuvant setting, we exposed sunitinib-sensitive mRCC cells to concentrations of sunitinib below the concentration of the drug that gives 50% inhibition of cell proliferation (IC50). At these concentrations, sunitinib accumulated in lysosomes, which downregulated the activity of the lysosomal protease CTSB (cathepsin B) and led to incomplete autophagic flux. Amino acid deprivation initiates autophagy enhanced sunitinib resistance through the amplification of autolysosome formation. Sunitinib stimulated the expression of ABCB1 (ATP-binding cassette, sub-family B [MDR/TAP], member 1), which participates in the accumulation of the drug in autolysosomes and favor its cellular efflux. Inhibition of this transporter by elacridar or the permeabilization of lysosome membranes with Leu-Leu-O-methyl (LLOM) resensitized mRCC cells that were resistant to concentrations of sunitinib superior to the IC50. Proteasome inhibitors also induced the death of resistant cells suggesting that the ubiquitin-proteasome system compensates inhibition of

autophagy to maintain a cellular homeostasis. Based on our results we propose a new therapeutic approach combining sunitinib with molecules that prevent lysosomal accumulation or inhibit the proteasome.



Autophagy



ISSN: 1554-8627 (Print) 1554-8635 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/kaup20>

Resistance to sunitinib in renal clear cell carcinoma results from sequestration in lysosomes and inhibition of the autophagic flux

Sandy Giuliano, Yann Cormerais, Maeva Dufies, Renaud Grépin, Pascal Colosetti, Amine Belaid, Julien Parola, Anthony Martin, Sandra Lacas-Gervais, Nathalie M Mazure, Rachid Benhida, Patrick Auberger, Baharia Mograbi & Gilles Pagès

To cite this article: Sandy Giuliano, Yann Cormerais, Maeva Dufies, Renaud Grépin, Pascal Colosetti, Amine Belaid, Julien Parola, Anthony Martin, Sandra Lacas-Gervais, Nathalie M Mazure, Rachid Benhida, Patrick Auberger, Baharia Mograbi & Gilles Pagès (2015) Resistance to sunitinib in renal clear cell carcinoma results from sequestration in lysosomes and inhibition of the autophagic flux, *Autophagy*, 11:10, 1891-1904, DOI: [10.1080/15548627.2015.1085742](https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1085742)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2015.1085742>



View supplementary material [↗](#)



Accepted author version posted online: 27 Aug 2015.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 189



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Resistance to sunitinib in renal clear cell carcinoma results from sequestration in lysosomes and inhibition of the autophagic flux

Sandy Giuliano,¹ Yann Cormerais,² Maeva Dufies,¹ Renaud Grépin,² Pascal Colosetti,³ Amine Belaid,¹ Julien Parola,⁴ Anthony Martin,⁵ Sandra Lacas-Gervais,⁶ Nathalie M Mazure,¹ Rachid Benhida,⁵ Patrick Auberger,³ Baharia Mograbi,¹ and Gilles Pagès^{1,*}

¹University of Nice Sophia Antipolis; Institute for Research on Cancer and Aging of Nice; UMR CNRS 7284; INSERM; Nice, France; ²Centre Scientifique de Monaco; Biomedical Department; Monaco, Principality of Monaco; ³University of Nice Sophia Antipolis; Center Méditerranéen de Médecine Moléculaire; INSERM; Nice, France; ⁴Centre Antoine Lacassagne; Nice, France; ⁵University of Nice Sophia Antipolis; Institut de Chimie de Nice; UMR CNRS 7272; Nice, France; ⁶University of Nice Sophia Antipolis; Center de Microscopie Appliquée; Nice, France

Keywords: angiogenesis, elacridar, Leu-Leu-O-Methyl, lysosome, proteasome inhibitors, renal cell carcinoma, resistance, sunitinib

Abbreviations: ABCB1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1; ATF4, activating transcription factor 4; CTSB, cathepsin B; CHL, chloroquine; EEA1, early endosome antigen 1; FACS, fluorescence-activated cell sorting; HBSS, Hank's balanced salt solution; IC50, concentration of a drug that gives 50% inhibition of cell proliferation; LAMP1/2, lysosomal-associated membrane protein 1/2; MAP1LC3A/LC3A, microtubule-associated protein 1 light chain 3 α ; MAP1LC3-II/LC3-II, lipidated forms of LC3; LLOM, Leu-Leu-O-methyl; MAPK1/2/3, mitogen-activated protein kinase1/2/3; mRCC, metastatic renal cell carcinomas; NAA10/ARD1, N(α)-acetyltransferase 10, NatA catalytic subunit; PSMB8/9/10, proteasome (prosome macropain) subunit, β type 8/9/10; PSMF1, proteasome (prosome macropain) inhibitor subunit 1 (PI31); SQSTM1/p62, sequestosome 1; V-ATPase, vacuolar-type ATPase; VEGFA/C, vascular endothelial growth factor A/C.

Metastatic renal cell carcinomas (mRCC) are highly vascularized tumors that are a paradigm for the treatment with antiangiogenesis drugs targeting the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway. The available drugs increase the time to progression but are not curative and the patients eventually relapse. In this study we have focused our attention on the molecular mechanisms leading to resistance to sunitinib, the first line treatment of mRCC. Because of the anarchic vascularization of tumors the core of mRCC tumors receives only suboptimal concentrations of the drug. To mimic this in vivo situation, which is encountered in a neoadjuvant setting, we exposed sunitinib-sensitive mRCC cells to concentrations of sunitinib below the concentration of the drug that gives 50% inhibition of cell proliferation (IC50). At these concentrations, sunitinib accumulated in lysosomes, which downregulated the activity of the lysosomal protease CTSB (cathepsin B) and led to incomplete autophagic flux. Amino acid deprivation initiates autophagy enhanced sunitinib resistance through the amplification of autolysosome formation. Sunitinib stimulated the expression of ABCB1 (ATP-binding cassette, sub-family B [MDR/TAP], member 1), which participates in the accumulation of the drug in autolysosomes and favor its cellular efflux. Inhibition of this transporter by elacridar or the permeabilization of lysosome membranes with Leu-Leu-O-methyl (LLOM) resensitized mRCC cells that were resistant to concentrations of sunitinib superior to the IC50. Proteasome inhibitors also induced the death of resistant cells suggesting that the ubiquitin-proteasome system compensates inhibition of autophagy to maintain a cellular homeostasis. Based on our results we propose a new therapeutic approach combining sunitinib with molecules that prevent lysosomal accumulation or inhibit the proteasome.

Introduction

A large number of drugs currently used in the clinic are weak bases that make them lysosomotropic. These drugs are extensively sequestered in acidic lysosomes through an ion-trapping mechanism. Drug accumulation in lysosomes is driven by the large pH gradient that exists across the lumen

of the organelle and the cytosol. Lysosomal sequestration can directly influence the activity of the drug by preventing its availability to bind with intended intracellular targets. In addition, some cancer cells have acquired an enhanced ability to sequester anticancer drugs in lysosomes, which constitutes a mechanism of drug resistance. The clear cell form of kidney cancers, the most represented one, is characterized

*Correspondence to: Gilles Pagès; Email: gpages@unice.fr

Submitted: 01/09/2015; Revised: 07/24/2015; Accepted: 08/06/2015
<http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2015.1085742>

by VHL/von Hippel-Lindau mutations and deletions which lead to stabilization of HIF1A (hypoxia inducible factor 1, α subunit [basic helix-loop-helix transcription factor]) protein and consequent overexpression of VEGFA (vascular endothelial growth factor A). This feature has rendered mRCC attractive targets for the treatment with antiangiogenesis drugs, particularly with the development of tyrosine kinase inhibitors targeting the VEGF (KDR, FLT1, FLT4) and the PDGF (PDGFRB) receptors, both implicated in proliferation of endothelial cells and pericytes. These inhibitors include notably sunitinib,¹ which since 2006 is considered as the standard first line treatment option for this disease. Hence, we have analyzed the tumor cell fate with chronic exposure to the drug. Such a question may seem inappropriate since sunitinib was originally defined as an antiangiogenesis compound that inhibits endothelial cell proliferation. However, we and others have recently shown that sunitinib also inhibits mRCC cell proliferation probably because they aberrantly express the tyrosine kinase receptors targeted by the drug therefore leading to the selection of resistant cells.^{2,3} Sunitinib has been designed to disrupt major signaling pathways (HRAS-RAF1-MAP2K1/2-MAPK1/3 and MTOR pathways) that are responsible for the abnormal proliferation of cancer cells and tumor angiogenesis.⁴ However, sunitinib has not significantly improved the overall survival of the majority of patients compared to treatment with IFNA/interferon α or IL2/interleukin 2 (median time of survival after the diagnosis of about 20 mo),^{1,5} the standard treatments used before the development of antiangiogenesis drugs. Moreover, the fact that mRCC patients gradually become refractory to sunitinib represents an important obstacle to better outcomes for patients. Therefore, it is urgent to better understand the molecular mechanisms associated with resistance to sunitinib to improve the final outcome of the patients. In this context, we have analyzed the fate of tumor cells following chronic exposure to the drug. The selection pressure exerted by chronic exposure has led to the selection of resistant cells,^{2,3} but the mechanisms inducing resistance are unknown.

It was previously reported that sunitinib induces autophagy in bladder cancer cells,⁶ and that inhibition of autophagy potentiates the antiproliferative effects of sunitinib.^{7,8} However, in these experiments, cells are exposed to high doses of sunitinib and the cells are not representative of cancers for which sunitinib is the treatment of reference.⁷ Moreover, these reports do not investigate the molecular link between sunitinib treatment and autophagy. Lysosomal sequestration of sunitinib may be explained by the fact that it is a hydrophobic weak base (pKa 8.95).⁹ Sequestration in lysosomes may prevent access of the drug to the kinase domain of tyrosine kinase receptors present in the cytoplasm, thus participating in the loss of efficacy of the drug. However, the effect of sunitinib on autophagy has not been described for mRCC cells. Furthermore, the implication of autophagy and lysosome trapping in the mechanisms of resistance has not been addressed. In the present study we aimed at deciphering the link between autophagy and the mechanisms of resistance to sunitinib in

mRCC. To overcome resistance we propose treatment with a combination of drugs preventing lysosomal accumulation.

Results

mRCC cells showed reduced proliferation in the presence of concentrations of sunitinib below the IC₅₀ (suboptimal concentration)

Because of the abnormal vascularization of tumors, the core of primary mRCC or metastases is not exposed to optimal concentrations of the drug (Fig. 1A). We first determined the in vitro concentrations that resulted in progressive adaptation to sunitinib and final selection of resistant cells. The plasma concentrations of patients or mice exposed to sunitinib was low (0.1 to 1 $\mu\text{mol/L}$ range) compared to the intratumor amount, which was 10 times higher (10 $\mu\text{mol/L}$ range). Whereas the IC₅₀ of endothelial cells for sunitinib was approximately 0.1 $\mu\text{mol/L}$,¹⁰ the IC₅₀ of mRCC cells was approximately 5 $\mu\text{mol/L}$.^{2,9} In the presence of a concentration of sunitinib below the IC₅₀ (2.5 $\mu\text{mol/L}$), mRCC cells (Fig. 1B, C and Fig. S1A, 786-O and RCC10, respectively) have a reduced proliferation rate, which was linked to prolonged S and G2/M phases of the cell cycle (Fig. 1D). A suboptimal concentration of sunitinib (2.5 $\mu\text{mol/L}$) did not affect cell viability (Fig. 1D, E) whereas exposure to a higher concentration resulted in cell death, as measured by cell counting or a clonogenic assay.

Sunitinib accumulated in lysosomes

To decipher the adaptation to suboptimal concentrations of sunitinib, the rest of the experiments were conducted at the concentration of 2.5 $\mu\text{mol/L}$.

Phase contrast microscopy highlighted a modification of the cell shape and the appearance of a yellowish color inside the cells after incubation with sunitinib for 2 d (Fig. 2A). The intracellular localization of sunitinib was confirmed by visualization of its autofluorescence. Sunitinib autofluorescence colocalized with a specific lysosomal staining (LAMP1 [lysosomal-associated membrane protein 1]; Fig. 2B) confirming that sunitinib accumulated in acidic lysosomal structures. Accumulation in lysosomes was also observed in 2 independent cell lines (RCC10 and A498) and 2 RCC primary cell lines (CC and TFE3) that we previously described (Fig. S1B).² However, sunitinib did not accumulate in early endosomes (no colocalization with EEA1 [early endosome antigen 1]; Fig. S2). This result suggests accumulation of sunitinib in intracellular compartments with no major consequences to cell viability. This characteristic defines sunitinib as a lysomotropic agent.¹¹ FACS analysis showed that sunitinib accumulated in lysosomes in a time-dependent manner and that there was an increase in the lysosomal mass (Fig. 2C), which coincided with increased expression of LAMP1 (Fig. 2D). Such accumulation of sunitinib was not dependent on the oxygen concentration since sunitinib sequestration was equivalent in normoxia or hypoxia (Fig. S3A). At the concentration of

2.5 $\mu\text{mol/L}$ of sunitinib, hypoxia did not modify the cell viability (Fig. S3B). Intracellular accumulation of sunitinib was also observed in experimental RCC in mice (Fig. S3C).

Sunitinib neutralized the pH of lysosomes and inhibited CTSB

Sunitinib is a weak base (pK_a 8.95), which accumulates in lysosomes where it is protonated by a pH-partitioning process.¹¹ Once ionized, sunitinib becomes membrane impermeable with the impossibility of diffusing out of the organelle, which results in lysosome trapping. Accumulation continues as long as the low pH is maintained by the vacuolar proton pump (V-type H^+ ATPase) but ultimately results in buffering of the acidic pH of lysosomes. The LysoSensor Green DND-153 fluorescence (pK_a 7.5) was intense in control conditions (this dye fluoresces in an acidic environment) but almost disappeared in the presence of sunitinib suggesting that the acidic pH of lysosomes has been neutralized (Fig. 3A, B). This correlated with decreased expression and activity of one of the major lysosome-associated proteases CTSB (Fig. 3C).

Suboptimal concentrations of sunitinib initiated incomplete autophagic flux

In physiological situations, autophagy is responsible for the degradation of dysfunctional organelles and proteins and allows cell survival during nutrient deprivation.¹² So, autophagy is important in maintaining cell homeostasis, but if exacerbated, it can lead to cell death.¹³ Sunitinib treatment resulted in an increase in the lysosomal pH and inhibition of the lysosomal protease activity. Hence, we investigated the consequences of these modifications on autophagy. Autophagy is characterized by the accumulation of cleaved and lipidated forms of

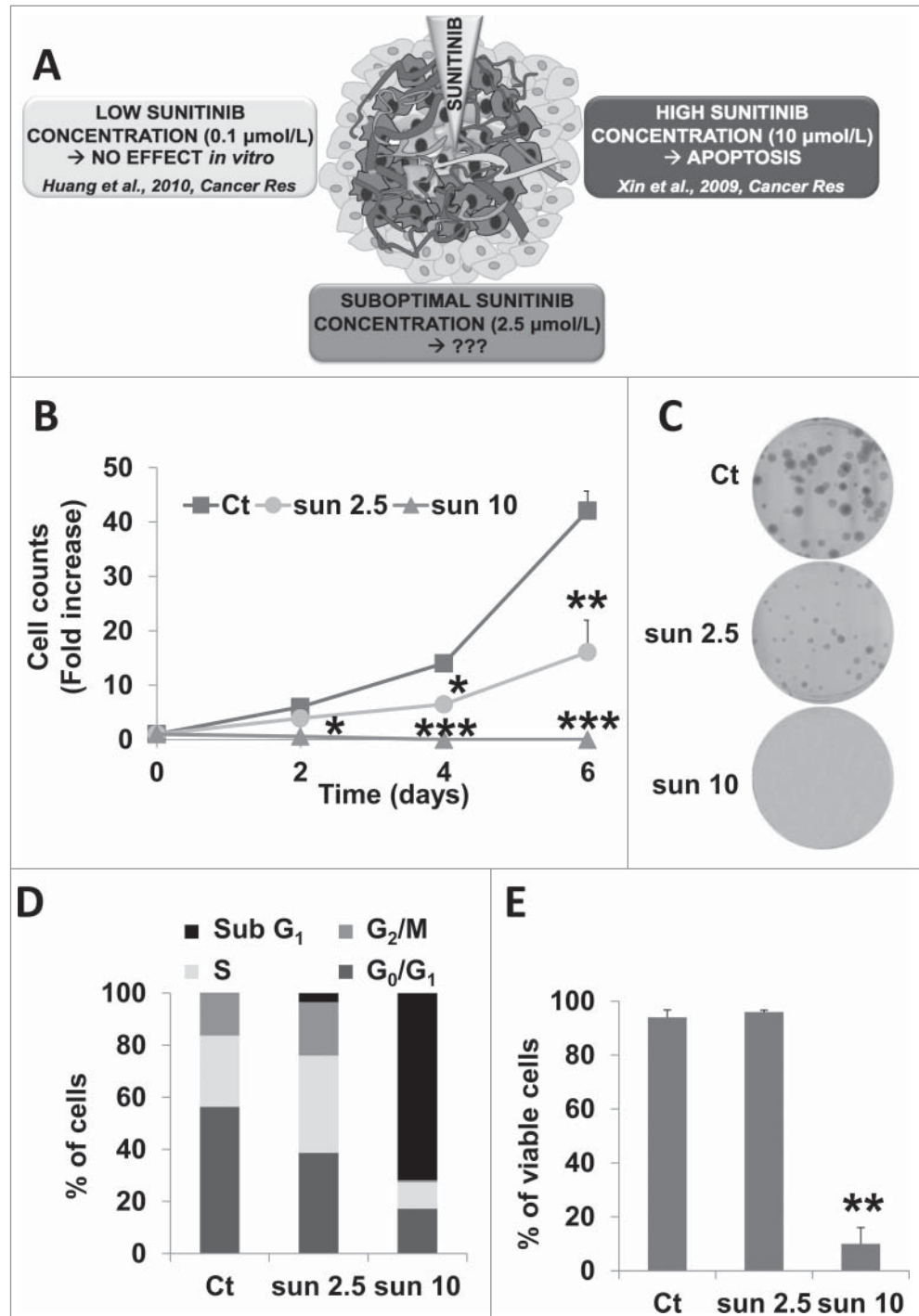


Figure 1. A sunitinib concentration below the IC₅₀ slowed down cell proliferation but did not induce cell death. (A) General schema illustrating the different concentrations to which RCC cells may be exposed to in a tumor. (B) The proliferative capacity of 786-O cells in the absence (Ct) or presence of increasing concentrations of sunitinib (sun) was evaluated by counting the cells at the indicated times. Data are the mean fold increase \pm SD. The fold increase of untreated cells was taken as the reference value for statistics. Statistical significances of the results compared to untreated cells are indicated; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. (C) Clonal growth of 786-O cells in the absence (Ct) or presence of sunitinib (sun) (2.5 or 10 $\mu\text{mol/L}$). (D) The proportion of cells in each phase of the cell cycle was determined by DNA labeling with propidium iodide followed by FACS analysis. (E) Determination of viable cells in the absence (Ct) or presence of 2.5 $\mu\text{mol/L}$ (2.5) or 10 $\mu\text{mol/L}$ (10) of sunitinib (sun).

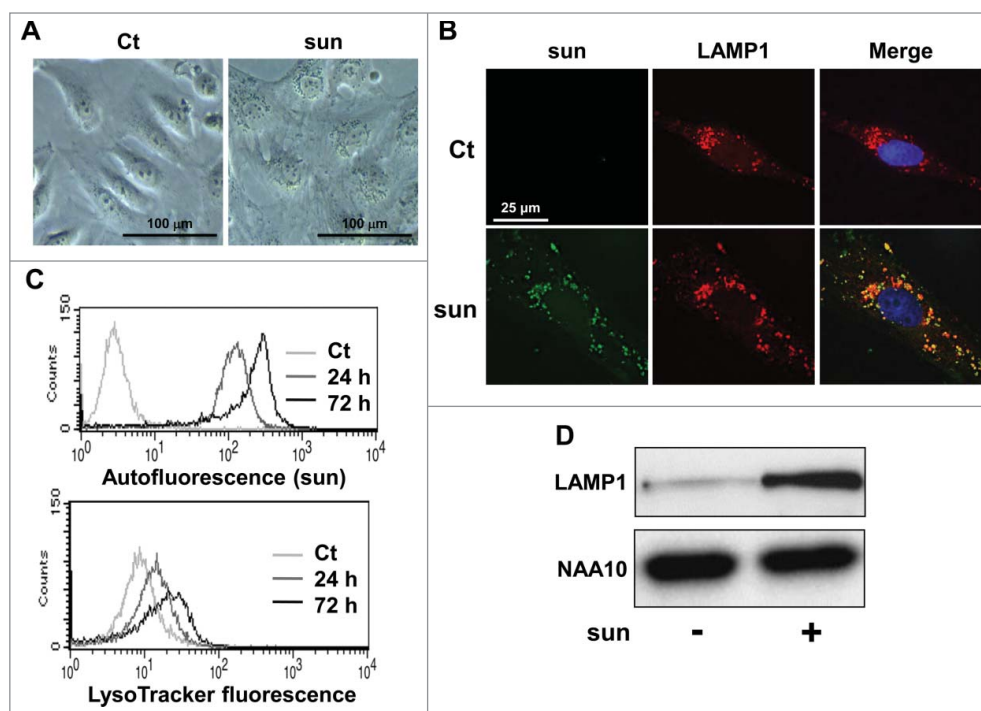


Figure 2. Sunitinib accumulated in lysosomes. (A) Phase contrast microscopy showing modifications of the cell shape and accumulation of yellow granules in 786-O cell incubated with 2.5 μmol/L of sunitinib for 24 h. (B) Immunofluorescence to LAMP1 in control (Ct) or sunitinib-treated (2.5 μmol/L, sun) 786-O cells for 48 h. Sunitinib autofluorescence is shown. Merged fluorescence is also shown. (C) The autofluorescence of sunitinib and the fluorescence of the lysosomal probe (LysoTracker Red DND-99, Lyso) were followed by FACS analysis performed at the indicated times. (D) Cell extracts from control (-) or sunitinib-treated (2.5 μmol/L) 786-O cells incubated for 72 h were tested for LAMP1 expression by immunoblotting. NAA10 is shown as a loading control.

MAP1LC3A/LC3A (microtubule-associated protein 1 light chain 3 α; LC3-II) and the degradation of SQSTM1/p62 protein. Sunitinib treatment induced accumulation of LC3-II, which indicated either initiation or blockade of autophagy (in 786-O cells, Fig. 4A and in 2 additional cell lines [RCC10 and A498] and the above mentioned primary cells [CC and TFE3], Fig. S4A and S4B, respectively). However, sustained expression of SQSTM1 strongly suggested incomplete processing. To confirm incomplete autophagic flux, we evaluated the LC3-II level in response to sunitinib in the presence or absence of chloroquine (CHL), a lysosomotropic agent that increases the lysosomal pH. A higher fold change compared to control conditions reflected induction of autophagy whereas no modification or a lower fold change in the presence of CHL was indicative of inhibition of autophagy.¹⁴ The fold change in LC3-II in sunitinib-treated cells after CHL treatment was equivalent compared to cells treated with sunitinib alone (Fig. 4B, C), indicating an inhibition of the autophagy flux. Furthermore, the merged localization of sunitinib, LC3 and LAMP2 indicated accumulation of nonfunctional autolysosomes (Fig. 4D), which was visualized by electron microscopy (Fig. 4E).

Amino acid deprivation enhanced resistance to sunitinib

It is well known that cell starvation stimulates autophagy, which helps cells to resist this unfavorable environment.

Autophagy is also used by tumor cells to survive when they have consumed all the nutrients easily accessible from the blood stream. Hence, the autolysosomes generated through this process may engulf sunitinib thereby amplifying resistance to the drug by preventing drug access to its targets. To test this hypothesis, we cultured 786-OS cells in a saline medium (Hank's balanced salt solution; HBSS) deprived of amino acids, which initiates autophagosome and lysosome formation. We questioned if this increased the capacity of the cells to store sunitinib in acidic intracellular compartments. Phase contrast microscopy clearly showed an enhanced accumulation of yellow granules when cells are cultured in HBSS medium (Fig. 5A). Quantification by FACS confirmed this qualitative observation (Fig. 5B). A high concentration (10 μmol/L) of sunitinib induces cell death, but at a lower concentration (2.5 μmol/L), it slows proliferation without inducing cell death, as expected. However, if the cells were first cultured in HBSS

medium, cell proliferation was minimally affected by 2.5 μmol/L sunitinib and cell death was substantially decreased, even at a high concentration of the drug (10 μmol/L; Fig. 5C). These results were confirmed with 2 other independent cell lines (RCC10 and A498 cells; Fig. S5).

Sunitinib-resistant cells showed exacerbated, incomplete autophagy and a more aggressive phenotype

We hypothesized that sequestration of sunitinib in lysosomes and the subsequent inhibition of the autophagy flux participated in sunitinib resistance. To test this hypothesis, we generated sunitinib-resistant cells by chronic exposure of cells to the drug (786-OR and RCC10R). Incomplete autophagy in these cells was attested by accumulation of LC3-II and sustained expression of SQSTM1 (Fig. S6). Primary sunitinib-resistant cells were also derived from a RCC removed surgically from a patient, as we previously described (TFE3 cells).² The 786-OR and RCC10R cells survive and proliferate in the presence of a high concentration of the drug, which is sufficient to induce parental cell death. TFE3 cells are highly resistant to sunitinib *in vitro* even at high concentrations of the drug (IC₅₀ 10 μmol/L).² The ability to accumulate sunitinib inside 786-OR was increased compared to parental cells (Fig. S7). The viability of parental (786-OS) and resistant cells (786-OR) at different concentrations of sunitinib is

illustrated in Fig. 6A. As shown previously by Gotink et al.,⁹ resistance (maintained several weeks) is not genetically acquired since it can be reverted by culturing the cells in the absence of the drug for a few passages. Electron microscopy showed that 786-OR cells accumulate bigger vacuolar structures, identified above as autolysosomes, compared to 786-OS cells when incubated in the presence of 2.5 $\mu\text{mol/L}$ of sunitinib, a finding in favor of an exacerbated incomplete autophagy (Fig. 6B).

Previous reports have shown that treatment of tumor-bearing mice with sunitinib results in the selection of more aggressive cells. This has been observed in vivo, but we hypothesized that such selection did not involve cells from the tumor microenvironment but implicated an intrinsic phenotypic adaptation of tumor cells. We observed that 786-OR cells acquired greater anchorage independency illustrated by the formation of bigger colonies in soft agar (786-OR, Fig. 6C; and RCC10R, Fig. S8). In addition, the 786-OR cells showed an increase in their ability to migrate compared to 786-OS cells (Fig. 6D). These results suggest that incomplete autophagy correlated with the acquisition of the more aggressive phenotype of 786-OR cells. We tested different markers implicated in epithelial/mesenchymal transition including CDH/N-cadherin, VIM/vimentin, and the transcription factors SNAIL2/slug and SNAIL1/snail, but no significant changes were observed between the sensitive and resistant cells.

Inhibition of the ATP binding cassette (ABC) transporter ABCB1 and lysosomal permeabilization enhanced the efficacy of sunitinib

We hypothesized that sequestration of sunitinib in lysosomes is involved in resistance to sunitinib. If so, destabilization of lysosomes with LLOM may result in increased cell death in the presence of a suboptimal concentration of sunitinib since the drug inhibits the kinase activity of target tyrosine kinase receptors

located in the cytoplasm. However, we observed that LLOM reduced accumulation of sunitinib inside the cells. Moreover, in the presence of LLOM, the amount of sunitinib in the culture medium was increased. These results strongly suggest that if sunitinib is not sequestered in lysosomal compartment, it is actively exported outside the cells.

Inhibition of the ABC transporters improves sunitinib accumulation in the brain suggesting that these transporters

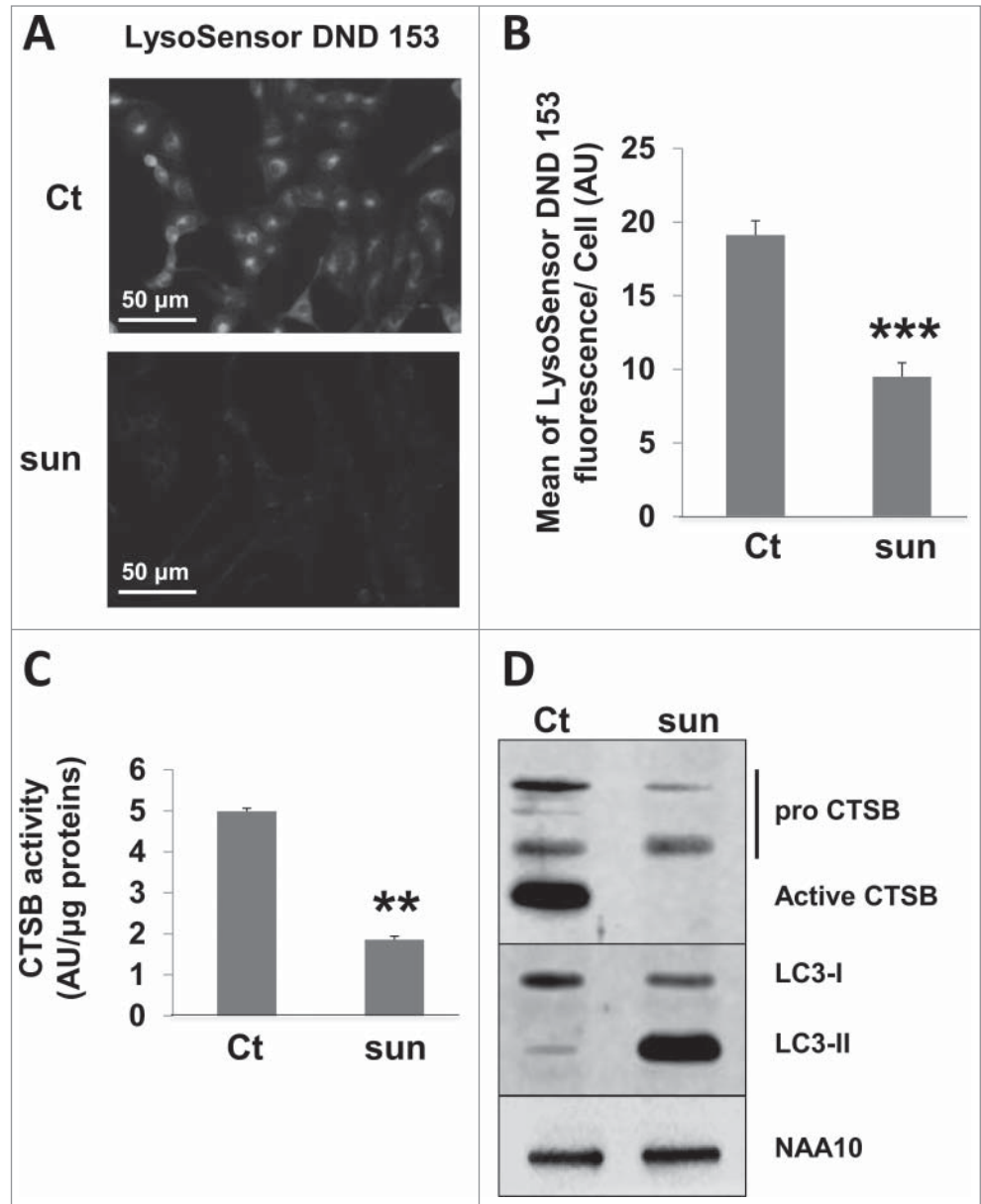


Figure 3. Sunitinib neutralized the lysosomal acidic pH and inhibited the proteolytic activity. (A) Acid pH-dependent fluorescence to LysoSensor Green DND-153 in 786-O cells in the absence or presence of sunitinib. (B) Quantification of the fluorescence shown in A ($n = 3$; ***, $P < 0.001$). (C) Quantification of the CTSB activity in 786-O cells in the absence (Ct) or presence of sunitinib (sun) in the organelles compartment (lysosomes, mitochondria, Golgi, endoplasmic reticulum) activity as described in Materials and Methods. (D) Analysis of the presence of pro and mature CTSB by immunoblotting. NAA10 is shown as a loading control.

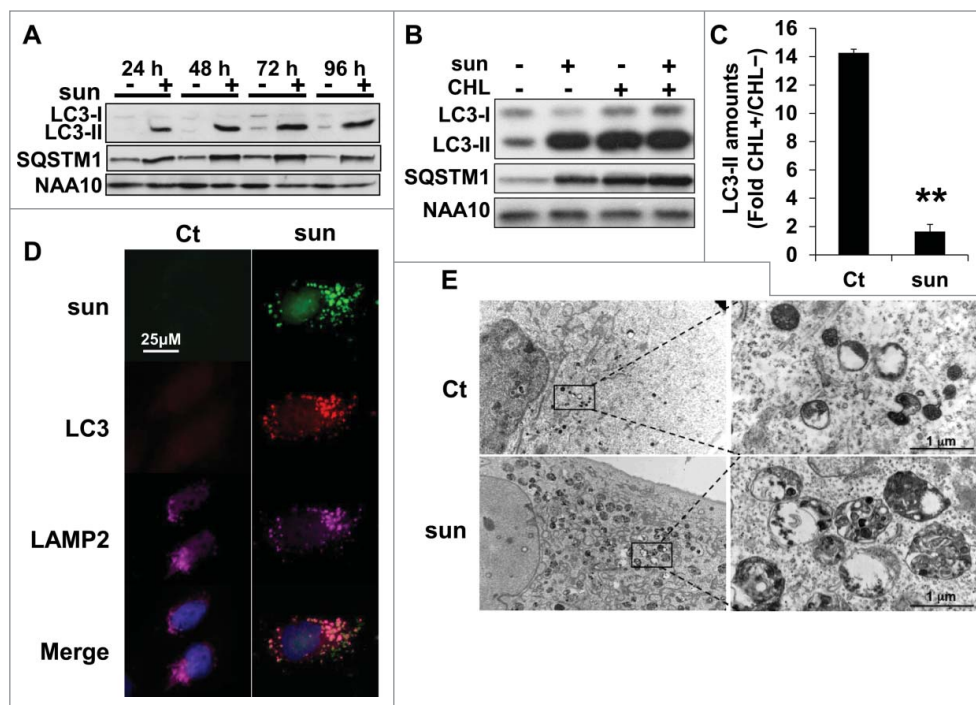


Figure 4. Suboptimal concentrations of sunitinib initiated incomplete autophagic flux. **(A)** The autophagic flux was examined in 786-O cells in the absence (-) or presence (+) of 2.5 $\mu\text{mol/L}$ of sunitinib for the indicated times. The levels of LC3-I/LC3-II and SQSTM1 were evaluated by immunoblotting. NAA10 is shown as a loading control. **(B)** To gauge the level of autophagic flux in 786-O cells incubated in the absence (-) or presence (+) of 2.5 or 5 $\mu\text{mol/L}$ of sunitinib, the level of LC3-I/LC3-II and SQSTM1 was evaluated and compared to cells incubated with CHL, 40 $\mu\text{mol/L}$. NAA10 is shown as a loading control. **(C)** Quantification of LC3-II in CHL-treated and CHL-untreated cells. **, $P < 0.01$. **(D)** Sunitinib autofluorescence and immunofluorescence to LC3-II and LAMP2 in control (Ct) or sunitinib-treated (2.5 $\mu\text{mol/L}$) 786-O cells after incubation for 48 h. Merged fluorescence is shown. Pink illustrates colocalization of the 3 markers. **(E)** Electron micrographs showing autolysosomes in 786-OS cells incubated in the absence (Ct) or presence of sunitinib 2.5 $\mu\text{mol/L}$ (sun) for 48 h.

participate in the efflux of the drug.¹⁵ These transporters are present at the lysosomal membrane and could participate in sunitinib accumulation in this cellular compartment.¹⁶ Moreover, sunitinib is a substrate of ABCB1.¹⁷ Hence, we hypothesized that ABC transporters could be present on the plasma and/or lysosomal membranes to mediate accumulation in specific cell compartments and/or to participate in sunitinib efflux out of the cells. Sunitinib treatment of 786-OS stimulated ABCB1 expression and increased accumulation in 786-OR cells (Fig. 7A). ABCB1 expression was also increased in A498, TFE3, and CC cells (Fig. S4). Whereas elacridar, an inhibitor of ABC transporters, induced slightly 786-OS cell death at a low concentration (1 $\mu\text{mol/L}$; Fig. S9A), it potentiated sunitinib activity on 786-OS cells (Fig. 7B). Elacridar did not significantly mediate 786-OR cell death when alone (Fig. S9A) but potentiated sunitinib activity (Fig. 7B). The lysomotropic agent LLOM had little effect on cell death at a low concentration (1 $\mu\text{mol/L}$). Higher concentrations are needed to induce cell death probably through the release of cathepsins and induction of lysosome membrane permeabilization leading finally to apoptosis (Fig. S9B).¹⁸ A low concentration of

LLOM increased the efficacy of sunitinib in 786-OS cells (Fig. 7B), which strongly suggested that preventing drug sequestration in the lysosomes allowed a better accessibility to its targets. Finally, the triple combination of sunitinib, LLOM, and elacridar resulted in 100% cell death of 786-OS and 786-OR cells (Fig. 7B). Of note, a mix of elacridar plus LLOM had a strong detrimental effect on 786-OS cells even at low concentrations, but had little effect on 786-OR cell viability (Fig. S9C). Although less potent, bafilomycin A₁ (BAF), an inhibitor of the V-ATPase pump, which is responsible for the maintenance of the low pH of the lysosomes, exerted a comparable effect to LLOM (Fig. S9D). Hence, the triple combination sunitinib, BAF and elacridar, was less potent than the sunitinib and LLOM-elacridar mix. Equivalent results were obtained with an independent cell line (RCC10, Fig. S10). These results suggest that blockade of sunitinib trapping in the lysosomes is an efficient way to increase the potency of the drug and prevent resistance.

Elacridar and LLOM alone or in combination had no effect on TFE3 cell viability. Elacridar was more active in the presence of a concentration of 2.5 $\mu\text{mol/L}$ sunitinib, (55% cell death) but this was not the case for the LLOM and sunitinib combination. As for 786-OR cells, massive TFE3 cell death was obtained with the triple combination (Fig. 8).

Proteasome inhibitors induced the death of sunitinib-resistant cells

Autophagy and the ubiquitin-proteasome system are 2 linked mechanisms leading to the degradation of abnormal proteins and the recycling of amino acids. These 2 mechanisms compensate for each other when one is inhibited.¹⁹ Hence, we speculate that incomplete autophagy resulted in enhanced proteasomal activity. As a consequence, sunitinib and inhibitors of the proteasome may have additional effects on cell death. We observed that MG132, a proteasome inhibitor, or bortezomib, which is approved for the treatment of multiple myeloma,²⁰ induced the death of sensitive and resistant cells. However, proteasome inhibitors combined with sunitinib induced a higher level of mortality of 786-OR cells than that induced by the individual compounds (Fig. 9). A

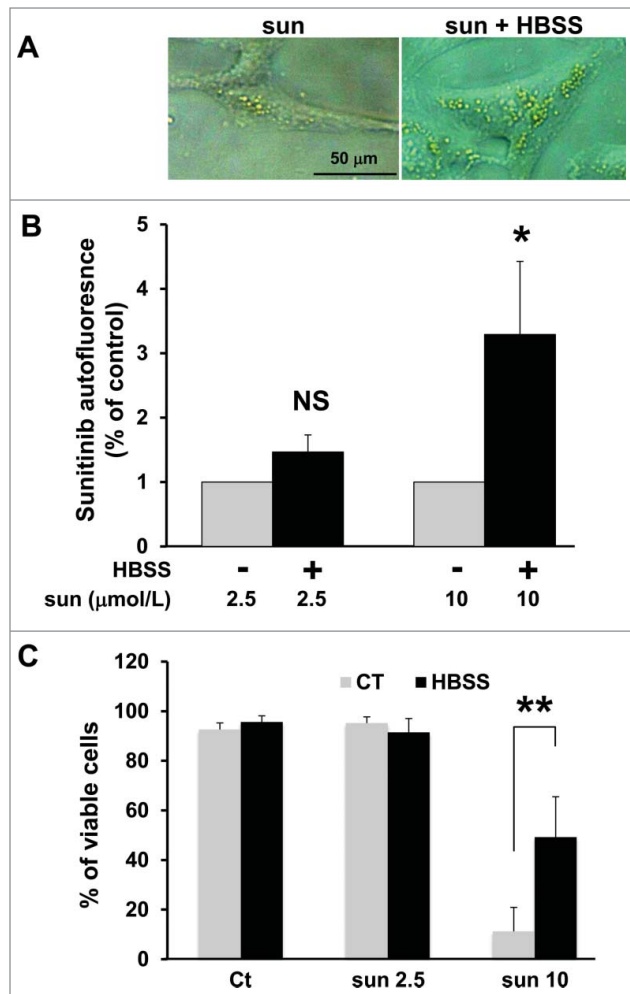


Figure 5. Amino acid starvation enhanced sunitinib resistance. (A) Phase contrast microscopy showing more accumulation of yellow granules in 786-O cells incubated with 10 $\mu\text{mol/L}$ of sunitinib cultured in HBSS medium (sun + HBSS) for 24 h compared to cells cultured with 10 $\mu\text{mol/L}$ of sunitinib in normal medium. (B) Determination of sunitinib autofluorescence by FACS after incubation with 2 concentrations of the drug (sun 2.5 and 10 $\mu\text{mol/L}$) during 24 h. Cells were cultured either in normal or HBSS medium; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; NS, nonsignificant. (C) Determination of the percentage of viable 786-O cells in the absence (Ct) or presence of 2.5 (sun 2.5) or 10 $\mu\text{mol/L}$ (sun 10) of sunitinib during 24 h. Cells were cultured either in normal or HBSS medium.

higher level of mortality was also observed for RCC10S, RCC10R, and CC cells when proteasome inhibitors, and especially bortezomib, was combined with sunitinib (Fig. S11).

Discussion

Most of the current research in the field of antiangiogenesis drugs has focused on the adaptation of the endothelial cells to these drugs, which target VEGFA or its receptors.²¹ However, it has been shown that other members of the VEGF family especially VEGFC are induced after exposure to anti-VEGFA

antibodies.²² Research has also concentrated on modifications to the genetic program of tumor cells exposed to antiangiogenesis drugs, which lead to the expression of redundant proangiogenesis factors or the ability to migrate.^{23,24} Different reports have described the acquisition of a MET-dependent aggressive phenotype associated with sunitinib treatment, in particular in animal models.^{25–27} However, it is difficult to address this modification in patients since sunitinib is administered mainly after radical nephrectomy to challenge metastatic sites and metastatic cells are generally not sampled for ethical purposes. Dissemination of mRCC cells via the lymphatic system has also been reported but again in animal models.^{28,29} The role of the tumor microenvironment in the adaptation to treatments has also been addressed.³⁰

The major question was how to define the best treatment among the different ones that have been approved since 2007. A great hope was to use mouse avatars xenografted with fragments of a tumor to test the available treatments in vivo. With this experimental model, a correlation between the capacity of a tumor to develop in nude mice and tumor aggressiveness has been described. This model is also used to test the efficacy of a new compound.³¹ The results of many groups including ours show that the growth of these tumor fragments in mice takes 3 to 6 mo. Hence, testing various treatments with this method is not compatible time-wise for a rapid therapeutic decision between surgical removal of the tumor and the beginning of the treatment.³² Tumor-derived slice cultures of head and neck cancers have also been used to test the sensitivity to targeted therapies, a technique that may also be used for mRCC, but the procedure needs to be improved.³³ Our recent study shows a good correlation between the response of the patient and the sensitivity to a FDA (food and drug administration)-approved drug.² We postulate that the antiangiogenesis treatment equivalently targets the blood vessels constituted of normal cells from one patient to another. However, we believe that tumor cell genetic plasticity was at the origin of the variation in tumor response. Our procedure consisted of testing cell survival and death in response to available drugs on isolated tumor cells grown in a specific culture medium. This technique is rapid and the procedure can be performed within one month after surgery. It may allow assistance in a therapeutic decision considering that the response to a given treatment on primary cells that represents tumor heterogeneity will reflect the general effect on patients.³⁴

Although all the aspects that lead to acquired resistance are of major importance, to become resistant the cells require chronic exposure to the drugs. So it would take several months before genetically modified tumor cells emerge that survive antiangiogenesis treatment.

The ability of cells to compartmentalize the drug in subcellular organelles to avoid accessibility to its target has not been examined in detail. Several reports have shown that certain weakly basic compounds (*i.e.* daunorubicin, doxorubicin) with pKa values near neutrality are selectively sequestered into lysosomes of multidrug-resistant cell lines. Alternatively, other weakly basic compounds, also with pKa near neutrality, specifically accumulate within mitochondria (*i.e.*, rhodamine 123).³⁵

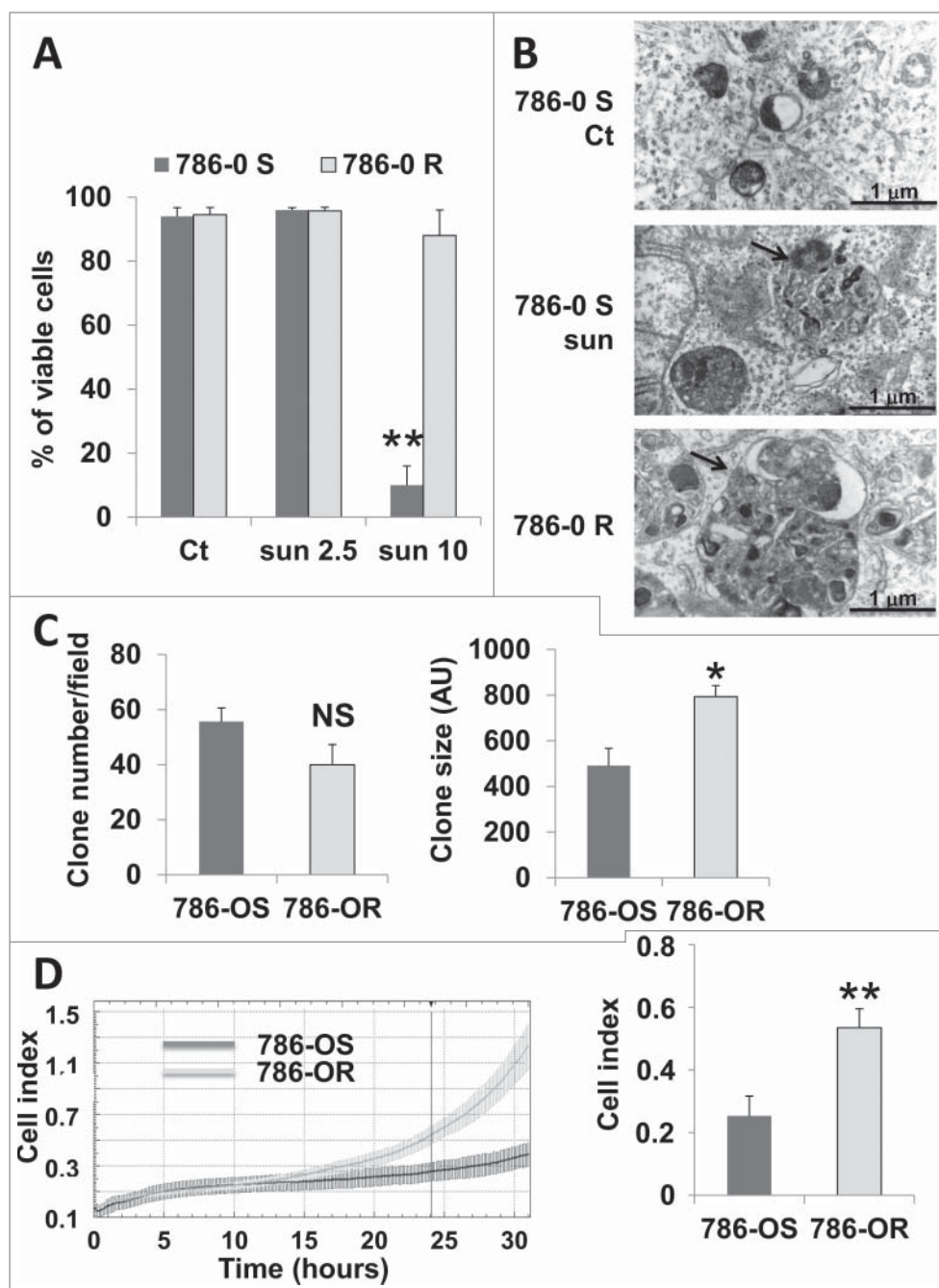


Figure 6. Enhanced inhibition of autophagy and aggressiveness of 786-OR cells. (A) Determination of the percentage of viable 786-OS and 786-OR cells in the absence (Ct) or presence of 2.5 (sun2.5) or 10 $\mu\text{mol/L}$ (sun10) of sunitinib after incubation for 24 h. (B) Electron micrographs of 786-OS cells incubated in the absence (Ct) or presence of sunitinib 2.5 $\mu\text{mol/L}$ (sun) for 48 h and of 786-OR cells showing autolysosomes (arrows). Note the presence of autolysosomes of increased size in 786-OR cells. (C) Quantification of the number (left panel) and the size (right panel) of colonies obtained for 786-OS and 786-OR cells seeded in soft agar; *, $P < 0.05$. (D) Cell migration in real time was analyzed with the xCELLigence RTCA. The chart shows the outcome of the kinetics analysis of the cell migration for 786-OS and 786-OR cells (left panel). The right panel shows the average cell indexes at 24 h from 3 independent experiments. **, $P < 0.01$.

In our case, we have observed lysosomal sequestration of sunitinib but no accumulation in mitochondria, as previously shown.⁹ Lysosomal trapping reduces the activity of sunitinib, since its targets, the kinase domain of tyrosine kinase receptors are located

in the cytoplasm. This mechanism has been described in chronic myeloid leukemia for which agents that destabilize lysosomes revert resistance to imatinib.¹⁸ Among the different drugs that have obtained FDA and/or EMA (Food and Drug Administration and/or European Medicines Agency) approval for the treatment of mRCC, in addition to sunitinib, axitinib and dovitinib can be protonated at physiological pH and subsequently trapped in the lysosomes. Hence, resistance mechanisms equivalent to that described herein for sunitinib may be the cause of reduced efficacy of these drugs. Pazopanib, another ATP mimetic approved for the treatment of mRCC is the only drug that cannot be protonated and trapped in the lysosomes, hence not concerned by this mechanism of resistance. However, sunitinib and pazopanib show the same overall survival,³⁶ but pazopanib is preferred by physicians and patients mainly for its better quality of life.³⁷ Several reports have previously shown that drugs that are lysosomotropic shared certain physicochemical properties, possessing a $\text{ClogP} > 2$ and a basic pK_a between 6.5 and 11, predictably influenced their intracellular localization.³⁸ Sunitinib enters perfectly into this category with a $\text{ClogP} = 5.2$ and a basic $\text{pK}_a = 8.95$. We also observed that the amine group of sunitinib, added to improve the solubility of the drug is responsible for the high pK_a value. Thus, the synthesis of an analog of sunitinib devoid of this amine group may prevent its accumulation in lysosomes.

Sequestration of chemotherapeutic agents in lysosomes is largely due to their lysosomotropic properties but sequestration within lysosomes may also be dependent on the ABC transporter activity.^{16,39} We observed an increase in the expression of the ABCB1 transporter after sunitinib treatment, but the regulatory mechanism implicated is unknown. Preliminary experiments suggest that the initiation of autophagy induces ATF4 (activating

transcription factor 4) expression. ATF4 is a major transcription factor implicated in the adaptation to nutrient stress of tumor cells.⁴⁰ Moreover, ATF4 has also been implicated in resistance to cisplatin and cells overexpressing ATF4 showed multidrug resistance.⁴¹ Hence, ATF4 may be the driver of a transcriptional program leading to expression of ABCB1, as previously shown.^{42,43}

Moreover, accumulation of ABCB1 may be due to a lack of its degradation. Several membrane proteins, including receptors and transporters, recycle to the plasma membrane through the recycling endosomal system. Some cargo proteins sort cell membranes and discarded proteins into internal luminal vesicles of multivesicular bodies (early endosomes), and mature multivesicular bodies (late endosomes) that can fuse with lysosomes for proteolysis by lysosomal enzymes. In the context of this study, the lysosomal degradation pathway is impaired because of the modification of the lysosomal pH and could explain the decrease in ABCB1 degradation and its subsequent accumulation. Similar consequences were observed with CHL treatment, which resulted in NOTCH1 accumulation due to a decrease in the activity of lysosomes.⁴⁴

Lysosomal sequestration is rapid, occurring as soon as the drug is in contact with the target cells, and does not modify the genetic program. Recent studies have also demonstrated that numerous cancer cells have defective acidification of their lysosomes. Hence, lysomotropic agents would be in contact with their targets in the cytoplasm of cancer cells devoid of lysosome trapping.⁴⁵ This elegant approach would limit toxicity to normal cell and would concentrate the cytotoxic or cytostatic effects on tumor cells. However, we showed that the acidification of the lysosomes of mRCC cells was not defective. We observed that the TFE3 cells were resistant to a high concentration of sunitinib (IC₅₀ = 10 $\mu\text{mol/L}$). However, we did not observe an increase in the number of lysosomes (LysoTracker Red labeling) in TFE3 cells compared to 786-0 cells. The pH of lysosomes dictates the predicted degree of lysosomal accumulation of sunitinib; the greater the lysosome-to-cytosol pH gradient the greater the extent of lysosomal sequestration. As long as the pH gradient is maintained, significant accumulation of the drug is possible. The proton pump, the vacuolar-type (V-) ATPase, which is located on the lysosomal membrane, maintains acidification of lysosomes.

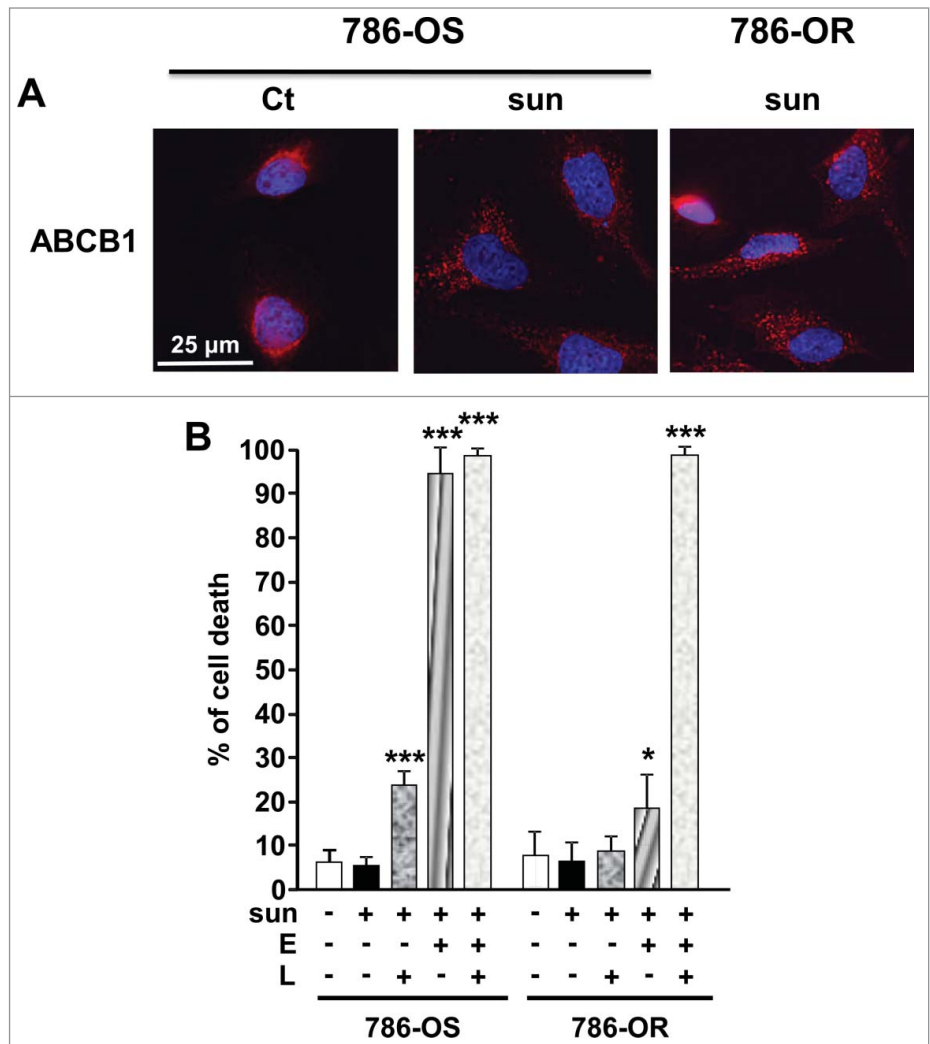


Figure 7. A combination of a lysosome destabilizing agent and an inhibitor of ABC transporters reverted sunitinib resistance of 786-OR cells. (A) Expression of ABCB1 was detected by immunofluorescence in control (Ct) or sunitinib-treated (2.5 $\mu\text{mol/L}$) sensitive 786-O cells (786-OS) for 48 h (sun) and in resistant 786-O cells (786-OR) in the presence of sunitinib (sun). (B) Determination of the percentage of dead 786-OS and 786-OR cells after incubation for 24 h the indicated combinations of drugs (sunitinib (sun) 2.5 $\mu\text{mol/L}$; LLOM (L) 1 $\mu\text{mol/L}$; elacridar (E) 5 $\mu\text{mol/L}$). *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$.

Tumor cells with drug resistance exhibit an increase in V-ATPase activity, which may explain the resistance to sunitinib of TFE3 cells.^{46,47}

To prevent lysosomal trapping and avoid export of the drug out of the cells, we used lysosomal destabilizing agents and inhibitors of ABCB1. This combination was very efficient in promoting cell death of cancer cell lines and cancer cells derived from a patient who progressed on sunitinib. The recapitulative schema we propose to prevent sunitinib resistance is shown in Fig. 10. Lysosome stabilizing agents are far from entering into the clinic, because of major toxic effects whereas clinical assays using inhibitors of ABC transporters are ongoing.⁴⁸ Moreover, we found that proteasome inhibitors induced strong tumor cell death especially on cells resistant to sunitinib. As sunitinib and proteasome

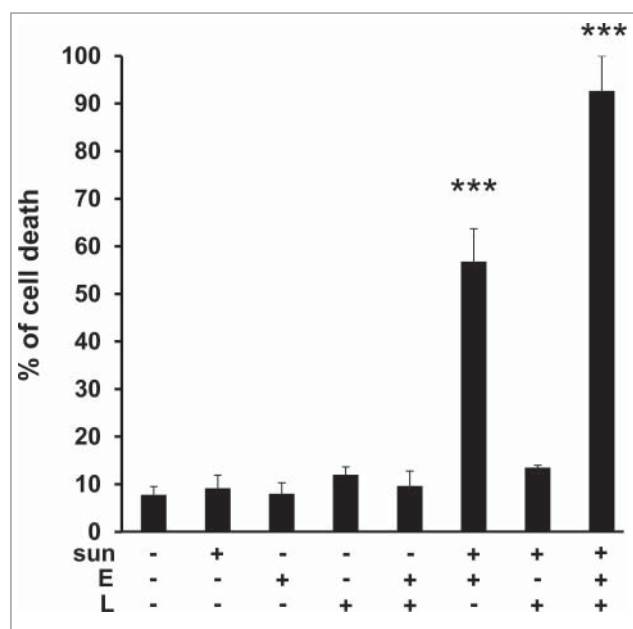


Figure 8. Primary tumor cells derived from a patient who progressed on sunitinib, were sensitive to sunitinib when in the presence of elacridar or elacridar and LLOM. Determination of the percentage of viable/dead TFE3 cells after incubation for 24 h with the indicated combinations of drugs (sunitinib (sun) 2.5 $\mu\text{mol/L}$; LLOM (L) 0.2 $\mu\text{mol/L}$; elacridar (E) 1 $\mu\text{mol/L}$). *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$.

inhibitors have independent targets, the toxic effects should be manageable. *In silico* analysis of online-available microarrays highlighted a cluster of proteasome-associated genes that are overexpressed in primary and mRCC but also in paired pulmonary metastasis (Fig. S12A, Table S1, Supplemental Materials and Methods).^{49,50} The proteins encoded by these genes comprised a subset of the proteasome β subunits that affect the generation of peptides to promote efficient antigen recognition (PSMB8/9/10; proteasome [prosome, macropain] subunit, β

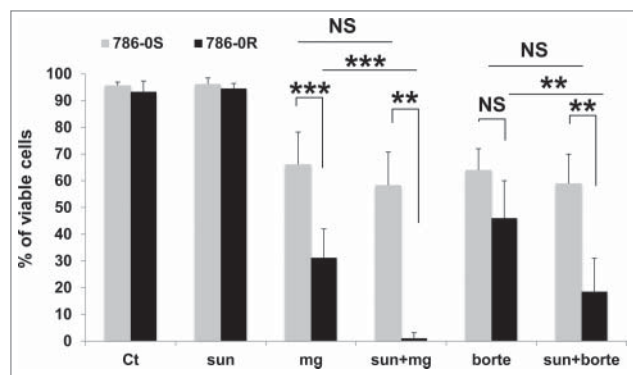


Figure 9. Proteasome inhibitors induced the death of cells resistant to sunitinib. The proteasome inhibitors MG132 (mg, 10 $\mu\text{mol/L}$) or bortezomib (borte, 5 $\mu\text{mol/L}$) alone or in combination with sunitinib (sun, 2.5 $\mu\text{mol/L}$) decreased the viability of 786-OS and 786-OR cells after incubation for 24 h. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, NS, nonsignificant.

type, 8/9/10),⁵¹ and a cellular regulator of proteasome formation and of proteasome-mediated antigen processing (PSMF1; proteasome [prosome, macropain] inhibitor subunit 1 [PI31]).⁵² A slight increase in expression (1.4 [PSMB8, PSMB9, PSMB10] to fold2- [PSMF1] above the median) of each gene was associated with a decrease in overall survival (OS) with significant P values ($P = 0.035$ for PSMB8; 0.0006 for PSMB9; 0.018 for PSMB10; 0.036 for PSMF1) as revealed by data analysis at cbiportal.^{53,54} Moreover, overexpression of the genes of the cluster were indicative of both disease free survival ($P = 0.0008$) and overall survival is much more decreased for patients that overexpressed the different genes of the cluster ($P = 0.0002$). Overexpression of the genes of the cluster was also indicative of disease free survival for non metastatic patients ($P = 0.007$) and of overall survival for metastatic patients (0.006) (Fig. S12B). This *in silico* analysis clearly showed the prognostic significance of specific proteasome-associated genes. It corroborated our "*in cellulo*" analysis for the relevance of association of sunitinib and proteasome inhibitors.

The resistance to any targeted therapies is a constant debate between the presence of mutations within the primary tumor and acquired mutations under the selection pressure induced by the treatment. Tumor heterogeneity constitutes a major problem for defining personalized treatment. For mRCC, genomic sequencing highlighted an evolution of the metastatic niche that may refine tumor progression.⁵⁵ As analyzed by cbiportal, proteasome genes were highly informative as prognosis markers of poor survival of nonmetastatic and metastatic patients while ATF4 and ABCB1 were not. A biopsy of metastases is rarely possible because it would threaten patients' life. However, if it is possible, it would be interesting to test in metastases that become refractory to sunitinib treatment if ABCB1, ATF4 and PSMB8, PSMB9, PSMB10, and PSMF1 are upregulated compared to the primary tumor hence defining them as markers of resistance as suggested by our study.

Taken together, our study highlighted a primary mechanism of resistance to the major antiangiogenic compound used in the treatment of mRCC. Having deciphered this mechanism, we can now propose relevant therapeutic combinations that deserve testing in preclinical models but also putatively in phase I clinical trials.

Materials and Methods

Materials

Sunitinib and bortezomib came from residual materials given to patients (Center Antoine Lacassagne, Nice, France) and prepared as 2.5 mmol/L and 6.5 mmol/L stock solutions in dimethyl sulfoxide (Sigma, 472301) and stored at -20°C . CHL (C6628), elacridar (SML0486) and LLOM (L7393) were purchased from Sigma. MG132 was purchased from Calbiochem (474790) Anti-LC3 antibody (5F10) was obtained from Nanotools (0231-100/LC3-5F10). Anti-LAMP1 (H4A3, sc-20011) and anti-EEA1 (N-19, sc-6415) were from Santa Cruz Biotechnology, anti SQSTM1 was from BD Bioscience (610833), CTSB (Ab-1, IM27L) was purchased from Merck, anti-LAMP2

was from Abcam (H4B4, ab25631), anti-NAA10/ARD1 antibodies were produced and characterized in our laboratory,⁵⁶ anti-actin (I-19, sc-1616) was from Santa Cruz Biotechnology, anti-phospho-AKT1 (Ser473; 9271S), anti-AKT1 (9272), anti-phospho-MAPK1/3 (Thr185/Tyr187 and Thr202/Tyr204; 4370), anti-MAPK1/3 (137F5; 4695) and anti-ABCB1 (EY7B, 133442S) antibodies were all obtained from Cell Signaling Technology. HBSS was from Life Technologies (14025092).

Cell culture

Human 786-0 cells were purchased from the American Tissue Culture Collection (ATCC → CRL-1932TM). RCC10 cells were a kind gift from W.H. Kaelin (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA) and were used in one of our published studies.⁵⁷ RCC cells were grown in DMEM (Life Technologies, 61965-026) supplemented with 7% fetal calf serum at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. For HBSS experiments, cells were preincubated in HBSS for 30 min before sunitinib treatment for 24 h for the determination of cell viability. For clonogenic assays, cells were incubated for 7 d in fresh medium after the same procedure. Resistant cells were obtained by chronic exposure to increasing concentrations of sunitinib up to 8 μmol/L. An INVIVO₂ 200 workstation (Ruskin Technology Biotrace International Plc, Sanford, FL, USA) set at 1% oxygen, 94% nitrogen and 5% carbon dioxide was used for hypoxic conditions.

Growth curves and cell viability

Cells were seeded in 6-well dishes and transiently treated with sunitinib the following day. Cells were next detached from d 2 to 6 and counted with a Coulter counter (Beckman, Pasadena, CA, USA) in duplicate to assess cell proliferation. Cell viability and cell death was assessed using the ADAM-MC apparatus (Nano-EnTek, Guro-gu, Seoul, Korea) based on fluorescent propidium iodide staining according to the manufacturer's instructions.

Colony formation assay

RCC cells (500 cells per condition) were treated or not with sunitinib. Colonies were detected after 10 d of culture. Cells were then washed, fixed at room temperature for 20 min with 3% paraformaldehyde (PFA; Electron Microscopy Sciences, 15713) and colored by crystal violet (Sigma, C3886).

Kinetics of cell migration

Cell migration in real time was monitored by using the xCELL-Ligence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) DP Instrument equipped with a CIM-plate 16 (Roche, Indianapolis, IN, USA).

Each well of the plate is composed of upper and lower chambers separated by a microporous membrane. Migration was

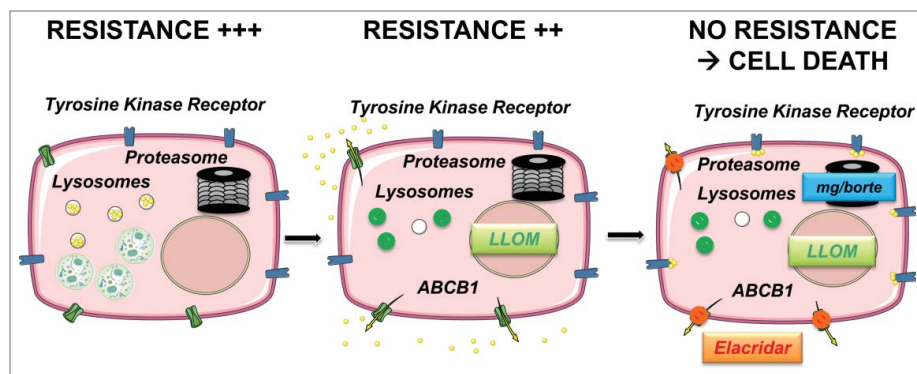


Figure 10. Description of the different phases of events justifying a combinatorial approach for treatment. (A) Maximal resistance (+++) is mediated by lysosomal trapping of sunitinib (yellow circles in lysosomes). The presence of autolysosomes (green circles) is indicative of incomplete autophagy. The proteasome degrades misfolded proteins and participates in recycling of amino acids. (B) The lysosome destabilizing agent Leu-Leu-O-Methyl (LLOM) prevents the trapping of sunitinib in lysosomes so the drug is localized to the cytoplasm but is "taken in charge" by the ABCB1, which transport the drug out of the cell thus leading to intermediate resistance (++). (C) Maximal sensitivity to sunitinib can be obtained by 1) by destabilization of lysosomes with LLOM combined with inhibitors of ABC transporters (elacridar) or 2) with proteasome inhibitors (MG132 [mg] or bortezomib [bortel]).

measured as the relative impedance change (cell index) across microelectronic sensors integrated into the bottom side of the membrane. Ten⁴ cells were added in triplicate to the upper chambers. Migration and invasion were monitored every min for 48 h. For quantification, the cell index at the indicated time points was averaged from 3 independent measurements.

Immunoblotting

Cells treated with sunitinib and/or exposed to pharmacological inhibitors, were lysed in buffer containing 3% SDS (Euromedex, EU0660), 10% glycerol, 0.825 mM Na₂HPO₄. Samples (30 μg) were separated by 10% SDS-PAGE, transferred onto a PVDF membrane (Immobilon, Millipore, IPVH00010) and then exposed to the appropriate antibodies: anti-LC3, anti-SQSTM1, anti-LAMP1, anti-NAA10, anti-CTSB or anti-actin. Proteins were visualized with the ECL system using horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (W4011) or anti-mouse (W4021) secondary antibodies (Promega).

Subcellular colocalization studies

Cells were incubated with sunitinib and LysoTracker Red DND-99 (Invitrogen, L7528) or LysoSensor Green DND-153 (Invitrogen, L7534). Viable cells were imaged in real time with EVOS Cell Imaging Systems (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Immunofluorescence

RCC cells seeded on glass coverslips (150,000 cells for 24 h or 60,000 cells for 48 h) in 6-well dishes were treated or not with sunitinib. Twenty-four or 48 h after, cells were then washed, fixed at room temperature for 20 min with 3% paraformaldehyde and permeabilized with phosphate-buffered saline (PBS; Euromedex, ET330-A) containing 0.2% Triton X-100 (Amresco, 0694-1L) for 2 min before being exposed to

anti-LC3, anti-SQSTM1, anti-LAMP1, anti-LAMP2, anti-EEA1 or anti-ABC1 (Sigma, P7965) for 1 h at room temperature. Cells were washed 3 times with PBS, and then incubated for 1 h at room temperature with 1:1000 dilution anti-mouse or anti-rabbit Alexa Fluor 488- (A21207) or Alexa Fluor 594-labeled (A21203) secondary antibody (Invitrogen, Life Technologies) and mounted using Mountant Permafluor (Thermo Scientific, TA-030-FM). Fluorescence images were examined and collected under a DeltaVision Microscopy Imaging System (GE Healthcare/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Subcellular fractionation

Subcellular fractionation was performed using a proteo-extract subcellular proteome extraction kit according to the manufacturer's instructions (Calbiochem, 539790).

Flow cytometry– cell cycle distribution

Cells were trypsinized, washed, and resuspended in cold 70% ethanol overnight. After 2 washes with PBS, cells were resuspended in propidium iodide (40 $\mu\text{g/ml}$; Sigma, P4170) containing ribonuclease A (10 $\mu\text{g/ml}$; Sigma, R4642) for 15 min at room temperature and were analyzed using a fluorescence-activated cell sorter (BD healthcare FACSCALIBUR, analyzer, San Jose, CA, USA).

Transmission and scanning electron microscopy

For ultrastructural analysis, cells were fixed in 1.6% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, 16210) in 0.1 M phosphate buffer, rinsed in 0.1 M cacodylate buffer, postfixed for 1 h in 1% osmium tetroxide (Electron Microscopy sciences, 19170) and 1% potassium ferrocyanide (Sigma, 14459–95–1) in 0.1 M cacodylate buffer (Sigma, 124–65–2) to enhance the staining of membranes. Cells were rinsed in distilled water, dehydrated in alcohols and lastly embedded in epoxy resin (Sigma, 45345). Contrasted ultrathin sections (70 nm) were analyzed under a JEOL 1400 transmission electron microscope (JEOL Europe, Croissy sur Seine, France) mounted with a Morada Olympus CCD camera (Olympus-SIS Europe).

CTSB activity

RCC cells treated with sunitinib for 24 h were lysed for 30 min at 4°C in lysis buffer (400 mmol/L Na-phosphate, pH 6, 150 mmol/L NaCl, 4 mmol/L ethylene-diaminetetraacetic acid, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma, 78830), 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin (Euromedex, A162-A) and 1% Triton

X-100 (Sigma, T9284) and lysates were cleared at 10,000 g for 15 min at 4°C. Each assay (in quadruplicate) was performed with 50 μg of protein prepared from control or sunitinib treated cells. Briefly, cellular extracts were incubated in a 96-well plate, with 60 μm of z-RR-AMC (7-amino-4-methylcoumarin; Peptide Institute, 3123-v) as substrate for various times at 37°C. The CTSB activity was measured by following the emission at 460 nm (excitation at 390 nm) in the presence or absence of 1 μm of CA-074Me (an inhibitor of CTSB activity; Calbiochem, 205531) Enzyme activities were expressed in arbitrary units per mg of protein.

Statistical analysis

Statistical significance and *P* values were determined by the 2-tailed Student *t* test.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgment

We thank Dr M Christiane Brahimi-Horn for editorial assistance and Mr Benoit Front for the detection of sunitinib in experimental tumors.

Funding

This work was supported by the French Association for Cancer Research (ARC), the Fondation de France (SG and MD financial supports), the French National Institute for Cancer Research (INCA), the "Conseil Général des Alpes Maritimes," the association Monégasque "Cordons de Vie" (www.cordonsdevie.com) and Novartis (Prime award for SG). This work was performed using the microscopy (PICMI) and cytometry (CYTOMED) facilities of IRCAN. The materials of CytoMed were supported by the Conseil Général 06, the FEDER, the Ministère de l'Enseignement Supérieur, the Région Provence Alpes-Côte d'Azur and the INSERM.

Supplemental Material

Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

References

- Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Pili R, Bjarnason GA, et al. Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2009; 27:3584-90; PMID:19487381; <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2008.20.1293>
- Grepin R, Ambrosetti D, Marsaud A, Gastaud L, Amiel J, Pedetour F, Pages G. The relevance of testing the efficacy of anti-angiogenesis treatments on cells derived from primary tumors: a new method for the personalized treatment of renal cell carcinoma. *PLoS ONE* 2014; 9:e89449; PMID:24676409; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0089449>
- Xin H, Zhang C, Herrmann A, Du Y, Figlin R, Yu H. Sunitinib inhibition of Stat3 induces renal cell carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells. *Cancer Res* 2009; 69:2506-13; PMID:19244102; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4323>
- Gotink KJ, Verheul HM. Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? *Angiogenesis* 2010; 13:1-14; PMID:20012482; <http://dx.doi.org/10.1007/s10456-009-9160-6>
- Escudier B, Bellmunt J, Negrier S, Bajetta E, Melichar B, Bracarda S, Ravaud A, Golding S, Jethwa S, Sneller V. Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVO-REN): final analysis of overall survival. *J Clin Oncol* 2010; 28:2144-50; PMID:20368553; <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2009.26.7849>
- Santoni M, Amantini C, Morelli MB, Liberati S, Farfariello V, Nabissi M, Bonfili L, Eleuteri AM, Mozzicafreddo M, Burattini L, et al. Pazopanib and sunitinib trigger autophagic and non-autophagic death of bladder tumour cells. *Br J Cancer* 2013; 109:1040-50; PMID:23887605; <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2013.420>
- Abdel-Aziz AK, Shouman S, El-Demerdash E, Elgendy M, Abdel-Naim AB. Chloroquine synergizes sunitinib

- Golub TR, Lander ES, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:15545-50; PMID:16199517; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
50. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstrale M, Laurila E, et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 2003; 34:267-73; PMID:12808457; <http://dx.doi.org/10.1038/ng1180>
51. Pamer E, Cresswell P. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:323-58; PMID:9597133; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.323>
52. Zaiss DM, Standera S, Kloetzel PM, Sijts AJ. PI31 is a modulator of proteasome formation and antigen processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:14344-9; PMID:12374861; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.212257299>
53. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 2013; 6:pl1; PMID:23550210; <http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.2004088>
54. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2012; 2:401-4; PMID:22588877; <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>
55. Gerlinger M, Horswell S, Larkin J, Rowan AJ, Salm MP, Varela I, Fisher R, McGranahan N, Matthews N, Santos CR, et al. Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nat Genet* 2014; 46:225-33; PMID:24487277; <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2891>
56. Bilton R, Mazure N, Trottier E, Hattab M, Dery MA, Richard DE, Pouyssegur J, Brahimi-Horn MC. Arrest-defective-1 protein, an acetyltransferase, does not alter stability of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and is not induced by hypoxia or HIF. *J Biol Chem* 2005; 280:31132-40; PMID:15994306; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M504482200>
57. Grepin R, Guyot M, Giuliano S, Boncompagni M, Ambrosetti D, Chamorey E, Scoazec JY, Negrier S, Simonnet H, Pages G. The CXCL7/CXCR1/2 axis is a key driver in the growth of clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2014; 74:873-83; PMID:24335961; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1267>

Hypoxia optimizes tumour growth by controlling nutrient import and acidic metabolite export

Scott K. Parks, **Yann Cormerais**, Ibtissam Marchiq and Jacques Pouyssegur

(Revue publiée dans le journal Molecular Aspects of Medicine en Février 2016)

Abstract

In their quest for survival and successful growth, cancer cells optimise their cellular processes to enable them to outcompete normal cells in their microenvironment. In essence cancer cells: (i) enhance uptake of nutrients/metabolites, (ii) utilise nutrients more efficiently via metabolic alterations and (iii) deal with the metabolic waste products in a way that furthers their progression while hampering the survival of normal tissue. Hypoxia Inducible Factors (HIFs) act as essential drivers of these adaptations via the promotion of numerous membrane proteins including glucose transporters (GLUTs), monocarboxylate transporters (MCTs), amino-acid transporters (LAT1, xCT), and acid-base regulating carbonic anhydrases (CAs). In addition to a competitive growth advantage for tumour cells, these HIF-regulated proteins are implicated in metastasis, cancer 'stemness' and the immune response. Current research indicates that combined targeting of these HIF-regulated membrane proteins in tumour cells will provide promising therapeutic strategies in the future.



Review

Hypoxia optimises tumour growth by controlling nutrient import and acidic metabolite export

Scott K. Parks ^{a,*}, Yann Cormerais ^a, Ibtissam Marchiq ^b, Jacques Pouyssegur ^{a,b}^a Centre Scientifique de Monaco (CSM), Monaco^b Institute for Research on Cancer & Aging (IRCAN), CNRS, INSERM, University of Nice-Sophia Antipolis, Nice, France

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 23 December 2015

Keywords:

hypoxia
 tumour metabolism
 amino-acid transport (LAT1)
 tumour pH regulation
 carbonic anhydrases (CAs)
 monocarboxylate transporters (MCTs)
 HCO₃⁻ transport

ABSTRACT

In their quest for survival and successful growth, cancer cells optimise their cellular processes to enable them to outcompete normal cells in their microenvironment. In essence cancer cells: (i) enhance uptake of nutrients/metabolites, (ii) utilise nutrients more efficiently via metabolic alterations and (iii) deal with the metabolic waste products in a way that furthers their progression while hampering the survival of normal tissue. Hypoxia Inducible Factors (HIFs) act as essential drivers of these adaptations via the promotion of numerous membrane proteins including glucose transporters (GLUTs), monocarboxylate transporters (MCTs), amino-acid transporters (LAT1, xCT), and acid-base regulating carbonic anhydrases (CAs). In addition to a competitive growth advantage for tumour cells, these HIF-regulated proteins are implicated in metastasis, cancer 'stemness' and the immune response. Current research indicates that combined targeting of these HIF-regulated membrane proteins in tumour cells will provide promising therapeutic strategies in the future.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. General introduction	3
2. Hypoxia enhanced tumour cell nutrient supply	4
2.1. Glucose transport	4
2.2. Amino acid transport	5
3. Glycolysis, "Warburg Effect" and acid-base regulation	6
3.1. Monocarboxylate transporters (MCTs)	6
3.2. Acid-base regulation	7
3.2.1. H ⁺ extruding mechanisms (NHEs, MCTs)	8
3.2.2. Carbonic anhydrases (CAs)	8
3.2.3. HCO ₃ ⁻ transport	9
3.2.4. Acid-base regulators in migration, metastases and tumour growth	10
4. Future perspectives	10
Acknowledgements	11
References	11

Molecular Aspects of Medicine special issue: "Hypoxia in Health and Disease"

* Corresponding author. Centre Scientifique de Monaco (CSM), Monaco.
Tel.: +377 97 77 44 07; fax: +377 97 77 44 01.E-mail address: sparks@centrescientifique.mc (S.K. Parks).<http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2015.12.001>

0098-2997/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. General introduction

Contemplating biological function in low oxygen (hypoxia) conditions often evokes an image of mountain climbers struggling to scale high elevation peaks such as

Mount Everest. These extreme altitudes present environments with close to 70% less oxygen (O_2) content compared to sea level and the resulting effect on human physiology can be drastic. Tissues however are already optimised to function with a relatively low O_2 content compared to that of inspired air after delivery from the circulatory system. Pathophysiological conditions push the limits of hypoxia exposure to the extremes with tumours experiencing O_2 levels in the 1% to near anoxia range. Contrary to that observed for high altitude physiology in humans, hypoxia in pathophysiology leads to numerous advantages for areas such as tumour cell biology. These cellular advantages, particularly for survival and growth, will be the focus of this review.

Cancer cells are well established to have an altered metabolism compared to normal cells, often referred to as the 'Warburg-effect' (Gatenby and Gillies, 2004; Kroemer and Pouyssegur, 2008; Vander Heiden et al., 2009; Warburg, 1956). These metabolic differences are initiated by driver mutations (oncogenes) and then perpetuated by physiological alterations of the tumour environment. O_2 levels are a major player in driving the pathophysiology of tumour progression. This is due to the incomplete/chaotic vasculature that associates with tumour growth resulting in hypoxic zones and a reduction in nutrient availability within the tumour tissue (Fig. 1). Sensing low O_2 levels and constitutive activation of mTORC1 have proven to be essential for the maintenance of altered tumour cell metabolism through the hypoxia inducible factors (HIFs) signalling pathway, which influences the expression of more than one-thousand genes (Semenza, 2013). Of these HIF targets, a number of proteins residing at the cellular membrane play essential roles in tumour cell metabolism and progression (Fig. 1). We wish to convey the role of a selection of these proteins in the 'big-picture' view of the tumour cell lifespan. In this respect we will discuss the importance of HIF controlled membrane proteins that enhance (i) nutrient uptake, (ii) utilisation, and (iii) waste handling in the aggressive tumour tissues that develop distant from the vasculature.

2. Hypoxia enhanced tumour cell nutrient supply

Rapidly proliferating tumour cells require an abnormally enhanced nutrient supply to support their increased bioenergetics and demand for carbon building blocks compared to normal cells (McCracken and Edinger, 2013). This nutrient requirement must be overcome in an environment that lacks regular perfusion of nutrients due to a chaotic vasculature. Hypoxia has been revealed to play a major role in order to compensate for the increased nutrient demand of tumour cells (Fig. 1). Here we will focus primarily on the role of glucose and amino acid transport in the nutrient supply chain of the hypoxic tumour environment.

2.1. Glucose transport

The majority of cancer cells are commonly described as 'glucose addicts'. There is considerable debate in the literature with respect to the ultimate role of this glucose addiction. On the surface it appears that the obvious selection pressure is to provide more cellular energy (ATP) for proliferation purposes. However, there is mounting evidence that enhanced glycolysis rates in tumour cells, which consume large amounts of glucose for low yields of ATP, play a more essential role in the production of intermediates and macromolecules required for cellular proliferation (Vander Heiden et al., 2009). Evidently, there is a combined importance of both ATP and production of carbon precursor metabolites but the point remains that enhanced glucose uptake is a hallmark of aggressive tumours and FDG PET-scanning is routinely used to provide valuable clinical diagnoses (Szablewski, 2013).

Glucose membrane transporters (GLUTs/SLC2A family, Fig. 2) consist of 14 family members with GLUT1 receiving the most attention in tumour biology (Szablewski, 2013). Numerous studies have demonstrated that GLUT expression corresponds with poor prognosis and metastases in

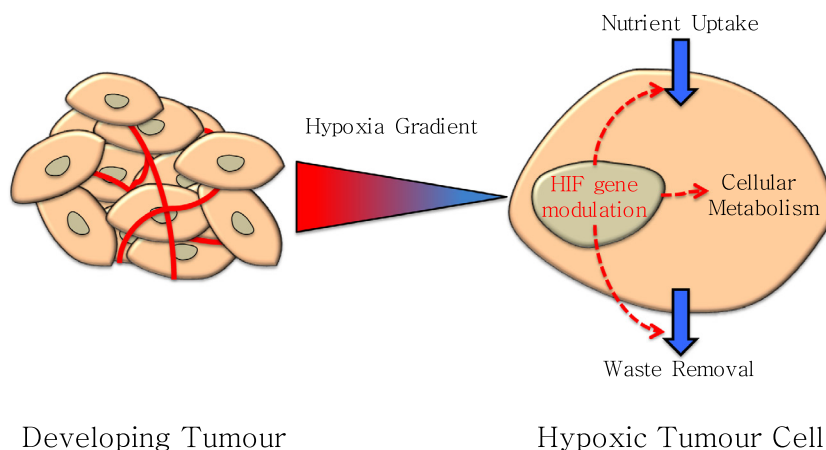


Fig. 1. Generalised model of the impact of hypoxia on nutrient uptake, utilisation and waste removal in tumour cells. A 3-dimensional model is depicted with a chaotic vasculature leading to the development of a hypoxia gradient within the solid tumour. The hypoxia-inducible factor (HIF) responds to hypoxia to regulate gene expression that ultimately regulates membrane transporters in the enhancement of nutrient uptake, cellular metabolism and metabolic waste removal.

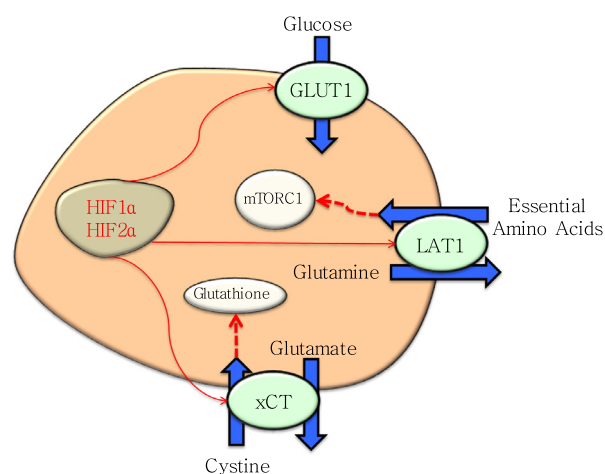


Fig. 2. Hypoxia enhances nutrient uptake in tumour cells. Due to their exacerbated metabolism, tumour cells require an enhanced nutrient supply and this is maintained by hypoxia to a certain extent with induction of glucose and amino acid transporters. HIF induces GLUT1 expression to supply the 'glucose addiction' of tumour cells while LAT1 (HIF-2) is also increased to provide essential amino acids and maintain mTORC1 activity for protein synthesis. xCT is an amino acid transporter regulated by HIF-1 that contributes to tumour cell progression via providing cystine for the synthesis of the antioxidant glutathione.

cancers such as lung, colon (Younes et al., 1996, 1997), breast and others (reviewed by Macheda et al., 2005; McCracken and Edinger, 2013; Szablewski, 2013). Tumours experience a dual regulation on glucose transport to satisfy heightened energy demand. Independent of hypoxia, GLUT1 expression is demonstrated to play a role in early tumour progression due to Ras and Myc oncogenes or HPV infection (reviewed by Macheda et al., 2005). However, it is not clear if this response is initiated by oncogenic signalling resulting in increased GLUT expression to increase energy supply or as a secondary response to increased glucose consumption via glycolysis. Nonetheless, the induction of GLUT1 by growth factors or oncogenic transformation is a direct consequence of c-Myc induction of GLUT1 as is the case for other glycolytic enzymes (Osthus et al., 2000).

Following tumour initiation, GLUTs, like other glycolytic enzymes induced by c-Myc, are further regulated by hypoxia (Kroemer and Pouyssegur, 2008; Stine et al., 2015). Early studies on HIF gene regulation provided evidence for HREs (Hypoxia response elements) for GLUT1 and binding of the HIF complex to the promoter of both GLUT1 and GLUT3 (Ebert et al., 1995; Zelzer et al., 1998). Although further extensive analysis of the hypoxia-regulating component has not been performed, GLUT1 is routinely considered as the essential contributor to glucose uptake in cancer cells. Na⁺-coupled glucose transporters also contribute to cancer cell metabolism, however, as they are not regulated by hypoxia, it appears that GLUT1 is a marker of more aggressive tumours in oxygenated and vast hypoxic zones. In the global sense, Na⁺-coupled glucose transporters must be considered as a viable avenue for glucose supply to cancer cells if GLUTs are disrupted.

Therefore, as hypoxia arrives following tumour cell metabolic transformation and growth, HIF-regulation of GLUT1

indicates that this glucose uptake mechanism becomes even further important in the context of the tumour microenvironment. This reveals that targeting GLUT transporters would be beneficial at each stage of tumour progression as it appears there is a strong glucose addiction in both early and late tumour progression (advanced clinical stage). Current therapeutic development strategies targeting GLUT include decreasing mRNA expression (Szablewski, 2013), applying antibodies (Rastogi et al., 2007) and direct pharmacological blockers (Koch et al., 2015). Furthermore, GLUT1 is being implicated in the growth, survival and maintenance of stemness in cancer stem cells, which broadens its potential benefit as a future therapeutic target (Shibuya et al., 2015).

2.2. Amino acid transport

Amino acids (AAs) represent an important class of nutrients that are obligatory for survival of any cell. These nutrients are most commonly known as the building blocks of proteins but they also act as essential metabolites in the biosynthesis of fatty acids, membrane lipids and nucleotides. Thus in combination with their need for increased glucose uptake, rapidly growing tumour cells require an enhanced uptake of AAs to face the increased demand of exacerbated metabolism and biosynthetic processes (McCracken and Edinger, 2013). AAs, like all hydrophilic nutrients, cannot cross the plasma membrane without carrier proteins. To date, approximately thirty AA transporters have been described for mammalian cells, which are expressed in a tissue-specific manner (Bhutia et al., 2015; Broer, 2002; Makrides et al., 2014). Interestingly, only two AA transporters are known to be overexpressed in cancer and up-regulated by hypoxia: xCT (SLC7A11) through HIF-1 (Lu et al., 2015) and LAT1 (SLC7A5) by HIF-2 (Elorza et al., 2012).

LAT1 (L-type AA transporter 1) is responsible for Na⁺-independent transport of large neutral and essential AAs (Fig. 2). It is an obligatory exchanger with the uptake of one AA being coupled with the efflux of another AA (Kanai et al., 1998; Yanagida et al., 2001). LAT1 forms a heterodimer with the CD98 glycoprotein which acts as a chaperone promoting stabilisation, trafficking and functional insertion of LAT1 to the plasma membrane (Yanagida et al., 2001). LAT1 is overexpressed in a wide range of tumour types including prostate (Sakata et al., 2009), lung (Kaira et al., 2008), gliomas (Haining et al., 2012), and renal cell carcinomas (Betsunoh et al., 2013; Elorza et al., 2012). LAT1 is therefore an attractive and potential therapeutic target currently in a phase I clinical trial for patients treated with a specific LAT1 inhibitor JPH203 (Rosilio et al., 2015; Yun et al., 2014).

Recently, it was demonstrated that LAT1 is up-regulated by HIF-2 to promote cell proliferation in clear cell renal carcinoma (Elorza et al., 2012). This control of LAT1 expression by HIF-2 offers an explanation for the high expression of LAT1 in supporting tumour cell metabolism within hypoxic areas but also for oxygenated cells, like pVHL-null, for which the mechanism of HIF instability has been disrupted (Shen et al., 2011). Interestingly, HIF-2 dependent induction of LAT1 was shown to be essential to fully activate mTORC1 and promote tumour growth (Elorza et al., 2012). Regulation of mTORC1 by AAs is a very hot topic and in spite of recent

advances demonstrating the translocation of mTORC1 to the lysosome (Efeyan et al., 2015) the mechanism is not fully understood (Rebsamen et al., 2015; Wang et al., 2015). To summarise, LAT1 dependent activation of mTORC1 appears to occur from a dual AA signalling acting in cytoplasmic and lysosomal compartments (Efeyan et al., 2015; Hara et al., 1998). LAT1 transported leucine is detected by the tRNA charging enzyme Leucyl-tRNA Synthetase (Bonfils et al., 2012; Han et al., 2012) whereas LAPTM4b targets LAT1 to the lysosomal membrane (Milkereit et al., 2015). This HIF-2-LAT1-mTORC1 signalling axis demonstrates an incredible capacity for cancer cells to ensure essential AA uptake under hypoxic and nutrient depleted environments.

Interestingly, recently another AA transporter, xCT, was reported to be inducible by hypoxia (Lu et al., 2015). This carrier is an Na⁺-independent obligatory exchanger of cystine (Cys-S-S-Cys) and glutamate (Fig. 2), and like LAT1 requires association with CD98 (Fotiadis et al., 2013; Sato et al., 1999). In contrast to other AA transporters which carry a family of substrates, xCT is unique in that it only transports cystine (Sato et al., 1999) acting not as a nutrient carrier but more as a defensive protein to protect cells against oxidative stress and chemotherapy (Okuno et al., 2003). Indeed, intracellular reduction of cystine to form cysteine, which is an essential precursor of glutathione, provides one of the major intracellular antioxidants that play a key role in tumour chemo-resistance. Interestingly, HIF-1 induced xCT expression and glutathione synthesis has been implicated in an enrichment of the cancer stem cell population in triple negative breast cancer (Lu et al., 2015). More development on this topic appears in an accompanying chapter of this issue covered by Semenza's group.

The hypoxia-induced chemo-resistance of tumours remains one of the most difficult parameters to deal with in the fight against cancer. HIF induced AA transporters provide attractive, but yet unexplored, targets for the design and development of a new class of anticancer drugs. Therapies targeting these nutrient transporters are being developed that hold promise as both direct targets and factors to synergise with chemotherapy (Harris et al., 2015; Rosilio et al., 2015; Timmerman et al., 2013; Yun et al., 2014). We thus feel that this will be an important theme in future cancer discovery.

3. Glycolysis, “Warburg Effect” and acid-base regulation

We and others have previously summarised the well known ‘Warburg Effect’ in tumour cells whereby glycolysis becomes the predominant metabolic pathway utilised in the presence or absence of oxygen (Gatenby and Gillies, 2004; Kroemer and Pouyssegur, 2008; Parks et al., 2013a; Pouyssegur et al., 2006). A number of membrane proteins that enhance glycolysis and deal with the production of additional metabolic wastes are regulated by hypoxia including monocarboxylate transporters (MCTs) and carbonic anhydrases (CAs). These hypoxic adaptations ensure that tumour cells thrive and outcompete normal tissues for space in the body. Recently, intriguing insights have been gained for these proteins with respect to the interactions with the immune

system and ‘cancer stemness’ that will evidently be the direction of future research.

3.1. Monocarboxylate transporters (MCTs)

Enhanced glycolytic activity generates large amounts of acidic by-products, particularly lactic acid (DeBerardinis et al., 2007; Gatenby and Gillies, 2008; Lunt and Vander Heiden, 2011). This threatens the intracellular pH (pH_i) homeostasis and consequently cell growth and survival, as alterations in pH_i may disturb a wide range of biosynthetic and signalling processes (Gottlieb et al., 1996; Lagadic-Gossmann et al., 2004; Webb et al., 2011). Cancer cells have developed adaptive strategies to extrude acid and regulate pH_i that will be further discussed below. However, tumour cells also require an enhanced export of lactic acid to ensure a continuous glycolytic rate and ATP production. In cancer cells this is achieved by lactate/H⁺ symporters belonging to the monocarboxylate transporter (MCT) family (Halestrap, 2012, 2013). The MCT family (SLC16) includes 14 members. Four isoforms (MCT1–4) provide a co-transport of protons and short chain carbohydrates such as pyruvate and L-lactate, with MCT1 (*SLC16A1*) and MCT4 (*SLC16A3*) preferentially regulating the transport of lactic acid across the plasma membrane (Halestrap, 2012, 2013) (Fig. 3). MCT export of lactic acid not only contributes to the acidification of tumour microenvironment, but also plays a key role in promoting tumour cell migration and angiogenesis, as well as suppressing the anti-cancer immune defence (reviewed in Goetze et al., 2011; Hirschhaeuser et al., 2011; Marchiq and Pouyssegur, 2015).

MCT1 and MCT4 differ by their substrate affinity: MCT1 transports L-lactate (K_m ≈ 1–3.5 mmol/L) and pyruvate (K_m ≈ 0.1–0.74 mmol/L) (Halestrap, 2012; Poole and Halestrap, 1993) with greater affinity compared to MCT4

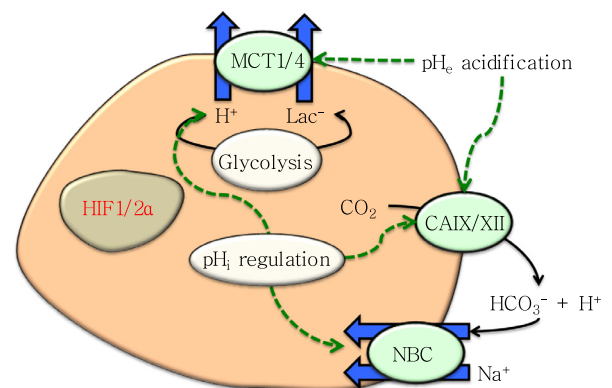


Fig. 3. Hypoxia enhances glycolysis, acidifies pHe and regulates pHi. Tumour cells experience an exacerbated glycolytic metabolism that is potentiated by the hypoxia induction of enzymes in the glycolytic pathway. MCT4 induction by hypoxia ensures continued energy production via glycolysis by exporting lactic acid. MCT4 activity also contributes to the maintenance of an alkaline pH_i while acidifying the extracellular microenvironment. Hypoxia also strongly influences the CO₂/HCO₃⁻ balance of tumour cells via induction of extracellular facing CAIX and CA XII. These proteins assist in the regulation of pH_i in co-ordination with Na⁺/HCO₃⁻ co-transporters (NBC) while further contributing to the acidification of pH_e.

(with $K_m \approx 28$ mmol/L and 153 mmol/L, respectively) (Dimmer et al., 2000; Manning Fox et al., 2000). These differences are indicative of their respective metabolic roles and tissue expression patterns (Fishbein et al., 2002). MCT4's low affinity for pyruvate prevents its release from glycolytic cells and thus facilitates the conversion of pyruvate into lactate required to regenerate cytosolic NAD^+ (Dimmer et al., 2000). Consequently, MCT4 is restricted to highly glycolytic tissues such as white skeletal muscle fibres and astrocytes. In contrast, the high affinity of the ubiquitous MCT1 for lactate may be important for lactate influx and thereby it is highly expressed in red skeletal muscle, the heart, red blood cells, and the liver, where it plays a role in lactate shuttle (reviewed in Halestrap, 2013).

MCT4 was identified as an HIF-1 up-regulated gene via binding of two HREs (Ullah et al., 2006). In breast cancer, this hypoxia-induced expression of MCT4 was recently reported to be dependent on growth factors, including insulin and EGF (Baenke et al., 2015). However, while there is no evidence of an HRE on the MCT1 gene, other transcriptional factors such as MYC and PGC-1 α have been described to regulate MCT1 expression (Doherty et al., 2014; Hashimoto et al., 2007). Based on the activity of these transcriptional factors, it is not surprising that MCT1 and MCT4 have been shown to be up-regulated in several cancers, including cervical, glioblastoma, melanoma, breast, colorectal, kidney and lung (Doyen et al., 2014; Gerlinger et al., 2012; Pinheiro et al., 2012). Conversely, the distribution pattern of these two MCTs is different, not only between distinct cancer types but also between different intra-tumoural compartments and cell types. MCT4 was reported to be up-regulated in hypoxic tumour cells (Meijer et al., 2012; Rademakers et al., 2011) and tumour associated fibroblasts (Pavlides et al., 2009; Whitaker-Menezes et al., 2011; Witkiewicz et al., 2012) where it supports lactate release, whereas MCT1 was highly expressed in oxidative tumour cells and angiogenic endothelial cells (Sonveaux et al., 2012; Vegran et al., 2011) that recapture lactate and convert it into pyruvate to feed the TCA cycle, thereby increasing glucose availability for hypoxic cells (Bonuccelli et al., 2010).

Information summarised above combined with studies showing that elevated lactate concentrations are associated with poor outcome (Marchiq and Pouyssegur, 2015) has resulted in increased interest in targeting MCTs for cancer therapy. Inhibiting MCT1 has shown striking impairment of tumour cell growth in HRas-transformed fibroblasts (Le Floch et al., 2011), Burkitt lymphoma, MCF7 breast cancer cells (Doherty et al., 2014), small cell lung cancer (SCLC) and gastric cancer cell lines (Polanski et al., 2014). Targeting CD147/BASIGIN, which is a required ancillary protein for proper folding and trafficking to the cell surface of both MCT1 and MCT4, has also shown promising anti-tumour effects (Baba et al., 2008; Granja et al., 2015; Le Floch et al., 2011; Marchiq et al., 2015; Schneiderhan et al., 2009).

However, in the context of the hypoxic tumour environment, emerging evidence points to a crucial role of MCT4 in tumour progression highlighting the necessity of developing MCT4-specific inhibitors. Indeed, due to functional redundancy between MCT1 and MCT4, it has been shown that silencing or pharmacological inhibition of MCT1 in human colon adenocarcinoma cells was only effective in the

absence of MCT4 (Le Floch et al., 2011; Marchiq et al., 2015). MCT4 has also been implicated as a pH-regulating system *in vivo* that maintains the reversed pH gradient ($pH_i > pH_e$) to increase tumour progression (Chiche et al., 2012). Moreover, highly aggressive tumours (i.e. triple-negative breast cancers (Doyen et al., 2014)) are reported to predominantly express the hypoxia-induced MCT4. Furthermore, MCT4 is essential for lactate secretion, pH homeostasis and survival of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) cell lines (Gerlinger et al., 2012). High levels of MCT4 in primary ccRCC tumours correlated with poor relapse-free survival and metastatic lesions exhibited higher MCT4 expression than primary tumours. Similarly, recent studies have shown that MCT4 is over-expressed in a highly glycolytic subtype of pancreatic adenocarcinoma (PDA) (Baek et al., 2014). MCT4 attenuation in PDA resulted in a substantial reduction of glycolytic flux, which evoked compensatory mechanisms including increased oxidative phosphorylation, macropinocytosis and autophagy. Consistent with this, an unbiased functional RNA interference screen has recently shown that MCT4 is an important regulator of breast cancer cell survival (Baenke et al., 2015). Similar to PDA cell lines, MCT4-depleted breast cancer cells revealed reduced glycolytic flux resulting in increased uptake of AAs, particularly glutamine, and enhanced entry of glucose-derived pyruvate into the TCA cycle. In spite of these adaptations, MCT4 depletion reduced tumour growth and increased cell death due to elevation of reactive oxygen species in some tumour cells and decreased pH_i . Loss of cell viability was enhanced by treatment with inhibitors of macropinocytosis (EIPA), autophagy (Chloroquine), glutaminolysis (BPTES), and mitochondrial complex I (metformin/phenformin) (Baek et al., 2014; Baenke et al., 2015; Marchiq et al., 2015).

High MCT4 expression in the aggressive mesenchymal subset of glioblastoma (GBM) was shown to be inversely correlated with overall survival of GBM patients (Lim et al., 2014). MCT4 knockdown dramatically reduced the stem-like CD133-positive population, leading to reduced proliferation *in vitro* and intracranial tumour xenograft formation *in vivo* (Lim et al., 2014). However, these effects seem to be independent of MCT4 transport activity, suggesting an unidentified function of the transporter. Moreover, depletion of MCT4 in GBM dramatically reduced HIF1 α transcriptional activity implying that more studies are needed to clearly determine the mechanisms regulating MCT4 expression and function (Lim et al., 2014).

Finally, MCT4 activity is reported to be significantly increased in hypoxia through up-regulation of CAIX which, like CAII for MCT1, functions as an 'H⁺-distributing antenna' that dissipates local proton micro-domains and facilitates H⁺/lactate co-transport (Becker et al., 2010; Jamali et al., 2015). Combined, these new developments in MCT research may be useful for developing novel anti-cancer strategies that will interfere with MCT4 expression and H⁺/lactate efflux in hypoxic areas of tumour tissues.

3.2. Acid-base regulation

A common distinguishing feature of solid tumours is the presence of an acidic extracellular environment. As mentioned above, this arrives via the excretion of lactic acid

(MCTs) but is also enhanced by CO₂ hydration via the extracellular facing CAs. Thus tumour cells are required to deal efficiently with increased metabolic waste production to survive in their potentially hostile environment. This is enabled by an extremely efficient pH_i regulating mechanism that maintains tumour cell pH_i in the alkaline range despite the acidic surroundings (for review see Parks et al., 2013a). We have recently re-enforced that hypoxia provides a definite survival advantage for tumour cells experiencing acidosis (Parks et al., 2013b). This improved survival in hypoxia is a combination of enhanced pH_i regulating capacities that can maintain sufficient ATP levels for cellular function. Tumour cell pH_i regulation follows the classical models of either H⁺ extrusion or HCO₃⁻ buffering of the cytoplasm (Swietach et al., 2014). A redundancy of pH_i regulating proteins is evident in tumour cells with alterations in a few key players under hypoxia appearing to give tumour cells their pH_i regulating advantage over normal cells (for extensive review see Parks et al., 2011, 2013a).

3.2.1. H⁺ extruding mechanisms (NHEs, MCTs)

The ubiquitous Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1) is implicated in regulating tumour cell pH_i (Beltran et al., 2008; Lagarde et al., 1988; Luo and Tannock, 1994; Reshkin et al., 2000). However, despite original indications that NHE1 was regulated by hypoxia (Rios et al., 2005; Shimoda et al., 2006) this has not proven to be a feature of tumour cells. Analysis of NHE function in various cell lines revealed differential effects depending on oxygenation levels and cell lines which further questions a direct role of hypoxia in NHE1 function (Hulikova et al., 2013). Therefore we must be cognisant of the contribution that NHE1 plays in tumour cell pH_i regulation, but in the discussion of the hypoxia advantage for survival and proliferation in acidosis we assume that influence from changes in NHE1 expression does not occur. To date, other NHE isoforms have not been strongly implicated in either tumour pH_i regulation or the hypoxia response.

As mentioned above, MCTs extrude H⁺ from the cell in combination with lactate. Although this transporter does not directly respond to pH_i changes (it is driven by lactate production), the high glycolytic rate of tumour cells and enhanced MCT extrusion activity contributes to the regulation of pH_i (Fig. 3). Indeed it has been demonstrated that tumour cells lacking the hypoxia inducible MCT4 experience an acidic pH_i compared to wild-type cells (Chiche et al., 2012; Marchiq et al., 2015). Therefore evidence is mounting for MCTs to be considered as “non-classical pH_i regulating” proteins which make an important contribution to the pH_i balance of tumour cells in the face of altered metabolic states.

Finally, H⁺ extrusion could occur via direct pumping of H⁺-ATPases (for review see Neri and Supuran, 2011). This mechanism is not an obvious candidate as convincing evidence for localisation at the plasma membrane is lacking. Furthermore, hypoxia does not regulate H⁺-ATPase expression so it will not be a focus here.

3.2.2. Carbonic anhydrases (CAs)

Extracellular CAIX is one of the most sensitive hypoxia markers and has received intense scrutiny over the past 15 years since its original hypoxia-induced description (Wykoff

et al., 2000). It is now well established that this enzyme is key in the acidification of the extracellular space (pH_e) (Svastova et al., 2004; Swietach et al., 2009) and maintenance of an alkaline pH_i (Chiche et al., 2009; Swietach et al., 2008, 2009). The underlying hypothesis is that CA IX converts CO₂ to H⁺ + HCO₃⁻ with the HCO₃⁻ being re-absorbed by the cell to buffer pH_i while H⁺ diffuses to the bloodstream for clearance (Fig. 3).

CAIX has become an important clinical marker or poor prognosis in a number of tumour types (for an extensive summary refer to Chiche et al., 2010; Neri and Supuran, 2011; Sedlakova et al., 2014). Numerous pre-clinical studies have validated that disruption of CAIX alters both pH_e and pH_i and gene knockdown has been effective in slowing or even stopping the growth of tumour cells in both *in vitro* and *in vivo* models (Chiche et al., 2009; Lock et al., 2013; Lou et al., 2011; McIntyre et al., 2012; Svastova et al., 2004; Swietach et al., 2008, 2009). Consequently, there has been an intense focus on pharmacological inhibitor development, which has led to current on-going clinical trials for this promising anti-cancer target (Neri and Supuran, 2011). Encouraging results for other clinical applications have demonstrated increased sensitivity to ionising radiation with CAIX disruption (Doyen et al., 2012; Dubois et al., 2011; Duivenvoorden et al., 2015). CAIX targeting has been shown to improve chemotherapeutic and antibody treatments such as bevacizumab (McIntyre et al., 2012) and is continuing to be an important target in therapeutic development (Pore et al., 2015; Ward et al., 2015). In addition, CAIX disruption can be important in the stroma where induction in prostate stromal fibroblasts has been demonstrated to play an important role in tumour progression and metalloprotease activity (Fiaschi et al., 2013). More recently, focus has been placed on monitoring the *in vivo* function of CAIX. These results reinforce that the primary role of CAIX *in vivo* is to acidify the extracellular tumour space, while in turn this acidification limits its catalytic activity thus necessitating the increased expression that is observed with hypoxia (Gallagher et al., 2015).

The last 2–3 years have observed a divergence from the original focus on the pH physiology of CAIX to observe its interactions with other components of tumour progression. These include interactions with immune factors and the influence on the prevalence of cancer stem cells (CSCs) in the tumour environment. Dedhar's group was the first to provide evidence for the role of CAIX and hypoxia in the enrichment of breast CSCs (Lock et al., 2013). Utilisation of a small molecule inhibitor for CAIX decreased the CSC population resulting in diminished tumour growth and metastases. This work was complemented by another group showing a role for CAIX overexpression in MCF7 breast cancer CSCs (Papi et al., 2013). CAIX has now been linked to priming of the stem cell niche via its interactions with cytokines such as G-CSF and CCL5 (Chafe et al., 2015). Recently Harris' group sorted CAIX ^{-/+} expressing cells from hypoxia exposure (0.1% O₂) based on chromatin organisation and found that gene markers of stem cells (such as ALDH1, TWIST1, SOX2) were enriched in the CAIX (+) expressing cells (Ledaki et al., 2015). Importantly, only the CAIX (+) cells were able to exhibit functional properties of CSCs such as ALDH enzymatic activity and mammosphere production. To

complete the story they investigated HDAC (Histone deacetylase) inhibitors as they have been shown to reduce expression of stem cell markers (Karantzali et al., 2008; Park et al., 2011). HDAC inhibitors acted both to decrease CAIX expression and to reduce cell growth in the CAIX (+) cells only (Ledaki et al., 2015). Evidently, the role of CAIX in hypoxic CSCs is an exciting area of current study that may provide promising additional therapeutic areas in the future.

CAXII is also an extracellular facing CA regulated by hypoxia but it has received less attention compared to CAIX. CAXII is often expressed with CAIX (Haapasalo et al., 2008; Tafreshi et al., 2012; Wykoff et al., 2000), has been linked with poor prognosis in various cancers (Chien et al., 2012; Haapasalo et al., 2008) and can contribute to the regulation of tumour pH_e and pH_i (Chiche et al., 2009; Kopecka et al., 2015). CAXII has been suggested to contribute to the redundancy of CA activity in tumours by compensating for a loss of CAIX activity under experimental disruption (Chiche et al., 2009). Some controversy exists in the literature as to the similarities between CAIX and CAXII for prognosis as CAXII has also been described as a good prognostic factor (Ilie et al., 2011; Watson et al., 2003). Recently, CAXII has been described as a gene marker for thyroid malignancies, providing a valuable diagnostic tool in the clinic for this tissue that is difficult to diagnose (Zheng et al., 2015).

Increased scrutiny of CAXII will be encouraged in the context of two recent studies. A CAXII specific antibody (6A10) was shown to block the catalytic activity of CAXII and prevent cell growth *in vitro* (Gondi et al., 2013). This was confirmed by *in vivo* xenografts (A549 cells) where 6A10 application effectively slowed tumour growth. A point to consider in this study is that CAXII appeared to carry the dominate catalytic activity in these cells indicating that CAIX and/or CAXII expression patterns may need to be definitively understood depending on tumour type for treatment strategies. Further to this study, it has just been reported that CAXII is up-regulated as a marker of chemo-resistance in colon (HT29), lung (A549) and osteosarcoma (U2-OS) cells (Kopecka et al., 2015). This study demonstrated that the CAXII up-regulation in doxorubicin resistance was HIF1-dependent and that CAXII contributed directly to pH regulation. Increased CAXII expression was shown to be necessary for the activity of Pgp (P-glycoprotein; a classical marker of multidrug resistance) suggesting that CAXII inhibition could be a promising avenue to overcome chemoresistance associated with Pgp (Kopecka et al., 2015). In light of these important new findings for the role of CAXII it will be of interest to observe if a generalised CA inhibitory approach will prove more successful compared to inhibition of a single CA isoform in future studies.

No other CA members of the 15 total that exist have been implicated in the hypoxia response. The intracellular CAII has been proposed to play a role in certain instances (for review see Parks et al., 2011) but its overall contribution to tumour cell physiology has not been determined. In light of the expansive work by Boron's group in the description of a CA "push and/or pull" mechanism for moving CO_2/HCO_3^- across the membrane (Musa-Aziz et al., 2014a, 2014b; Occhipinti et al., 2014) we predict that the role of intracellular CAII and its interactions with extracellular CAs may prove to be more important than originally thought.

Recently Swietach's group has shown that CAII activity exacerbates pH_i fluctuations during changes in cellular CO_2 levels that results in large Ca^{2+} fluctuations and changes in mTORC1 cellular signalling (Hulikova et al., 2014). Thus CA interactions between hypoxia and non-hypoxia regulated isoforms in the overall CO_2/HCO_3^- balance of tumour cells and the cellular signalling pathways that are initiated as a result are a current focus of our on-going research that we believe will prove valuable for therapeutic development.

3.2.3. HCO_3^- transport

An elusive molecular component of the hypoxia driven pH-regulating system in tumour cells has been the HCO_3^- transporter allegedly responsible for re-absorbing HCO_3^- to maintain an alkaline pH_i (Fig. 3). This is likely due in part to the vast number of potential HCO_3^- transporters originating from both the SLC4 (9 HCO_3^- transporting members (Romero et al., 2013)) and SLC26 (7 HCO_3^- transporting members (Alper and Sharma, 2013)) gene families. In addition, HCO_3^- transport inhibitors such as DIDS are notoriously non-specific and it has just been reported that the NBC specific inhibitor S0859 inhibits MCT1/2/4 even more effectively than NBC (Heidtmann et al., 2015). Thus achieving clear results via inhibitor studies has been difficult. Historically, none of the HCO_3^- transporting members presented a clear regulation by hypoxia in the literature. We recently described that the electrogenic NBC (SLC4A4, NBCe1) is induced by hypoxia at the gene level in an HIF1 α dependant manner (Parks and Pouyssegur, 2015). However, this hypoxia induction was limited to one cell line (6 cell lines tested in total) and a generalisation of the hypoxia regulation of SLC4A4 in other cell lines remains to be determined. Nonetheless, knockdown of SLC4A4 proved to impact on important areas of tumour cell (colon and breast) physiology including growth, migration, and pH regulation (Parks and Pouyssegur, 2015). This complements a series of studies that have described the importance of the electroneutral NBC (NBCn1, SLC4A7) in a subset of breast cancers (Boedtkjer et al., 2013; Gorbatenko et al., 2014; Lauritzen et al., 2010, 2012; Lee et al., 2015b). The most recent advance in NBCn1 studies has demonstrated a delay in the chemical induction of breast tumour development in NBCn1 knockout mice (Lee et al., 2015a). Although well studied, NBCn1 has never proven to be regulated by hypoxia. Therefore, the literature implicating HCO_3^- transporters in the importance of regulating tumour cell pH is growing but a direct hypoxia regulation of HCO_3^- transport is still lacking. Cooperation between the strongly hypoxia regulated carbonic anhydrases and HCO_3^- transporters as previously suggested (Svastova et al., 2012) will be an active area of study as we progress to a more global appreciation of HCO_3^- regulation in the tumour cell pH regulating machinery.

A bicarbonate therapy approach has been developed for clinical use based on the context of the hypoxia-induced alteration in pH and CO_2/HCO_3^- levels due to the presence of proteins such as CAIX. Predicting that HCO_3^- or other systemic buffers would neutralise the acidic pH of the tumour environment, members of Gatenby and Gillies teams demonstrated impressive results on the inhibition of metastasis with this simple therapeutic approach (Robey et al., 2009;

Silva et al., 2009). This work has been extended to other models of acid-mediated invasion (Estrella et al., 2013) and is being considered in the context of tumour heterogeneity (Robertson-Tessi et al., 2015) in the continued development for this promising buffer therapy in a clinical setting. Thus in the context of tumour hypoxia, $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ balance, disruptions due to CA activity will continue to be an essential consideration in the overall models of tumour development moving forward.

3.2.4. Acid-base regulators in migration, metastases and tumour growth

Membrane proteins controlling pH gradients have been shown to contribute to cell migration and invasion. Establishment of pH gradients across the cytoplasm is thought to play a role with the re-distribution of pH regulating proteins to the leading or trailing edge of the cell (Schwab et al., 2012). These proteins contribute to the phenomenon of acid-mediated metastasis leading to poor patient prognosis (Gatenby and Gillies, 2008; Gatenby et al., 2006; Gillies et al., 2012; Rofstad et al., 2006). Extracellular acidification has been recently demonstrated to clearly direct tumour invasion (Estrella et al., 2013) while *in vitro* models have confirmed a role for hypoxia regulated CAIX and NBC in cellular migration/invasion (Parks and Pouyssegur, 2015; Svastova et al., 2012). The role that acidosis and these hypoxia-regulated proteins play in metastases strengthens their potential for tumour specific therapeutic benefit as drug targets.

Potentially, the role of pH regulating proteins in cell migration has been under-appreciated for primary tumour growth. Recently, an evolutionary study of tumour development has shown that cell migration (even on a small scale) is required to achieve an exponential and nodule tumour expansion (Waclaw et al., 2015). The authors conclude that tumour cell migration is not only important for metastasis but also essential for exponential tumour growth. Thus the role of hypoxia controlled pH-regulating proteins in both

micro and macro migratory ability should be assessed in future studies to improve the evaluation of their use as therapeutic targets.

4. Future perspectives

Pathophysiological responses initiated by hypoxia have clearly given tumour cells a means to rapidly expand and outcompete their surrounding normal tissues. Considering that hypoxia touches three key areas of cellular function as we have summarised in this review including nutrient supply, utilisation, and waste removal it appears that hypoxia-regulated proteins present valuable targets for drug development (Fig. 4). Additionally, as hypoxia is limited in normal tissues, these targets have the appealing characteristic of being tumour specific, the best case being represented by CAIX. Others and we have previously proposed mechanisms of combined protein disruption that will lead to metabolic disorders and ultimately tumour cell death. This synthetic lethality approach continues to be expanded in the context of tumour cell metabolism and hypoxia. In light of new data supporting a role in important clinical parameters such as tumour cell stemness, we believe it is vital to continue these experimental approaches in the future. Since (i) pH_i disruptions alter the function of most enzymes, (ii) AA levels direct the activity of the mTORC1 growth signalling pathway, and (iii) lactate expulsion is essential for maintaining the glycolytic propensity of tumour cells, a combination therapy targeting components of these systems should prove useful for combating tumour growth (Fig. 4). For certain hypoxia-regulated proteins such as CAIX, the most dramatic anti-tumoural effects have been observed in syngeneic mouse models (Lou et al., 2011). Thus it appears that future studies must focus more keenly on these types of models coupled with their immune system interactions. Evidently, the pursuit of cell membrane hypoxia-regulated drug targets will remain an important component of cancer discovery in the coming years.

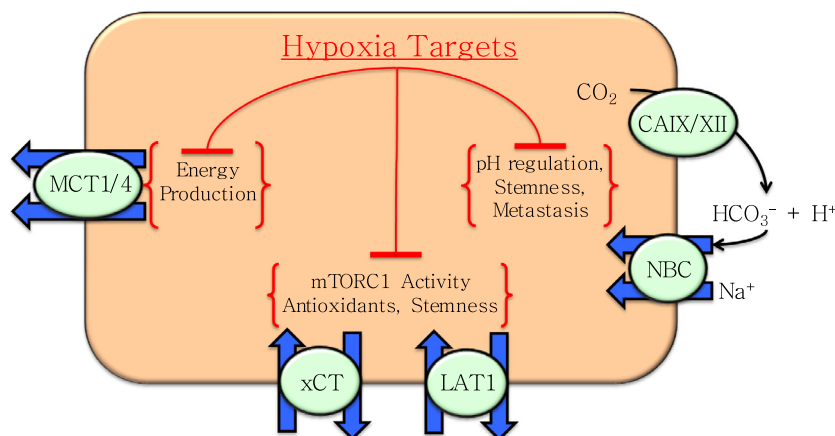


Fig. 4. Targeting hypoxia regulated membrane proteins for developing cancer therapies. Hypoxia provides three key areas of tumour cell progression that hold promise for stopping tumour growth. Various studies are in progress to assess how disruptions of glycolytic energy production via MCT inhibition, interfering with amino-acid transport, and blocking of CA activity/pH_i regulation can stress the tumour cell sufficiently to arrest growth and potentially lead to cell death in their microenvironment. These therapeutic developments also have the potential to disrupt cancer stemness and metastasis.

Acknowledgements

The authors of this manuscript have received funding from a variety of sources including the Centre Scientifique de Monaco, the Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC; Equipe labellisée), Fondation ARC, INCa, ANR, the EU-FP7 “METOXIA”, and SERVIER-CNRS.

References

- Alper, S.L., Sharma, A.K., 2013. The SLC26 gene family of anion transporters and channels. *Mol. Aspects Med.* 34, 494–515.
- Baba, M., Inoue, M., Itoh, K., Nishizawa, Y., 2008. Blocking CD147 induces cell death in cancer cells through impairment of glycolytic energy metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374, 111–116.
- Baek, G., Tse, Y.F., Hu, Z., Cox, D., Buboltz, N., McCue, P., et al., 2014. MCT4 defines a glycolytic subtype of pancreatic cancer with poor prognosis and unique metabolic dependencies. *Cell Rep.* 9, 2233–2249.
- Baenke, F., Dubuis, S., Brault, C., Weigelt, B., Dankworth, B., Griffiths, B., et al., 2015. Functional screening identifies MCT4 as a key regulator of breast cancer cell metabolism and survival. *J. Pathol.* doi:10.1002/path.4562.
- Becker, H.M., Klier, M., Deitmer, J.W., 2010. Nonenzymatic augmentation of lactate transport via monocarboxylate transporter isoform 4 by carbonic anhydrase II. *J. Membr. Biol.* 234, 125–135.
- Beltran, A.R., Ramirez, M.A., Carraro-Lacroix, L.R., Hiraki, Y., Reboucas, N.A., Malnic, G., 2008. NHE1, NHE2, and NHE4 contribute to regulation of cell pH in T84 colon cancer cells. *Pflugers Arch.* 455, 799–810.
- Betsunoh, H., Fukuda, T., Anzai, N., Nishihara, D., Mizuno, T., Yuki, H., et al., 2013. Increased expression of system large amino acid transporter (LAT)-1 mRNA is associated with invasive potential and unfavorable prognosis of human clear cell renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 13, 509.
- Bhutia, Y.D., Babu, E., Ramachandran, S., Ganapathy, V., 2015. Amino Acid transporters in cancer and their relevance to “glutamine addiction”: novel targets for the design of a new class of anticancer drugs. *Cancer Res.* 75, 1782–1788.
- Boedtkjer, E., Moreira, J.M., Mele, M., Vahl, P., Wielenga, V.T., Christiansen, P.M., et al., 2013. Contribution of Na⁺-HCO₃⁻-cotransport to cellular pH control in human breast cancer: a role for the breast cancer susceptibility locus NBCn1 (SLC4A7). *Int. J. Cancer* 132, 1288–1299.
- Bonfils, G., Jaquenoud, M., Bontron, S., Ostrowicz, C., Ungermann, C., De Virgilio, C., 2012. Leucyl-tRNA synthetase controls TORC1 via the EGO complex. *Mol. Cell* 46, 105–110.
- Bonuccelli, G., Tsirigos, A., Whitaker-Menezes, D., Pavlides, S., Pestell, R.G., Chiavarina, B., et al., 2010. Ketones and lactate “fuel” tumor growth and metastasis: evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism. *Cell Cycle* 9, 3506–3514.
- Broer, S., 2002. Adaptation of plasma membrane amino acid transport mechanisms to physiological demands. *Pflugers Arch.* 444, 457–466.
- Chafe, S.C., Lou, Y., Sceneay, J., Vallejo, M., Hamilton, M.J., McDonald, P.C., et al., 2015. Carbonic anhydrase IX promotes myeloid-derived suppressor cell mobilization and establishment of a metastatic niche by stimulating G-CSF production. *Cancer Res.* 75, 996–1008.
- Chiche, J., Ilc, K., Laferrriere, J., Trottier, E., Dayan, F., Mazure, N.M., et al., 2009. Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res.* 69, 358–368.
- Chiche, J., Ilc, K., Brahimi-Horn, M.C., Pouyssegur, J., 2010. Membrane-bound carbonic anhydrases are key pH regulators controlling tumor growth and cell migration. *Adv. Enzyme Regul.* 50, 20–33.
- Chiche, J., Le Fur, Y., Vilmen, C., Frassinetti, F., Daniel, L., Halestrap, A.P., et al., 2012. In vivo pH in metabolic-defective Ras-transformed fibroblast tumors: key role of the monocarboxylate transporter, MCT4, for inducing an alkaline intracellular pH. *Int. J. Cancer* 130, 1511–1520.
- Chien, M.H., Ying, T.H., Hsieh, Y.H., Lin, C.H., Shih, C.H., Wei, L.H., et al., 2012. Tumor-associated carbonic anhydrase XII is linked to the growth of primary oral squamous cell carcinoma and its poor prognosis. *Oral Oncol.* 48, 417–423.
- DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., et al., 2007. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 19345–19350.
- Dimmer, K.S., Friedrich, B., Lang, F., Deitmer, J.W., Broer, S., 2000. The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem. J.* 350 (Pt 1), 219–227.
- Doherty, J.R., Yang, C., Scott, K.E., Cameron, M.D., Fallahi, M., Li, W., et al., 2014. Blocking lactate export by inhibiting the Myc target MCT1 Disables glycolysis and glutathione synthesis. *Cancer Res.* 74, 908–920.
- Doyen, J., Parks, S.K., Marcie, S., Pouyssegur, J., Chiche, J., 2012. Knock-down of hypoxia-induced carbonic anhydrases IX and XII radiosensitizes tumor cells by increasing intracellular acidosis. *Front. Oncol.* 2, 199.
- Doyen, J., Trastour, C., Ettore, F., Peyrottes, I., Toussant, N., Gal, J., et al., 2014. Expression of the hypoxia-inducible monocarboxylate transporter MCT4 is increased in triple negative breast cancer and correlates independently with clinical outcome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 451, 54–61.
- Dubois, L., Peeters, S., Lieuwes, N.G., Geusens, N., Thiry, A., Wigfield, S., et al., 2011. Specific inhibition of carbonic anhydrase IX activity enhances the in vivo therapeutic effect of tumor irradiation. *Radiother. Oncol.* 99, 424–431.
- Duivenvoorden, W.C., Hopmans, S.N., Gallino, D., Farrell, T., Gerdes, C., Glennie, D., et al., 2015. Inhibition of carbonic anhydrase IX (CA9) sensitizes renal cell carcinoma to ionizing radiation. *Oncol. Rep.* 34, 1968–1976.
- Ebert, B.L., Firth, J.D., Ratcliffe, P.J., 1995. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *J. Biol. Chem.* 270, 29083–29089.
- Efeyan, A., Comb, W.C., Sabatini, D.M., 2015. Nutrient-sensing mechanisms and pathways. *Nature* 517, 302–310.
- Elorza, A., Soro-Arnaiz, I., Melendez-Rodriguez, F., Rodriguez-Vaello, V., Marsboom, G., de Carcer, G., et al., 2012. HIF2alpha acts as an mTORC1 activator through the amino acid carrier SLC7A5. *Mol. Cell* 48, 681–691.
- Estrella, V., Chen, T., Lloyd, M., Wojtkowiak, J., Cornnell, H.H., Ibrahim-Hashim, A., et al., 2013. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Res.* 73, 1524–1535.
- Fiaschi, T., Giannoni, E., Taddei, M.L., Cirri, P., Marini, A., Pintus, G., et al., 2013. Carbonic anhydrase IX from cancer-associated fibroblasts drives epithelial-mesenchymal transition in prostate carcinoma cells. *Cell Cycle* 12, 1791–1801.
- Fishbein, W.N., Merezhinskaya, N., Foellmer, J.W., 2002. Relative distribution of three major lactate transporters in frozen human tissues and their localization in unfixed skeletal muscle. *Muscle Nerve* 26, 101–112.
- Fotiadis, D., Kanai, Y., Palacin, M., 2013. The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol. Aspects Med.* 34, 139–158.
- Gallagher, F.A., Sladen, H., Kettunen, M.I., Serrao, E.M., Rodrigues, T.B., Wright, A., et al., 2015. Carbonic anhydrase activity monitored in vivo by hyperpolarized ¹³C-magnetic resonance spectroscopy demonstrate its importance for pH regulation in tumors. *Cancer Res.* 75 (19), 4109–4118.
- Gatenby, R.A., Gillies, R.J., 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* 4, 891–899.
- Gatenby, R.A., Gillies, R.J., 2008. A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 8, 56–61.
- Gatenby, R.A., Gawlinski, E.T., Gmitro, M.I., Saylor, B., Gillies, R.J., 2006. Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. *Cancer Res.* 66, 5216–5223.
- Gerlinger, M., Santos, C.R., Spencer-Dene, B., Martinez, P., Endesfelder, D., Burrell, R.A., et al., 2012. Genome-wide RNA interference analysis of renal carcinoma survival regulators identifies MCT4 as a Warburg effect metabolic target. *J. Pathol.* 227, 146–156.
- Gillies, R.J., Verduzco, D., Gatenby, R.A., 2012. Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work. *Nat. Rev. Cancer* 12, 487–493.
- Goetze, K., Walenta, S., Ksiazkiewicz, M., Kunz-Schughart, L.A., Mueller-Klieser, W., 2011. Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte migration and cytokine release. *Int. J. Oncol.* 39, 453–463.
- Gondi, G., Mysliwicz, J., Hulikova, A., Jen, J.P., Swietach, P., Kremmer, E., et al., 2013. Antitumor efficacy of a monoclonal antibody that inhibits the activity of cancer-associated carbonic anhydrase XII. *Cancer Res.* 73, 6494–6503.
- Gorbatenko, A., Olesen, C.W., Morup, N., Thiel, G., Kallunki, T., Valen, E., et al., 2014. ErbB2 upregulates the Na⁺-HCO₃⁻-cotransporter NBCn1/SLC4A7 in human breast cancer cells via Akt, ERK, Src, and Kruppel-like factor 4. *FASEB J.* 28, 350–363.
- Gottlieb, R.A., Nordberg, J., Skowronski, E., Babior, B.M., 1996. Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 654–658.
- Granja, S., Marchiq, I., Le Floch, R., Moura, C.S., Baltazar, F., Pouyssegur, J., 2015. Disruption of BASIGIN decreases lactic acid export and sensitizes non-small cell lung cancer to biguanides independently of the LKB1 status. *Oncotarget* 6, 6708–6721.
- Haapasalo, J., Hilvo, M., Nordfors, K., Haapasalo, H., Parkkila, S., Hyrskyluoto, A., et al., 2008. Identification of an alternatively spliced isoform of

- carbonic anhydrase XII in diffusely infiltrating astrocytic gliomas. *Neuro Oncol.* 10, 131–138.
- Haining, Z., Kawai, N., Miyake, K., Okada, M., Okubo, S., Zhang, X., et al., 2012. Relation of LAT1/4F2hc expression with pathological grade, proliferation and angiogenesis in human gliomas. *BMC Clin. Pathol.* 12, 4.
- Halestrap, A.P., 2012. The monocarboxylate transporter family—Structure and functional characterization. *IUBMB Life* 64, 1–9.
- Halestrap, A.P., 2013. Monocarboxylic acid transport. *Compr. Physiol.* 3, 1611–1643.
- Han, J.M., Jeong, S.J., Park, M.C., Kim, G., Kwon, N.H., Kim, H.K., et al., 2012. Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. *Cell* 149, 410–424.
- Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q.P., Kozłowski, M.T., Belham, C., Avruch, J., 1998. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J. Biol. Chem.* 273, 14484–14494.
- Harris, I.S., Treloar, A.E., Inoue, S., Sasaki, M., Gorrini, C., Lee, K.C., et al., 2015. Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression. *Cancer Cell* 27, 211–222.
- Hashimoto, T., Hussien, R., Oommen, S., Gohil, K., Brooks, G.A., 2007. Lactate sensitive transcription factor network in L6 cells: activation of MCT1 and mitochondrial biogenesis. *FASEB J.* 21, 2602–2612.
- Heidtmann, H., Ruminot, I., Becker, H.M., Deitmer, J.W., 2015. Inhibition of monocarboxylate transporter by N-cyanosulphonamide S0859. *Eur. J. Pharmacol.* 762, 344–349.
- Hirschhaeuser, F., Sattler, U.G., Mueller-Klieser, W., 2011. Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer Res.* 71, 6921–6925.
- Hulikova, A., Harris, A.L., Vaughan-Jones, R.D., Swietach, P., 2013. Regulation of intracellular pH in cancer cell lines under normoxia and hypoxia. *J. Cell. Physiol.* 228, 743–752.
- Hulikova, A., Aveyard, N., Harris, A.L., Vaughan-Jones, R.D., Swietach, P., 2014. Intracellular carbonic anhydrase activity sensitizes cancer cell pH signaling to dynamic changes in CO₂ partial pressure. *J. Biol. Chem.* 289, 25418–25430.
- Ilie, M.I., Hofman, V., Ortholan, C., Ammadi, R.E., Bonnetaud, C., Havet, K., et al., 2011. Overexpression of carbonic anhydrase XII in tissues from resectable non-small cell lung cancers is a biomarker of good prognosis. *Int. J. Cancer* 128, 1614–1623.
- Jamali, S., Klier, M., Ames, S., Felipe Barros, L., McKenna, R., Deitmer, J.W., et al., 2015. Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX facilitates lactate flux in human breast cancer cells by non-catalytic function. *Sci. Rep.* 5, 13605.
- Kaira, K., Oriuchi, N., Imai, H., Shimizu, K., Yanagitani, N., Sunaga, N., et al., 2008. Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 expression in resectable stage I-III nonsmall cell lung cancer. *Br. J. Cancer* 98, 742–748.
- Kanai, Y., Segawa, H., Miyamoto, K., Uchino, H., Takeda, E., Endou, H., 1998. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J. Biol. Chem.* 273, 23629–23632.
- Karantzi, E., Schulz, H., Hummel, O., Hubner, N., Hatzopoulos, A., Kretsovali, A., 2008. Histone deacetylase inhibition accelerates the early events of stem cell differentiation: transcriptomic and epigenetic analysis. *Genome Biol.* 9, R65.
- Koch, A., Lang, S.A., Wild, P.J., Gantner, S., Mahli, A., Spanier, G., et al., 2015. Glucose transporter isoform 1 expression enhances metastasis of malignant melanoma cells. *Oncotarget* 6 (32), 32748–32760.
- Kopecka, J., Campia, I., Jacobs, A., Frei, A.P., Ghigo, D., Wollscheid, B., et al., 2015. Carbonic anhydrase XII is a new therapeutic target to overcome chemoresistance in cancer cells. *Oncotarget* 6, 6776–6793.
- Kroemer, G., Pouyssegur, J., 2008. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 13, 472–482.
- Lagadic-Gossman, D., Huc, L., Lecureur, V., 2004. Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles. *Cell Death Differ.* 11, 953–961.
- Lagarde, A.E., Franchi, A.J., Paris, S., Pouyssegur, J.M., 1988. Effect of mutations affecting Na⁺/H⁺ antiport activity on tumorigenic potential of hamster lung fibroblasts. *J. Cell. Biochem.* 36, 249–260.
- Lauritzen, G., Jensen, M.B., Boedtkjer, E., Dybboe, R., Aalkjaer, C., Nylandsted, J., et al., 2010. NBCn1 and NHE1 expression and activity in DeltaNERB2 receptor-expressing MCF-7 breast cancer cells: contributions to pH regulation and chemotherapy resistance. *Exp. Cell Res.* 316, 2538–2553.
- Lauritzen, G., Stock, C.M., Lemaire, J., Lund, S.F., Jensen, M.F., Damsgaard, B., et al., 2012. The Na⁺/H⁺ exchanger NHE1, but not the Na⁺, HCO₃⁻ cotransporter NBCn1, regulates motility of MCF7 breast cancer cells expressing constitutively active ErbB2. *Cancer Lett.* 317, 172–183.
- Le Floch, R., Chiche, J., Marchiq, I., Naiken, T., Ilc, K., Murray, C.M., et al., 2011. CD147 subunit of lactate/H⁺ symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 16663–16668.
- Ledaki, I., McIntyre, A., Wigfield, S., Buffa, F., McGowan, S., Baban, D., et al., 2015. Carbonic anhydrase IX induction defines a heterogeneous cancer cell response to hypoxia and mediates stem cell-like properties and sensitivity to HDAC inhibition. *Oncotarget* 6, 19413–19427.
- Lee, S., Axelsen, T.V., Andersen, A.P., Vahl, P., Pedersen, S.F., Boedtkjer, E., 2015a. Disrupting Na,HCO₃-cotransporter NBCn1 (Slc4a7) delays murine breast cancer development. *Oncogene* doi:10.1038/onc.2015.273.
- Lee, S., Mele, M., Vahl, P., Christiansen, P.M., Jensen, V.E., Boedtkjer, E., 2015b. Na⁺,HCO₃⁻ cotransport is functionally upregulated during human breast carcinogenesis and required for the inverted pH gradient across the plasma membrane. *Pflugers Arch.* 467, 367–377.
- Lim, K.S., Lim, K.J., Price, A.C., Orr, B.A., Eberhart, C.G., Bar, E.E., 2014. Inhibition of monocarboxylate transporter-4 depletes stem-like glioblastoma cells and inhibits HIF transcriptional response in a lactate-independent manner. *Oncogene* 33, 4433–4441.
- Lock, F.E., McDonald, P.C., Lou, Y., Serrano, I., Chafe, S.C., Ostlund, C., et al., 2013. Targeting carbonic anhydrase IX depletes breast cancer stem cells within the hypoxic niche. *Oncogene* 32, 5210–5219.
- Lou, Y., McDonald, P.C., Oloumi, A., Chia, S., Ostlund, C., Ahmadi, A., et al., 2011. Targeting tumor hypoxia: suppression of breast tumor growth and metastasis by novel carbonic anhydrase IX inhibitors. *Cancer Res.* 71, 3364–3376.
- Lu, H., Samanta, D., Xiang, L., Zhang, H., Hu, H., Chen, I., et al., 2015. Chemotherapy triggers HIF-1-dependent glutathione synthesis and copper chelation that induces the breast cancer stem cell phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, E4600–E4609.
- Lunt, S.Y., Vander Heiden, M.G., 2011. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 441–464.
- Luo, J., Tannock, I.F., 1994. Inhibition of the regulation of intracellular pH: potential of 5-(N,N-hexamethylene) amiloride in tumour-selective therapy. *Br. J. Cancer* 70, 617–624.
- Macheda, M.L., Rogers, S., Best, J.D., 2005. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J. Cell. Physiol.* 202, 654–662.
- Makrides, V., Camargo, S.M., Verrey, F., 2014. Transport of amino acids in the kidney. *Compr. Physiol.* 4, 367–403.
- Manning Fox, J.E., Meredith, D., Halestrap, A.P., 2000. Characterisation of human monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle. *J. Physiol.* 529 (Pt 2), 285–293.
- Marchiq, I., Pouyssegur, J., 2015. Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H⁺ symporters. *J. Mol. Med.* 1–17. doi:10.1007/s00109-015-1307-x.
- Marchiq, I., Le Floch, R., Roux, D., Simon, M.P., Pouyssegur, J., 2015. Genetic disruption of lactate/H⁺ symporters (MCTs) and their subunit CD147/BASIGIN sensitizes glycolytic tumor cells to phenformin. *Cancer Res.* 75, 171–180.
- McCracken, A.N., Edinger, A.L., 2013. Nutrient transporters: the Achilles' heel of anabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 24, 200–208.
- McIntyre, A., Patiar, S., Wigfield, S., Li, J.L., Ledaki, I., Turley, H., et al., 2012. Carbonic anhydrase IX promotes tumor growth and necrosis in vivo and inhibition enhances anti-VEGF therapy. *Clin. Cancer Res.* 18, 3100–3111.
- Meijer, T.W., Schuurbiers, O.C., Kaanders, J.H., Looijen-Salamon, M.G., de Geus-Oei, L.F., Verhagen, A.F., et al., 2012. Differences in metabolism between adeno- and squamous cell non-small cell lung carcinomas: spatial distribution and prognostic value of GLUT1 and MCT4. *Lung Cancer* 76, 316–323.
- Milkereit, R., Persaud, A., Vanoaica, L., Guetg, A., Verrey, F., Rotin, D., 2015. LAPTM4b recruits the LAT1-4F2hc Leu transporter to lysosomes and promotes mTORC1 activation. *Nat. Commun.* 6, 7250.
- Musa-Aziz, R., Occhipinti, R., Boron, W.F., 2014a. Evidence from simultaneous intracellular- and surface-pH transients that carbonic anhydrase II enhances CO₂ fluxes across Xenopus oocyte plasma membranes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 307, C791–C813.
- Musa-Aziz, R., Occhipinti, R., Boron, W.F., 2014b. Evidence from simultaneous intracellular- and surface-pH transients that carbonic anhydrase IV enhances CO₂ fluxes across Xenopus oocyte plasma membranes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 307, C814–C840.
- Neri, D., Supuran, C.T., 2011. Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 767–777.
- Occhipinti, R., Musa-Aziz, R., Boron, W.F., 2014. Evidence from mathematical modeling that carbonic anhydrase II and IV enhance CO₂ fluxes across Xenopus oocyte plasma membranes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 307, C841–C858.

- Okuno, S., Sato, H., Kuriyama-Matsumura, K., Tamba, M., Wang, H., Sohma, S., et al., 2003. Role of cystine transport in intracellular glutathione level and cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines. *Br. J. Cancer* 88, 951–956.
- Osthus, R.C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., et al., 2000. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J. Biol. Chem.* 275, 21797–21800.
- Papi, A., Storci, G., Guarnieri, T., De Carolis, S., Bertoni, S., Avenia, N., et al., 2013. Peroxisome proliferator activated receptor- α /hypoxia inducible factor-1 α interplay sustains carbonic anhydrase IX and apolipoprotein E expression in breast cancer stem cells. *PLoS ONE* 8, e54968.
- Park, J.A., Kim, Y.E., Seok, H.J., Park, W.Y., Kwon, H.J., Lee, Y., 2011. Differentiation and upregulation of heat shock protein 70 induced by a subset of histone deacetylase inhibitors in mouse and human embryonic stem cells. *BMB Rep.* 44, 176–181.
- Parks, S.K., Pouyssegur, J., 2015. The Na⁺/HCO₃⁻ Co-transporter SLC4A4 plays a role in growth and migration of colon and breast cancer cells. *J. Cell. Physiol.* 230, 1954–1963.
- Parks, S.K., Chiche, J., Pouyssegur, J., 2011. pH control mechanisms of tumor survival and growth. *J. Cell. Physiol.* 226, 299–308.
- Parks, S.K., Chiche, J., Pouyssegur, J., 2013a. Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 13, 611–623.
- Parks, S.K., Mazure, N.M., Counillon, L., Pouyssegur, J., 2013b. Hypoxia promotes tumor cell survival in acidic conditions by preserving ATP levels. *J. Cell. Physiol.* 228, 1854–1862.
- Pavlidis, S., Whitaker-Menezes, D., Castello-Cros, R., Flomenberg, N., Witkiewicz, A.K., Frank, P.G., et al., 2009. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle* 8, 3984–4001.
- Pinheiro, C., Longatto-Filho, A., Azevedo-Silva, J., Casal, M., Schmitt, F.C., Baltazar, F., 2012. Role of monocarboxylate transporters in human cancers: state of the art. *J. Bioenerg. Biomembr.* 44, 127–139.
- Polanski, R., Hodgkinson, C.L., Fusi, A., Nonaka, D., Priest, L., Kelly, P., et al., 2014. Activity of the monocarboxylate transporter 1 inhibitor AZD3965 in small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 20, 926–937.
- Poole, R.C., Halestrap, A.P., 1993. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am. J. Physiol.* 264, C761–C782.
- Pore, N., Jalla, S., Liu, Z., Higgs, B., Sorio, C., Scarpa, A., et al., 2015. In Vivo loss of function screening reveals carbonic anhydrase IX as a key modulator of tumor initiating potential in primary pancreatic tumors. *Neoplasia* 17, 473–480.
- Pouyssegur, J., Dayan, F., Mazure, N.M., 2006. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441, 437–443.
- Rademakers, S.E., Lok, J., van der Kogel, A.J., Bussink, J., Kaanders, J.H., 2011. Metabolic markers in relation to hypoxia; staining patterns and colocalization of pimonidazole, HIF-1 α , CAIX, LDH-5, GLUT-1, MCT1 and MCT4. *BMC Cancer* 11, 167.
- Rastogi, S., Banerjee, S., Chellappan, S., Simon, G.R., 2007. Glut-1 antibodies induce growth arrest and apoptosis in human cancer cell lines. *Cancer Lett.* 257, 244–251.
- Rebsamen, M., Pochini, L., Stasyk, T., de Araujo, M.E., Galluccio, M., Kandasamy, R.K., et al., 2015. SLC38A9 is a component of the lysosomal amino acid sensing machinery that controls mTORC1. *Nature* 519, 477–481.
- Reshkin, S.J., Bellizzi, A., Caldeira, S., Albarani, V., Malanchi, I., Poignee, M., et al., 2000. Na⁺/H⁺ exchanger-dependent intracellular alkalization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *FASEB J.* 14, 2185–2197.
- Rios, E.J., Fallon, M., Wang, J., Shimoda, L.A., 2005. Chronic hypoxia elevates intracellular pH and activates Na⁺/H⁺ exchange in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 289, L867–L874.
- Robertson-Tessi, M., Gillies, R.J., Gatenby, R.A., Anderson, A.R., 2015. Impact of metabolic heterogeneity on tumor growth, invasion, and treatment outcomes. *Cancer Res.* 75, 1567–1579.
- Robey, I.F., Baggett, B.K., Kirkpatrick, N.D., Roe, D.J., Doseescu, J., Sloane, B.F., et al., 2009. Bicarbonate increases tumor pH and inhibits spontaneous metastases. *Cancer Res.* 69, 2260–2268.
- Rofstad, E.K., Mathiesen, B., Kindem, K., Galappathi, K., 2006. Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Res.* 66, 6699–6707.
- Romero, M.F., Chen, A.P., Parker, M.D., Boron, W.F., 2013. The SLC4 family of bicarbonate (HCO₃⁻) transporters. *Mol. Aspects Med.* 34, 159–182.
- Rosilio, C., Nebout, M., Imbert, V., Griessinger, E., Neffati, Z., Benadiba, J., et al., 2015. L-type amino-acid transporter 1 (LAT1): a therapeutic target supporting growth and survival of T-cell lymphoblastic lymphoma/T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 29, 1253–1266.
- Sakata, T., Ferdous, G., Tsuruta, T., Satoh, T., Baba, S., Muto, T., et al., 2009. L-type amino-acid transporter 1 as a novel biomarker for high-grade malignancy in prostate cancer. *Pathol. Int.* 59, 7–18.
- Sato, H., Tamba, M., Ishii, T., Bannai, S., 1999. Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J. Biol. Chem.* 274, 11455–11458.
- Schneiderhan, W., Scheler, M., Holzmann, K.H., Marx, M., Gschwend, J.E., Bucholz, M., et al., 2009. CD147 silencing inhibits lactate transport and reduces malignant potential of pancreatic cancer cells in vivo and in vitro models. *Gut* 58, 1391–1398.
- Schwab, A., Fabian, A., Hanley, P.J., Stock, C., 2012. Role of ion channels and transporters in cell migration. *Physiol. Rev.* 92, 1865–1913.
- Sedlakova, O., Svastova, E., Takacova, M., Kopacek, J., Pastorek, J., Pastorekova, S., 2014. Carbonic anhydrase IX, a hypoxia-induced catalytic component of the pH regulating machinery in tumors. *Front. Physiol.* 4, 400.
- Semenza, G.L., 2013. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J. Clin. Invest.* 123, 3664–3671.
- Shen, C., Beroukchim, R., Schumacher, S.E., Zhou, J., Chang, M., Signoretti, S., et al., 2011. Genetic and functional studies implicate HIF1 α as a 14q kidney cancer suppressor gene. *Cancer Discov.* 1, 222–235.
- Shibuya, K., Okada, M., Suzuki, S., Seino, M., Seino, S., Takeda, H., et al., 2015. Targeting the facilitative glucose transporter GLUT1 inhibits the self-renewal and tumor-initiating capacity of cancer stem cells. *Oncotarget* 6, 651–661.
- Shimoda, L.A., Fallon, M., Pisarcik, S., Wang, J., Semenza, G.L., 2006. HIF-1 regulates hypoxic induction of NHE1 expression and alkalization of intracellular pH in pulmonary arterial myocytes. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 291, L941–L949.
- Silva, A.S., Yunes, J.A., Gillies, R.J., Gatenby, R.A., 2009. The potential role of systemic buffers in reducing intratumoral extracellular pH and acid-mediated invasion. *Cancer Res.* 69, 2677–2684.
- Sonveaux, P., Copetti, T., De Saedeleer, C.J., Vegran, F., Verrax, J., Kennedy, K.M., et al., 2012. Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis. *PLoS ONE* 7, e33418.
- Stine, Z.E., Walton, Z.E., Altman, B.J., Hsieh, A.L., Dang, C.V., 2015. MYC, metabolism, and cancer. *Cancer Discov.* 5, 1024–1039.
- Svastova, E., Hulikova, A., Rafajova, M., Zat'ovicova, M., Gibadulinova, A., Casini, A., et al., 2004. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett.* 577, 439–445.
- Svastova, E., Witariski, W., Csaderova, L., Kosik, I., Skvarkova, L., Hulikova, A., et al., 2012. Carbonic anhydrase IX interacts with bicarbonate transporters in lamellipodia and increases cell migration via its catalytic domain. *J. Biol. Chem.* 287, 3392–3402.
- Swietach, P., Wigfield, S., Cobden, P., Supuran, C.T., Harris, A.L., Vaughan-Jones, R.D., 2008. Tumor-associated carbonic anhydrase 9 spatially coordinates intracellular pH in three-dimensional multicellular growths. *J. Biol. Chem.* 283, 20473–20483.
- Swietach, P., Patiar, S., Supuran, C.T., Harris, A.L., Vaughan-Jones, R.D., 2009. The role of carbonic anhydrase 9 in regulating extracellular and intracellular pH in three-dimensional tumor cell growths. *J. Biol. Chem.* 284, 20299–20310.
- Swietach, P., Vaughan-Jones, R.D., Harris, A.L., Hulikova, A., 2014. The chemistry, physiology and pathology of pH in cancer. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 369, 20130099.
- Szablewski, L., 2013. Expression of glucose transporters in cancers. *Biochim. Biophys. Acta* 1835, 164–169.
- Tafreshi, N.K., Bui, M.M., Bishop, K., Lloyd, M.C., Enkemann, S.A., Lopez, A.S., et al., 2012. Noninvasive detection of breast cancer lymph node metastasis using carbonic anhydrases IX and XII targeted imaging probes. *Clin. Cancer Res.* 18, 207–219.
- Timmerman, L.A., Holton, T., Yuneva, M., Louie, R.J., Padro, M., Daemen, A., et al., 2013. Glutamine sensitivity analysis identifies the xCT antiporter as a common triple-negative breast tumor therapeutic target. *Cancer Cell* 24, 450–465.
- Ullah, M.S., Davies, A.J., Halestrap, A.P., 2006. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 281, 9030–9037.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., Thompson, C.B., 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029–1033.
- Vegran, F., Boidot, R., Michiels, C., Sonveaux, P., Feron, O., 2011. Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1

- supports an NF-kappaB/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 71, 2550–2560.
- Waclaw, B., Bozic, I., Pittman, M.E., Hruban, R.H., Vogelstein, B., Nowak, M.A., 2015. A spatial model predicts that dispersal and cell turnover limit intratumour heterogeneity. *Nature* 525, 261–264.
- Wang, S., Tsun, Z.Y., Wolfson, R.L., Shen, K., Wyant, G.A., Plovanich, M.E., et al., 2015. Metabolism. Lysosomal amino acid transporter SLC38A9 signals arginine sufficiency to mTORC1. *Science* 347, 188–194.
- Warburg, O., 1956. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269–270.
- Ward, C., Meehan, J., Mullen, P., Supuran, C., Dixon, J.M., Thomas, J.S., et al., 2015. Evaluation of carbonic anhydrase IX as a therapeutic target for inhibition of breast cancer invasion and metastasis using a series of in vitro breast cancer models. *Oncotarget* 6 (28), 24856–24870.
- Watson, P.H., Chia, S.K., Wykoff, C.C., Han, C., Leek, R.D., Sly, W.S., et al., 2003. Carbonic anhydrase XII is a marker of good prognosis in invasive breast carcinoma. *Br. J. Cancer* 88, 1065–1070.
- Webb, B.A., Chimenti, M., Jacobson, M.P., Barber, D.L., 2011. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 11, 671–677.
- Whitaker-Menezes, D., Martinez-Outschoorn, U.E., Lin, Z., Ertel, A., Flomenberg, N., Witkiewicz, A.K., et al., 2011. Evidence for a stromal-epithelial “lactate shuttle” in human tumors: MCT4 is a marker of oxidative stress in cancer-associated fibroblasts. *Cell Cycle* 10, 1772–1783.
- Witkiewicz, A.K., Whitaker-Menezes, D., Dasgupta, A., Philp, N.J., Lin, Z., Gandara, R., et al., 2012. Using the “reverse Warburg effect” to identify high-risk breast cancer patients: stromal MCT4 predicts poor clinical outcome in triple-negative breast cancers. *Cell Cycle* 11, 1108–1117.
- Wykoff, C.C., Beasley, N.J., Watson, P.H., Turner, K.J., Pastorek, J., Sibtain, A., et al., 2000. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.* 60, 7075–7083.
- Yanagida, O., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Segawa, H., Nii, T., et al., 2001. Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim. Biophys. Acta* 1514, 291–302.
- Younes, M., Lechago, L.V., Lechago, J., 1996. Overexpression of the human erythrocyte glucose transporter occurs as a late event in human colorectal carcinogenesis and is associated with an increased incidence of lymph node metastases. *Clin. Cancer Res.* 2, 1151–1154.
- Younes, M., Brown, R.W., Stephenson, M., Gondo, M., Cagle, P.T., 1997. Overexpression of Glut1 and Glut3 in stage I nonsmall cell lung carcinoma is associated with poor survival. *Cancer* 80, 1046–1051.
- Yun, D.W., Lee, S.A., Park, M.G., Kim, J.S., Yu, S.K., Park, M.R., et al., 2014. JPH203, an L-type amino acid transporter 1-selective compound, induces apoptosis of YD-38 human oral cancer cells. *J. Pharmacol. Sci.* 124, 208–217.
- Zelzer, E., Levy, Y., Kahana, C., Shilo, B.Z., Rubinstein, M., Cohen, B., 1998. Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1 α /ARNT. *EMBO J.* 17, 5085–5094.
- Zheng, B., Liu, J., Gu, J., Lu, Y., Zhang, W., Li, M., et al., 2015. A three-gene panel that distinguishes benign from malignant thyroid nodules. *Int. J. Cancer* 136, 1646–1654.

An evolutionarily conserved role for the MAP Kinase JNK in the prevention of adverse ROS production in early response to UV and thermal stresses

Courtial Lucile, Picco Vincent, Grover Renaud, **Cormerais Yann**, Pagès Gilles and
Ferrier-Pagès Christine

(Soumis prochainement)

Abstract

Coral reefs are of major ecological and socio-economic interest. They are exposed to a variety of different anthropic stresses such as ocean acidification, global warming and touristic activity. In the context of climate changes, a great effort has been made to try predicting and preventing coral reefs degradation in response to stresses. Still, very little is known about the signaling pathways involved in stress response in these organisms. We have identified the Mitogen Activated Kinase pathways as being responsive to thermal and UV stresses. In particular, the JNK pathway is activated when corals are exposed to temperature increase and UVs in a way comparable to human cells. Using a specific inhibitor, we show that JNK activity is necessary for the corals to regulate temperature and UV-induced ROS production in both corals and isolated human cells. Taken together, our results show that the function of an ancestral stress response pathway involving JNK is conserved from corals to mammals.

Résumé

Les cancers à croissance rapide sont dépendant d'un apport accru en nutriments essentiels tels que glucose et acides aminés. Dans le but d'optimiser cet apport, les cellules cancéreuses surexpriment certains transporteurs membranaires clés. L'hétérodimère CD98 / LAT1, un complexe transmembranaire multifonctionnel fait partie de ces transporteurs surexprimés et il est associé à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers. La glycoprotéine CD98 (SLC3A2) agit comme co-récepteur des intégrines β et amplifie leur signalisation régulant ainsi des mécanismes tel que la migration et l'adhésion cellulaire. La protéine à douze domaines transmembranaires LAT1 (SLC7A5) est quant à elle responsable du transport des acides aminés (AA) essentiels de façon sodium indépendante. Des études du groupe de M. Ginsberg ont suggéré que la fonction CD98/intégrines du complexe est essentielle pour la prolifération des lymphocytes T et B ainsi que la croissance de teratocarcinomes, alors que le rôle de LAT1 aurait un rôle mineur dans ce contexte. Cependant, le fait que ce complexe soit fortement exprimé dans des cancers agressifs possédant des besoins nutritifs accrus nous a conduit à émettre l'hypothèse contraire. Ainsi notre postulat de départ a été que l'avantage prolifératif donné par ce complexe serait en réalité supporté par l'activité du transporteur LAT1 et non pas par l'interaction CD98/intégrine. Mon travail de thèse a eu pour but de valider cette hypothèse par une approche de dissection génétique et pharmacologique de la fonctionnalité des deux membres de ce complexe membranaire.

Dans ce contexte j'ai montré que l'inactivation génétique de *LAT1* dans des lignées d'adénocarcinomes colique et pulmonaire (LS174T et A549) entraîne une suppression totale du transport de la leucine, sodium-indépendant. Ceci entraînant une perte d'homéostasie des AA conduisant à l'activation de la voie de stress GCN2/eIF2 α /ATF4, l'inhibition drastique de mTORC1 et la suppression totale de la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo*. Aussi, j'ai pu confirmer et étendre ces résultats avec l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de LAT1 (JPH203) dans quatre autres lignées cellulaires issues de cancers du colon, poumon et rein, démontrant clairement le rôle fondamental de ce transporteur dans la croissance tumorale. De plus, bien qu'elle soit accompagnée d'une chute de 90% de l'activité de LAT1, l'inactivation génétique de *CD98* dans les lignées LS174T et A549 ne s'est traduit par aucun phénotype visible aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Par contre, la suppression des 10% d'activité résiduelle du transporteur LAT1 de ces cellules est suffisante pour abolir leur potentiel tumoral écartant ainsi tout mécanisme d'adaptation indépendant de LAT1.

Pour conclure, mes résultats suggèrent fortement que la 'sélection darwinienne' des tumeurs à croissance rapide se porte sur le rôle du transporteur LAT1 et non sur CD98/intégrines. Ces résultats renforcent la notion que LAT1 exerce une fonction limitante pour les besoins nutritionnels des cancers et l'activité mTORC1 faisant donc de LAT1 une cible de choix à ajouter à l'arsenal thérapeutique anti-cancer.