



HAL
open science

Identification des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance des cellules à une carence en acides aminés.

Florent Mesclon

► **To cite this version:**

Florent Mesclon. Identification des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance des cellules à une carence en acides aminés.. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2016. Français. NNT : 2016CLF1MM26 . tel-01661418

HAL Id: tel-01661418

<https://theses.hal.science/tel-01661418>

Submitted on 11 Dec 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.

Université Blaise Pascal

Université d'Auvergne

Année 2016

N° d'ordre :

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

Thèse

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

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

Soutenue le 18 novembre 2016

Florent MESCLON

**Identification des mécanismes moléculaires impliqués dans
la résistance des cellules à une carence en acides aminés.**

Présidente : Pr. Anne-Marie LEFRANCOIS-MARTINEZ

Rapporteurs : Dr. Sophie VASSEUR
Dr. Jacques POUYSSEGUR

Examineurs : Dr. Hang NGUYEN
Dr. Serge MANIÉ

Directeur de Thèse : Dr. Pierre FAFOURNOUX

Invité : Dr. Julien AVEROUS

UMR 1019 de Nutrition Humaine
INRA de Clermont-Ferrand/Theix

Remerciements

J'exprime de sincères remerciements :

Au professeur Anne-Marie LEFRANCOIS-MARTINEZ du laboratoire de *Génétique, reproduction et développement*, Université Blaise Pascal pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Au docteur Jacques Pouysségur du laboratoire Hypoxie tumorale et métabolisme de l'Institute for Research on Cancer & Aging, Nice (IRCAN), University of Nice Centre A. Lacassagne, pour avoir accepté d'être l'un des rapporteurs de cette thèse. Je le remercie également d'avoir fait partie du jury de mes comités de thèse et des conseils qu'il a pu me fournir lors de ces discussions qui m'ont été utiles tout au long de ma thèse.

Au docteur Sophie Vasseur du laboratoire *Métabolisme du cancer du pancréas*, Inserm - U1068 - Cellular Stress, pour avoir accepté d'être l'un des rapporteurs de cette thèse.

Au docteur Hang Nguyen du laboratoire *Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte*, UMR 1071 Inserm/Université d'Auvergne pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

Au docteur Serge Manié du laboratoire *ER stress and tumorigenesis* du centre de recherche en cancérologie de Lyon, pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

Je remercie également :

Le Professeur Jean-Marc Lobaccaro, le directeur de l'école doctorale Sciences, Vie Santé Agronomie et Environnement pour son aide et son soutien.

Les Docteurs Jean-Michel Chardigny, Marc Ferrara et André Mazur, directeurs successifs de l'Unité de Nutrition Humaine de l'INRA de Theix pour m'avoir accueilli dès mon stage de M2 et en thèse dans l'unité.

Les docteurs Pierre Verrelle et Silvère Baron pour avoir accepté de faire partie du jury de mes comités de thèse et pour tous les conseils utiles qu'ils ont pu me fournir.

La région Auvergne et l'INRA pour avoir financé cette thèse.

Le Docteur Pierre Fafournoux, pour m'avoir accepté au sein de son équipe Gènes/Nutriments (nouvellement nommé iMPROVINg) dès mon stage de M2 puis d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse. Je le remercie également pour tous les conseils qu'il a pu me donner au cours de ma thèse.

Je remercie toutes les personnes de l'unité de nutrition humaine avec lesquelles j'ai pu interagir au cours de mes années à l'INRA : Daniel T., Cécile P, Marianne, Yohan W., Laurent L., Cédric, Hervé j'en oublie sûrement beaucoup d'autres. Merci également à Sarah Lambert-Langlais qui était sur ce projet avant mon arrivée et qui a notamment développé les clones et effectué les premières caractérisations.

Merci à ma famille « adoptive » du "4^{ième} étage", Valérie, Cécile, Céline, Cathy, Julien, Pierre, Lolo, Alain et Daniel. Si les 3 ans et demi que j'ai passé à cet étage se sont aussi bien passés, c'est grâce à vous tous. Pour m'avoir bien conseillé et formé au niveau scientifique, pour la bonne humeur que vous apportiez tous les jours au labo et pour tout le reste, mes années ici n'auraient pas pu se passer mieux. Avec la variété de discussion que j'ai pu avoir avec vous tous, je sais à peu près tout ce qu'il faut savoir que ce soit des problèmes de gosse ou des techniques pour faire sécher le saucisson. Les seules choses que je n'ai pas retenues sont tous les noms de code de vos différents parcours de footing.

Parmi cette grande famille, je tiens à remercier particulièrement Julien qui a été mon maître de stage de M2 puis mon directeur de thèse non officiel. Merci d'avoir partagé avec moi toutes ces connaissances scientifiques que j'ai utilisées pendant ma thèse, pour m'avoir appris la rigueur scientifique et à en faire toujours plus. Merci de tout le temps que tu as consacré à m'encadrer/supporter, de m'avoir toujours soutenu. C'est grâce à toi que je suis arrivé à bout de cette thèse et que j'ai pu obtenir tous ces résultats. J'oublie sûrement de te remercier pour d'autres choses car la liste de remerciements nécessiterait plus que ces quelques lignes. **MERCI !!**

Merci à tous mes amis : les potes de mes années de médecine Alexandre, Denis, Julien et Vincent ; mes potes de licence Nico, Momo, Lise et Clément : merci pour toutes les soirées, les vacances et toutes les autres activités. Merci de m'avoir supporté pendant toutes ces années malgré le niveau de mes blagues (si on peut les appeler ainsi ☺), d'avoir été là pour moi quand j'en avais besoin. Mes années clermontoises ont été une réussite grâce à vous tous. Si on continue à se voir, les années futures ne peuvent qu'être une réussite également.

Merci aux autres amis clermontois Benoît, Gautier, Raphaël, Aurélie, Marie V., Anne-Sophie P, Marine D., Jeanne R., Christophe, Thomas et j'en passe qui ont également participé à la réussite de mes années clermontoises.

Merci aux anciennes thésardes du labo, Wafa et Marine, qui étaient là pendant mon stage de M2 puis au début de ma thèse, aux anciens post-docs Cedric et Yuki ; à tous les stagiaires qui sont passés par le labo pendant toutes ces années. Merci à Alice et à Angèle, les thésardes présentes dans le bureau lors des derniers mois de ma thèse. Même si parfois, vous faisiez un « petit peu trop de bruit » alors que j'essayais d'écrire, on a bien rigolé dans le bureau ce qui m'a permis de décompresser lors de cette dernière étape de ma thèse (petite dédicace au petit bonhomme bleu ;-)

Merci aux autres doctorants que j'ai pu rencontrer que ce soit dans le groupe d'organisation des JED, lors des modules OSP et ailleurs.

Merci également au Dr. Michel Pucéat qui m'a accueilli dans son laboratoire de Marseille pour que je puisse me former à la technique de microinjection.

Merci à l'Equipe de m'avoir tenu informé de toute l'actualité sportive, à Deezer de m'avoir permis d'écouter la musique que je voulais quand je ne supportais plus la radio. À l'association Doct'Auvergne pour tout le boulot et les soirées qu'ils ont organisés.

Cette thèse n'aurait rien été sans « mes » clones. Ils m'en ont fait voir de toutes les couleurs mais comme j'ai réussi à les dompter au final, je ne leur en veux pas. Ils vont presque me manquer. Merci au Macdo de Beaumont d'avoir toujours été là quand la faim se faisait sentir à la sortie du boulot. Merci à l'ASM d'avoir gagné le TOP14 quand j'étais sur Clermont, les chances que ça arrive étaient très faibles.

Pour finir, un grand merci à tous les membres de ma famille, frère, sœurs, parents, cousins, cousines, oncles, tantes, grands-parents, même si je n'ai pas pu vous voir autant que je le voudrais, vous avez toujours été là pour moi.

Cette thèse est l'aboutissement de 9 années passées à Clermont. Résumer ces années serait trop difficile vu le nombre de choses que j'ai vécu ici, les amis que je me suis fait, etc. C'est pourquoi je dédie cette thèse à toutes les personnes que j'aime, à toutes les personnes qui ont participé à ma vie clermontoise et à tous les autres. Je ne sais pas encore ce que me réserve l'avenir mais dans tous les cas, mes années clermontoises resteront toujours ancrées en moi.

Liste des publications

Publication présentée :

Florent Mesclon, Sarah Lambert-Langlais, Valérie Carraro, Laurent Parry, Isabelle Hainault, Céline Jousse, Anne-Catherine Maurin, Alain Bruhat, Pierre Fafournoux, and Julien Averous

"Decreased ATF4 expression as a mechanism of acquired resistance to long term amino acid limitation in cancer cells" *Oncotarget*, en cours de soumission

Publications non présentées :

Cédric Chaveroux, Valérie Carraro, Laurence Canaple, Julien Averous, Anne-Catherine Maurin, Céline Jousse, Yuki Muranishi, Laurent Parry, **Florent Mesclon**, Evelina Gatti, Jacques Mallet, Philippe Ravassard, Philippe Pierre, Pierre Fafournoux, Alain Bruhat

In vivo imaging of the spatiotemporal activity of the eIF2a-ATF4 signaling pathway: Insights into stress and related disorders.

Science Signaling 2015 April

Averous J, Lambert-Langlais S, **Mesclon F**, Carraro V, Parry L, Jousse C, Bruhat A, Maurin AC, Pierre P, Proud CG, Fafournoux P.

GCN2 contributes to mTORC1 inhibition by leucine deprivation through an ATF4 independent mechanism

Science Report. 2016 Jun 14;6:27698. doi: 10.1038/srep27698

Chaveroux C, Bruhat A, Carraro V, Jousse C, Averous J, Maurin AC, Parry L, **Mesclon F**, Muranishi Y, Cordelier P, Meulle A, Baril P, Do Thi A, Ravassard P, Mallet J, Fafournoux P.

Regulating the expression of therapeutic transgenes by controlled intake of dietary essential amino acids.

Nat Biotechnol. 2016 Jul;34(7):746-51. doi: 10.1038/nbt.3582.

Liste des illustrations

Introduction bibliographique

Figures :

Figure 1 : Représentation schématique d'un acide α -aminé.

Figure 2 : Classification des acides aminés chez l'homme.

Figure 3 : Schéma simplifié du cycle de Krebs et du devenir de certains de ces intermédiaires.

Figure 4 : Principaux systèmes responsables du maintien de l'homéostasie des acides aminés et des protéines chez l'homme.

Figure 5 : Représentation des différents types de transports.

Figure 6 : Élimination de l'ammonium par le foie.

Figure 7 : Schéma d'entrée des acides aminés dans le cycle de Krebs.

Figure 8 : Structure schématique des complexes mTORC1 et mTORC2.

Figure 9 : Schéma simplifié de la régulation de mTORC1 par le statut énergétique de la cellule et les facteurs de croissance.

Figure 10 : Représentation schématique de la régulation de mTORC1 par les acides aminés.

Figure 11 : Schéma simplifié des cibles de mTORC1 et des mécanismes régulés.

Figure 12 : Structure de GCN2.

Figure 13 : Modèle d'activation de la kinase GCN2 par modifications allostériques suite à la liaison d'ARNt non chargés.

Figure 14 : Régulation d'eIF2 par eIF2B.

Figure 15 : La voie de réponse intégrée au stress.

Figure 16 : Schéma représentant le contrôle de la traduction d'ATF4 par le facteur eIF2.

Figure 17 : Séquences CARE de différents gènes cibles de la voie eIF2 α /ATF4.

Figure 18 : Cinétique d'événements de fixation des protéines régulatrices sur l'AARE de CHOP au cours d'une carence en acides aminés (AA).

Figure 19 : Représentation schématique du rétrocontrôle de la voie ISR.

Figure 20 : Les principales étapes et principaux acteurs de l'autophagie.

Figure 21 : Régulation de l'autophagie par mTORC1.

Figure 22 : Modèle de Régulation des gènes de l'autophagie par les facteurs ATF4 et CHOP.

Figure 23 : Les principales caspases impliquées dans l'apoptose chez les mammifères.

Figure 24 : Les voies d'apoptose intrinsèque et extrinsèque.

Figure 25 : Régulation d'HIF-1 α en situation hypoxique ou normoxique.

Figure 26 : Schéma simplifié de la régulation du métabolisme du glucose dans les cellules cancéreuses.

Figure 27 : La synthèse de la sérine et de la glycine.

Figure 28 : Les différents types d'endocytose.

Figure 29 : Schéma de la régulation de la macropinocytose par Ras.

Tableaux :

Tableau 1 : Classification des acides aminés par famille.

Tableau 2 : Liste non exhaustive de fonctions des acides aminés (adapté de Young et al., 1994).

Tableau 3 : Synthèse des acides aminés non indispensables par transamination ou conversion.

Tableau 4 : Liste non exhaustive des gènes possédant un AARE permettant une régulation par ATF4 et des fonctions métaboliques qui leurs sont associés.

Schéma expérimental

Figure 30 : Schéma du protocole d'obtention des clones.

Résultats

Figure 31 : Effets de l'absence d'un acide aminés dans le milieu 2%AA sur la survie des cellules.

Figure 32 : Les clones sont capables d'utiliser l'albumine pour proliférer en milieu 2%AA.

Figure 33 : L'albumine ne serait pas la principale source de leucine.

Figure 34 : Entrée de l'albumine par macropinocytose.

Figure 35 : Le clone 1 est le seul clone faisant entrer l'albumine par macropinocytose en milieu 2%AA.

Figure 36 : Effet de l'EIPA sur la prolifération des clones AADR en milieu 2%AA.

Figure 37 : Effet de l'EIPA sur le clivage de la caspase 3.

Discussions/Perspectives

Figure 38 : Régulation des acteurs de la voie GCN2 dans les clones.

Figure 39 : L'expression de CHOP dans les clones AADR serait importante pour leur survie en milieu 2%AA.

Figure 40 : L'expression de Vegfa n'est pas significativement diminuée dans les clones.

Figure 41 : Expression de β -TRCP dans les clones en milieu 2%AA.

Figure 42 : Prolifération et niveau d'expression d'ATF4 dans plusieurs lignées cancéreuses.

Figure 43 : Niveau d'expression de l'ARNm codant pour PDGFB.

Figure 44 : Effets de l'absence d'un acide aminé dans le milieu 2%AA sur la survie des cellules.

Liste des abréviations

μ M: micro Molaire
4E-BP1: eIF4E-Binding Protein 1
AA: acide aminé
AADR : Amino acid deprivation resistance
AARE: Amino Acid Response Element
ADN: Acide DésoxyriboNucléique
ADP : Adénosine DiPhosphate
ALAT : alanine aminotransférase
AMP: Adénosine Mono Phosphate
AMPK: AMP-activated protein kinase
ARN: Acide ribonucléique
ARNm: ARN messenger
ARNt: ARN de transfert
ARNti : ARN de transfert initiateur
ASAT : aspartate aminotransférase
ASCT2: ASC amino-acid transporter 2
ASNS: Asparagine Synthase
ATF: Activating Transcription Factor
ATG: autophagy related gene
ATP: Adénosine TriPhosphate
 β -TRCP: beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase
Bax: Bcl-2-associated X protein
BCL2: B-Cell lymphoma 2
Bcl-XL: B-Cell Lymphoma-extra large
Beclin-1: Bcl-2-homology (BH)-3 domain only
BiP: Immunoglobulin-Binding Protein
BSA: bovine serum albumin
b-zip: basic leucine-zipper
C/EBP β : CCAAT/Enhancer Binding Protein β
CAIX: carbonic anhydrase IX
CARD: caspase recruitment domain
CARE: C/EBP-ATF Response Element
CASTOR: Cellular Arginine Sensor for mTORC1
CAT-1: Cationic Amino acids Transporter 1
CoA : coenzyme A
CHOP: C/EBP Homologues Protein
CREB: cAMP Responsive Element Binding protein
CREP: Constitutive repressor of eIF2 α phosphorylation
DED: Death effector domain
DEPTOR: DEP domain-containing mTOR-interacting protein
DBD: DNA-Binding Domain
DD: death domain
DDIT3: DNA damage-inducible transcript 3
eEF : eukaryotic elongation factor
eEF2K: eukaryotic Elongation Factor-2 Kinase
EGF :Epidermal Growth Factor Epidermal Growth Factor
eIF: eukaryotic Initiation Factor

eIF2 α : eukaryotic Initiation Factor α
EIPA: 5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amyloride
FADD: Fas associated death domain
FITC: fluorescein isothiocyanate
FLCN: Folliculin
FNIP2: Folliculin Interacting Protein 2
FoxO3: Forkhead box O3
GABARAP: Gamma-AminoButyric acid type A Receptor Associated-Protein
GADD34: Growth Arrest and DNA Damage inducible protein 34
GABA : gamma-Aminobutyric acid
GATOR: GAP Activity Towards Rags
GCN2: General Control Nonrepressed 2
GEF: Guanine-nucleotide Exchange Factor
GFP: Green Fluorescent Protein
GLC: Glutaminase
GLYT1: Glycine transporter 1
GLUD1: Glutamate Dehydrogenase 1
GLUT: glucose transporter
GTP: Guanidine TriPhosphate
HIF-1: Hypoxia-Inducible Factor-1
HisRD: Histidyl tRNA synthétase like domain
HRI: Heme-Regulated eIF2 α kinase
HRE: Hypoxia response element
IGF: insulin-like growth factor
IP3: 1, 4, 5-triPhosphate d'Inositol
ISR : integrated stress response
KDM4C: Lysine Demethylase 4C
LAT1: L-type amino acid transporter 1
LCN2: Lipocalin2
LDH : Lactate déshydrogénase
Leu: Leucine
LRS : leucine tRNA-synthetase
MAP1-LC3: Microtubule Associated Light Chain 3
MCL-1: myeloid leukemia cell 1
MEF: Mouse Embryonic Fibroblast
Met: Méthionine
miRNA: miRNA: microRNA
mLST8: mammalian lethal with SEC13 protein 8
MMP: Matrix metallopeptidase
mTOR: mammalian Target Of Rapamycin
mTORC1: mTOR Complex 1
mTORC2: mTOR Complex 2
Na: sodium
NBR1: Neighbour of BRCA1 gene 1
NO $^{\circ}$: monoxyde d'azote radicalaire
NRF2: Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2
p27kip1: cyclin-dependent kinase inhibitor 1B, cyclin-dependent kinase inhibitor p27
PARP: Poly-ADP-Ribose Polymerase
PBS: Phosphate buffer saline
PCAF: P300/CBP Associated Factor

PRAS40: proline-rich Akt substrate of 40 kDa
PEPCK: PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase
PEPT1: Peptide transporter 1
PERK: Pancreatic Endoplasmic Reticulum eIF2 Kinase
pH: potentiel Hydrogène
PHGDH : phosphoglycérate déshydrogénase
PDH2 : prolyl hydroxylase domain-containing protein 2
PDTC: Pyrrolidine dithiocarbamate
PI3K: Phosphatidyl-Inositol 3'-Kinase
PIP3: Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PKM2: Pyruvate kinase isozyme M2
PKR : Protein kinase RNA-activated
PP1c : Protein phosphatase-1 catalytic subunit
PP2A: Protein Phosphatase 2A
PPAR: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
qPCR: quantitative polymerase chain reaction
Rac1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAG: Ras-related small GTP-binding protein
RAPTOR: Regulatory-associated protein of mTORC1
REDD1: Regulated in development and DNA damage response 1
Rheb: Ras homolog enriched in brain
Rictor: Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RWD RING finger proteins, WD-repeat-containing proteins, and yeast DEAD-like helicases
S6K1: ribosomal s6 kinase 1
SCF: Skp, Cullin, F-box containing complex
Ser: Serine
SCF: Skp, Cullin, F-box containing complex
SHMT: serine-hydroxyméthyltransférase
SLC2: solute carrier family 2
SNAT: Sodium-coupled Neutral Tmino acid Transporter
SUnSET: surface sensing of translation
Sqstm1 : Sequestome1
SV40: Simian Virus 40
SVF ou FBS: sérum de veau foetal (Fr) ou Foetal bovine serum (Ang)
TAR: Trans-Activation Response element
TSC: tuberous sclerosis complex
TFEB: Transcription Factor EB
TFE3: Transcription Factor Binding To IGHM Enhancer 3
TMR: tétraméthylrhodamien
TOP: Tract Of Pyrimidine
TRB3: Tribble 3
TSC2: Tuberous Sclerosis 2
ULK: Unc-51-Like Kinase
UORF: upstream Open Reading Frame
UPR: Unfolded Protein Response
UPS: Ubiquitin-Proteasome System
UTR: Untranslated Region
UV: Ultra Violet
V-ATPases: Ragulator and vacuolar H (+)-ATPases

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VHL: Von Hippel-Lindau

xCT: sodium-independent aspartate/glutamate/cystine transporter

Sommaire

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
1. Objectif du travail de thèse	2
2. Présentation du manuscrit	3
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	4
CHAPITRE I : Généralités sur les acides aminés	5
I. Propriétés des acides aminés	5
II. Fonctions des acides aminés	5
III. Métabolisme des acides aminés	6
A. Absorption	6
B. Transport des acides aminés	7
C. Catabolisme oxydatif des acides aminés	7
D. Synthèse <i>de novo</i> des acides aminés	8
CHAPITRE II : Voies GCN2 et mTORC1 : deux voies de signalisation régulant le métabolisme cellulaire en fonction de la disponibilité en acides aminés	9
I. La voie mTORC1	9
A. La kinase mTOR et le complexe mTORC1	9
B. Régulation de mTORC1 par les acides aminés	10
1. Acides aminés et lysosomes	10
2. Régulation de mTORC1 en fonction de la concentration cytoplasmique en acides aminés	11
C. Protéines et mécanismes cibles de mTORC1	12

II. La voie GCN2/eIF2α/ATF4	13
A. La kinase GCN2.....	13
B. Synthèse protéique et phosphorylation d'eIF2α	14
C. Expression d'ATF4 en condition d'inhibition de la synthèse protéique ..	16
D. Le facteur de transcription ATF4	17
E. Rétrocontrôle de la voie.....	18
III.Mécanismes cellulaires régulés par les voies mTORC1 et GCN2 lors de carence en acides aminés.....	19
A. Autophagie	20
1. Mécanismes moléculaires et gènes de l'autophagie	21
2. Régulation du processus autophagique lors de carence en acides aminés ..	22
B. Apoptose	23
1. Les différentes voies d'induction de l'apoptose	24
2. Mécanismes de l'apoptose	26
3. Apoptose et carence en acides aminés	27
CHAPITRE III : Variation des apports en nutriments et en oxygène au niveau des tumeurs : Contexte favorable à l'émergence de cellules résistantes	

29

I. Développement de carence au niveau tumoral.....	29
II. HIF-1 et résistance à l'hypoxie	30
A. Régulation d'HIF-1.....	30
B. Mécanismes régulés par HIF-1 participant à la résistance à l'hypoxie...	31
C. Autres mécanismes régulés lors d'hypoxie	31

III. Adaptation des cellules cancéreuses à la carence en glucose	32
A. Régulation de l'entrée du glucose dans la cellule.....	32
B. Carence en glucose et stress du réticulum endoplasmique	33
C. Utilisation du lactate comme molécule glucoformatrice	33
IV. Métabolisme lipidique.....	33
V. Importance du métabolisme des acides aminés dans le contexte tumoral	34
A. Utilisation spécifique de certains acides aminés par la tumeur.....	35
1. Utilisation de l'asparagine	35
2. Utilisation de la glutamine	35
3. Utilisation de la sérine et de la glycine	36
B. Utilisation des autres sources d'acides aminés.....	38
1. Angiogenèse.....	38
2. Transport des acides aminés	39
3. Mécanismes de transport des peptides	41
4. La macropinocytose	42
CHAPITRE IV : Conclusion : Paradoxe du rôle de la voie GCN2-eIF2α-ATF4 dans la survie des tumeurs	45
STRATEGIE EXPERIMENTALE	47
RESULTATS EXPERIMENTAUX	49
PUBLICATION 1	50
I. Introduction	51
II. Résultats et conclusions	51
III. Publication	

PROJET 2

I. Introduction	53
II. Matériels et Méthodes.....	54
A. Culture cellulaire et conditions expérimentales.....	54
B. Expériences de prolifération cellulaire	54
C. Évaluation de la macropinocytose par l'utilisation de sondes fluorescentes	55
III.Résultats et Discussion.....	56
A. Les clones ont la capacité de proliférer en absence de méthionine ou de leucine.	56
B. Les clones AADR sont capables d'utiliser l'albumine du milieu pour soutenir leur niveau de prolifération.	56
C. L'albumine ne serait pas la principale source de leucine pour les cellules en milieu 2%AA.	57
D. La macropinocytose serait un des mécanismes utilisés par les clones pour permettre l'entrée des protéines dans la cellule.....	58
E. L'inhibition de la macropinocytose par l'EIPA réduit la prolifération du clone 1.	59
F. Le traitement à l'EIPA sensibilise le clone 1 aux effets apoptotiques de la carence en sérum.	60
IV.Conclusions, perspectives	60

DISCUSSION/PERSPECTIVES	61
I. Rôle des voies de signalisation sensibles à la disponibilité en acides aminés dans la survie des clones AADR.....	63
A. La voie mTORC1.....	63
B. La voie GCN2.....	64
II. Quels mécanismes régulés par ATF4 favorisent la survie des clones AADR ?	65
❖ Quel(s) gène(s) cible(s) d'ATF4 est(sont) responsable(s) de la survie des clones AADR ?.....	65
❖ Régulation de l'autophagie.....	66
❖ Régulation de l'apoptose.....	67
❖ Certains gènes dépendants d'ATF4 sont toujours exprimés dans les clones AADR.....	67
III. Les mécanismes impliqués dans la sous-expression d'ATF4 ?	69
❖ Régulation transcriptionnelle d'ATF4.....	69
❖ Régulation traductionnelle d'ATF4.....	70
❖ Stabilité protéique d'ATF4.....	71
IV. ATF4 : Un acteur majeur de la résistance des tumeurs à la carence en acides aminés ?	71
❖ Etude <i>in vitro</i>	71
❖ Étude <i>in vivo</i>	72
❖ Surexprimer ATF4 ? Si oui dans quel contexte ?.....	72
V. Macropinocytose et survie lors de carences en acides aminés ? ...	73
VI. Le modèle des clones AADR : quelles perspectives ?	74
❖ Cycle cellulaire.....	74
❖ Métabolisme des clones AADR.....	74
❖ Les clones AADR sont-ils résistants à d'autres stress ?.....	75
CONCLUSION GENERALE	76
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	78

ANNEXES

Introduction

Générale

Introduction Générale

1. Objectif du travail de thèse

Les cancers sont un ensemble de maladies pouvant toucher différents organes. La caractéristique commune à chacun est la perte au niveau d'une cellule des systèmes de contrôle de la prolifération cellulaire. Afin de les traiter, différentes thérapies ont été développées combinant chimiothérapie, radiothérapie ou encore acte chirurgical. Cependant, pour un même organe, il existe une hétérogénéité de type de cancers qui ne répondent pas ou ne peuvent pas être pris en charge par certaines thérapies. Dès lors, chaque cancer doit se voir affecter le meilleur protocole de traitement afin d'augmenter les chances de rémission.

Les cellules cancéreuses présentent également une forte prolifération cellulaire qui requiert un apport important en nutriments et en oxygènes. De nombreuses stratégies anticancéreuses tentent alors de cibler les mécanismes d'apport en nutriments afin de générer des carences pour induire la mort des cellules cancéreuses. Parmi ces privations, la carence en acides aminés est particulièrement délétère pour la cellule. Les acides aminés sont les substrats de base de la synthèse protéique mais ils sont également impliqués dans de nombreuses autres voies métaboliques (cycle de Krebs, synthèse nucléotidique...). Ils sont apportés par l'alimentation, la protéolyse et par la synthèse *de novo*. Cependant chez les eucaryotes, neuf acides aminés dits indispensables ne peuvent être synthétisés et doivent être apportés par l'alimentation. Dès lors, si la carence en acides aminés se prolonge, les apports en acides aminés indispensables ne seront pas suffisants et les systèmes de mort cellulaire pourront également être induits.

Toutefois, des tumeurs comme celles du pancréas sont décrites pour être capables de se développer malgré un environnement fortement carencé dû à une faible vascularisation. Il apparaît dès lors que des mécanismes cellulaires aient été adaptés afin de permettre la survie des cellules à ces conditions délétères. Des mécanismes ont été identifiés pour permettre l'adaptation à court terme des cellules à la carence en acides aminés. Toutefois, il n'existe que peu de connaissances pour l'adaptation des cellules cancéreuses à une carence prolongée en acides aminés.

Au niveau cellulaire, il existe des voies de signalisations capables de détecter la concentration en acides aminés et de permettre aux cellules de s'adapter à ces conditions. Les voies mTORC1 et GCN2/eIF2 α /ATF4 sont celles qui ont été les plus décrites dans la littérature pour permettre une adaptation des cellules à des carences en un ou plusieurs acides

indispensables. Cette adaptation peut également conduire à l'induction des mécanismes de mort cellulaire en fonction de la durée de la carence en acides aminés indispensables. Toutefois, peu de données sont disponibles quant au rôle de ces voies dans l'adaptation des cellules face à la diminution de l'ensemble des acides aminés et pas seulement des acides aminés indispensables de l'environnement cellulaire. Des modifications de ces voies mais également des altérations touchant d'autres mécanismes pourraient alors participer à la résistance des cellules cancéreuses à la carence en acides aminés. Dès lors, il paraît pertinent d'identifier ces mécanismes de résistance afin de faciliter le traitement de ces cancers.

L'objectif de la thèse a été de caractériser les mécanismes qui permettraient à ces cellules cancéreuses de survivre lors de carences prolongées en acides aminés. Pour cela, nous avons utilisé une approche originale en développant un modèle de cellules résistantes à la carence en acides aminés. Ces lignées résistantes de clones ont été obtenues en appliquant de fortes carences en acides aminés sur des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs). Cette forte pression de sélection causant la mort de la majorité des cellules a permis l'émergence de cellules résistantes que l'on a par la suite nommées clones AADR (amino acid deprivation resistant). Grâce à cette approche, on a pu disposer à la fois des cellules résistantes à la carence et de leurs cellules d'origines sensibles à la carence en acides aminés. Dès lors, nous pouvions effectuer des comparaisons entre ces lignées afin d'identifier les mécanismes qui permettent aux clones AADR de survivre en milieu carencé en acides aminés.

2. Présentation du manuscrit

Le manuscrit est divisé en six grandes sections : 1) l'introduction bibliographique, 2) la stratégie expérimentale, 3) les résultats, 4) la discussion et les perspectives, 5) la conclusion générale de ce travail, 6) les annexes et enfin 7) les références bibliographiques. La première section qui traite de l'étude bibliographique est divisée en trois chapitres. Le premier chapitre traite des acides aminés et de leurs rôles physiologiques, le second de la régulation des voies GCN2 et mTORC1 en fonction de la disponibilité en acides aminés et notamment de la régulation de l'autophagie et de l'apoptose. Enfin le dernier chapitre traite du développement de mécanismes de résistance des cellules cancéreuses vis-à-vis de la carence en glucose ou l'hypoxie et de l'utilisation des acides aminés dans le métabolisme tumoral. La deuxième section présente la stratégie expérimentale pour obtenir les lignes de clones AADR utilisés tout au long de ce manuscrit. Les résultats obtenus sur ces lignées sont présentés dans le chapitre suivant. Cette section est elle-même divisée en deux parties correspondant aux deux projets d'étude : 1) la caractérisation des clones et l'étude du rôle de la voie GCN2-eIF2 α -

ATF4 dans la survie en milieu carencé en acides aminés (article en cours de soumission); 2) l'étude de l'utilisation des éléments du milieu de culture dans la survie des clones AADR lors de carence en acides aminés. Pour chacun des deux projets, les données sont présentées et résumées. Tous les résultats sont discutés dans la quatrième section sous forme d'une discussion générale et de perspectives, suivie d'une conclusion générale en cinquième section. Enfin, les deux dernières sections de ce manuscrit comportent : les Annexes où sont regroupés les travaux auxquels j'ai également pu participer, et les Références bibliographiques ayant été citées dans cette thèse.

Introduction

Bibliographique

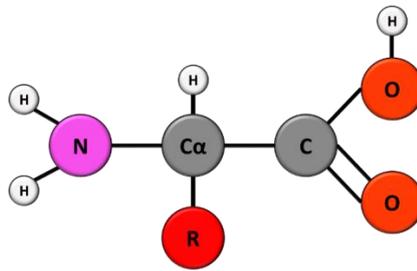


Figure 1 : Représentation schématique d'un acide α -aminé. Le carbone α central peut lier 3 groupements différents : le groupement amine NH_2 , le groupement carboxylique COOH et le groupement radical R spécifique à chaque acide aminé.

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

Tableau 1 : Classification des acides aminés par famille. Les abréviations de chaque acide aminé sont indiquées entre parenthèses.

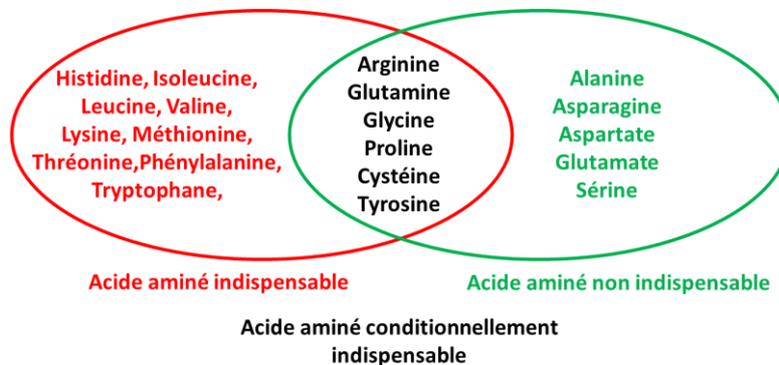


Figure 2 : Classification des acides aminés chez l'Homme. En rouge, acide aminé non synthétisable. En noir, acides aminés indispensables dans certaines conditions physiologiques. En vert, les acides aminés non indispensables

FONCTIONS	EXEMPLES
Régulateur du turnover protéiques	Leucine, Arginine
Précurseurs de médiateurs	Arginine (NO°)
Neurotransmetteurs	Glutamate, Glycine, Sérine
Synthèse nucléotides	Sérine, Glycine, Glutamine, Aspartate
Transporteur d'azote	Alanine, Glutamine
Pouvoir antioxydant	Cystéine
Réactions de méthylation	Méthionine
Précurseurs de molécules biologiques	Arginine (Créatine)
Précuseurs d'acides aminés	Méthionine (Cystéine), Phénylalanine (Tyrosine)
Néoglucogenèse	Alanine, Sérine, Glutamine

Tableau 2 : Liste non exhaustive de fonctions des acides aminés (adapté de Young et al., 1994).

Introduction bibliographique

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES ACIDES AMINES

I. Propriétés des acides aminés

Les acides aminés sont des molécules organiques découvertes dès le XIX^{ème} siècle composés d'un squelette carboné et de deux groupements fonctionnels : un groupement carboxylique (-COOH) et un groupement amine (-NH₂). Parmi les 500 acides aminés différents présents dans la nature, seuls 20 se lient à des ARN de transfert pour participer à la synthèse protéique. Ces acides aminés ont la particularité de porter une chaîne latérale sur le carbone α , le carbone auquel sont rattachés les groupements amines et carboxyliques, d'où leur dénomination d'acide α -aminé (Figure 1). Cette chaîne latérale spécifique à chaque acide α -aminé va également permettre de les classer en différents groupes selon les propriétés chimiques de celle-ci. Différentes familles ont pu être caractérisées selon la nature de la chaîne latérale (Aliphatique, hydroxylé/soufré, cyclique, aromatique, basique et acide) ou selon leur polarité et leur charge à pH neutre (Tableau 1).

Ces acides aminés peuvent également être séparés en fonction de leur capacité à être synthétisés par les organismes. Chez l'Homme, 9 acides aminés dits indispensables ne peuvent pas être synthétisés *de novo* et doivent alors être apportés par l'alimentation (W.C.Rose 1937 Young) (Figure 2). Toutefois, un acide aminé non indispensable peut le devenir si la production endogène n'est pas suffisante pour couvrir les besoins de l'organisme. C'est notamment le cas de la cystéine et l'arginine chez le jeune en croissance ou de la glutamine lors d'infection (Alba-Roth et al., 1988; Lacey and Wilmore, 1990; Souba et al., 1985; Wu et al., 2000). On parle alors d'acides aminés conditionnellement indispensables.

II. Fonctions des acides aminés

Les acides aminés sont les substrats de la synthèse protéique mais sont également impliqués dans différentes fonctions (Tableau 2).

Plusieurs d'entre eux participent à la régulation des mécanismes de neurotransmission. C'est notamment le cas du glutamate et d'un de ses dérivés le GABA (gamma-Aminobutyric acid) ou encore de la sérine et de la glycine dans certaines conditions (Chen et al., 2005; Lynch, 2004; Mustafa et al., 2004; Watanabe et al., 2002). Les acides aminés peuvent servir de substrats pour la synthèse d'hormone et d'autres molécules signal. La sérotonine synthétisée à partir de tryptophane peut agir à la fois sur le cerveau comme neurotransmetteur

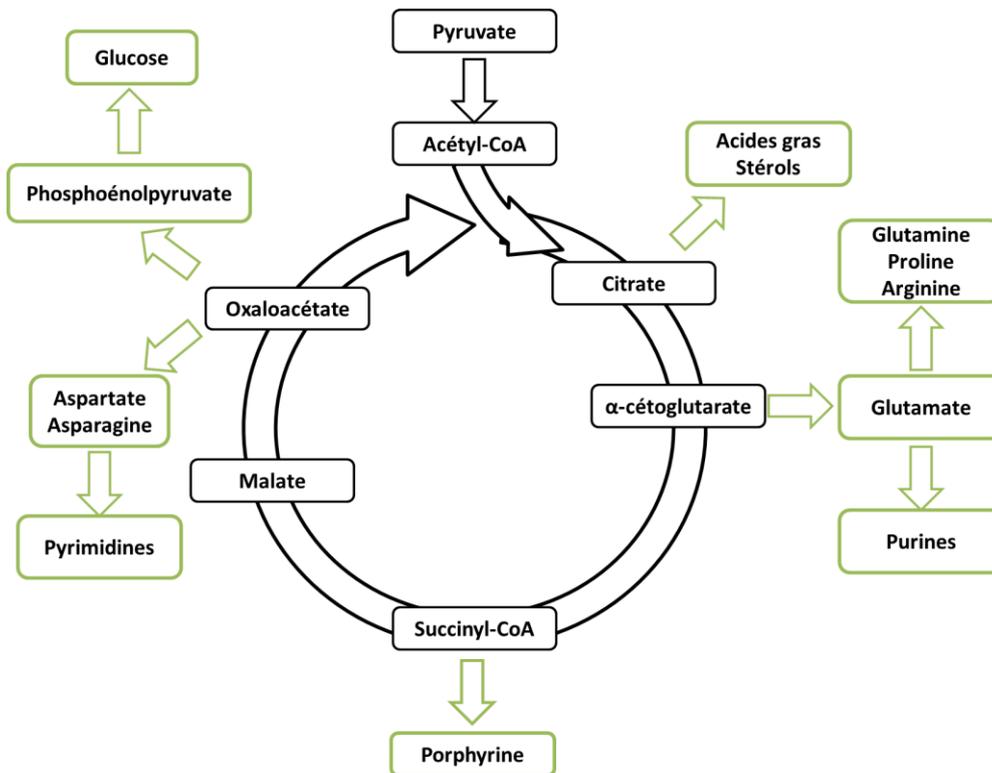


Figure 3 : Schéma simplifié du cycle de Krebs et du devenir de certains de ces intermédiaires. En vert sont représentées les différentes molécules obtenues à partir des intermédiaires du cycle de Krebs (en noir).

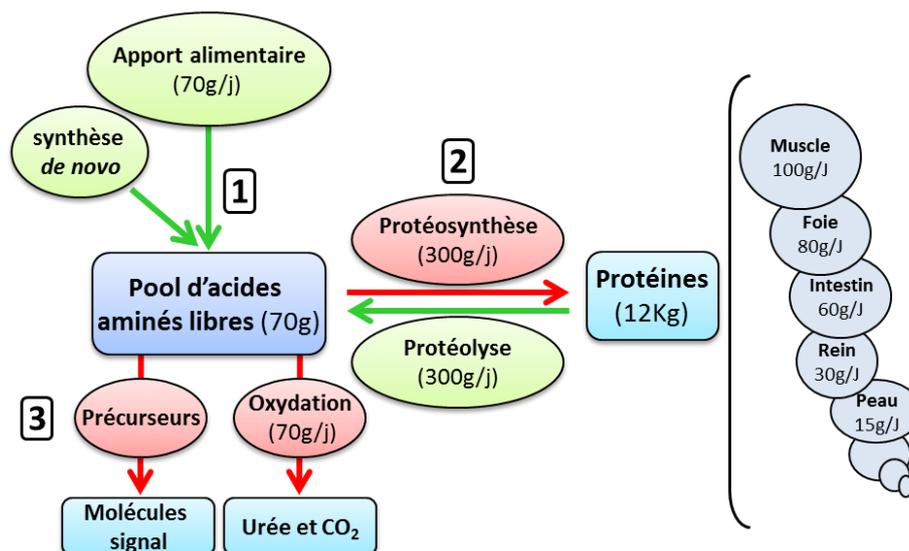


Figure 4 : Principaux systèmes responsables du maintien de l'homéostasie des acides aminés et des protéines chez l'homme. Le pool d'acides aminés libres dépend, (1) de l'apport de protéines alimentaires et de la synthèse d'acides aminés *de novo*, (2) de la synthèse et dégradation des protéines, et (3) de l'oxydation des acides aminés ou de leur utilisation pour la synthèse de molécules signal (hormones, neuromédiateurs,...). Les taux de renouvellement et les flux d'acides aminés journaliers pour un adulte sain d'environ 80 Kg sont indiqués entre parenthèse (Cano et al., 2007).

mais aussi sur certains organes comme l'estomac où elle pourra moduler la motilité des cellules gastriques (Sikander et al., 2009). La tyrosine est notamment impliquée dans la synthèse des catécholamines, des hormones de stress, et dans celle de la thyroxine, une hormone thyroïdienne impliquée dans la régulation du métabolisme basal. L'arginine est quant à elle métabolisée en monoxyde d'azote radicalaire NO° qui permet la vasodilatation de l'endothélium vasculaire lors de la réponse immunitaire.

Plusieurs acides aminés interviennent dans des voies métaboliques essentielles à la survie de la cellule comme la synthèse des nucléotides (glutamine, aspartate sérine et glycine) ou dans la maintenance du statut rédox (méthionine, cystéine) (Locasale, 2013). Ils servent également de substrats au cycle de Krebs, la voie métabolique majeure pour fournir de l'énergie aux cellules. Ce cycle permet également de fournir des substrats nécessaires à d'autres voies métaboliques telles que la synthèse d'acides aminés (ex. oxaloacétate pour l'aspartate) ou de lipides (citrate) (Figure 3).

III. Métabolisme des acides aminés

Si le glucose et les lipides peuvent être stockés de manière spécifique dans l'organisme respectivement sous forme de glycogène ou de triglycérides, il n'existe pas de systèmes/organes spécifiques dédiés au stockage des acides aminés. Le pool d'acides aminés libres dans l'organisme est finement régulé entre les mécanismes d'entrée et de sortie afin de maintenir leur homéostasie dans l'organisme (Figure 4). Les entrées sont représentées par les apports alimentaires, la synthèse *de novo* et la protéolyse. À l'inverse, les sorties sont la protéosynthèse, leurs diverses utilisations citées dans le paragraphe précédent et leur catabolisme.

A. Absorption

En condition postprandiale, la dégradation des protéines au niveau de l'intestin et dans les entérocytes va conduire à la libération de peptides et d'acides aminés libres. Ces derniers seront déversés dans la veine porte grâce à des transporteurs spécifiques (cf. chapitre transporteur) afin d'être conduit jusqu'au foie. Cet organe va jouer un rôle majeur dans l'utilisation de l'azote ingéré, en modulant quantitativement et qualitativement la redistribution postprandiale des acides aminés vers les tissus périphériques. Outre leur utilisation pour la synthèse des protéines hépatiques, certains acides aminés peuvent être

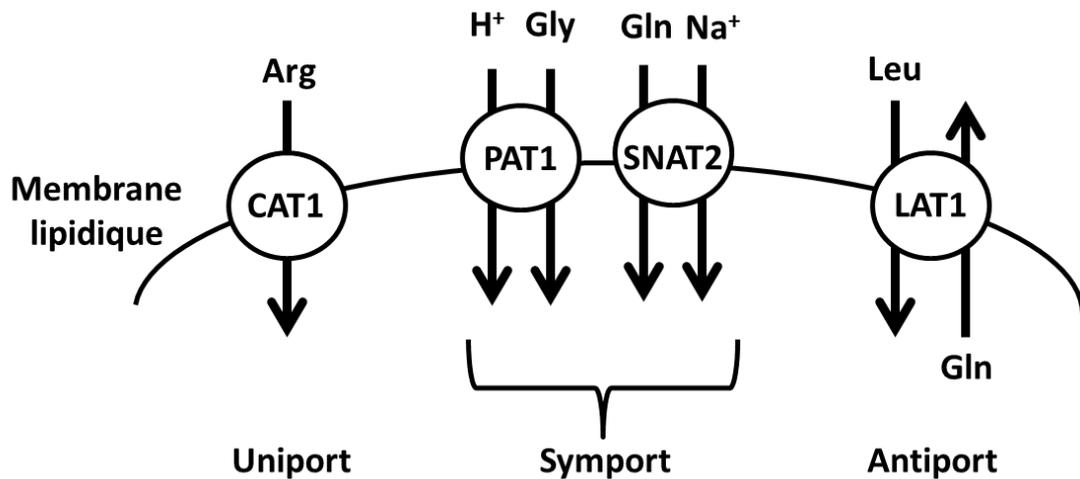
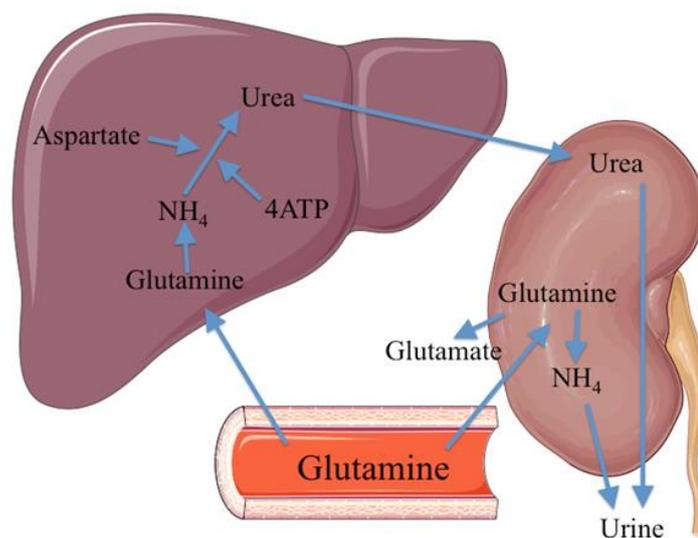


Figure 5 : Représentation des différents types de transports. Trois types de transports existent : 1) uniport pour l'entrée d'une seule molécule ; 2) le symport pour l'entrée coordonnée de différentes molécules ; 3) l'antiport qui permet l'entrée d'une molécule en échange de la sortie d'une seconde. Plusieurs transporteurs d'acides aminés sont utilisés ici comme exemple des différents types de transport.



NH₄: ammonium, ATP: adenosine triphosphate

Figure 6 : Élimination de l'ammonium par le foie (Leguina-Ruzzi, 2015). La glutamine permet le transport de l'ion ammonium (NH₄⁺) des tissus périphériques jusqu'au niveau du foie. Il sera alors catabolisé en glutamate libérant ainsi l'ion NH₄⁺ qui sera pris en charge par le cycle de l'urée pour être éliminée dans les urines par le rein. La glutamine peut être également désaminée au niveau du rein par des glutaminases.

métabolisés au niveau du foie afin de participer à d'autres voies métaboliques telles que la néoglucogenèse ou encore le cycle d'urée. Les acides aminés ramifiés et la méthionine qui ne sont pas métabolisés au niveau du foie seront directement transportés par les vaisseaux sanguins vers les organes périphériques.

B. Transport des acides aminés

La membrane protéolipidique des cellules forme une barrière sélective aux nutriments. Les acides aminés hydrophiles ne pouvant alors pas diffuser dans la cellule, il existe des systèmes de transport afin de permettre leurs entrées et sorties de la cellule mais aussi les échanges entre cytoplasme et les autres compartiments cellulaires comme le lysosome. Il existe trois types de transports : uniport, symport et antiport permettant tous de transporter de manière active les acides aminés (Figure 5). Ils peuvent également nécessiter un échange de Na^+ ou de H^+ pour fonctionner. L'équilibre de ces ions sera alors compensé par les antiports Na^+/H^+ (Thwaites and Anderson, 2007) et les pompes Na^+/K^+ (Rose et al., 2009). Les transporteurs d'acides aminés sont en premières lignes dans la détection des niveaux d'acides aminés extracellulaires permettant ainsi à la cellule d'adapter son métabolisme en fonction de la disponibilité en acides aminés (1, 2, 13).

C. Catabolisme oxydatif des acides aminés

L'utilisation des acides aminés par les différentes voies métaboliques va avoir pour conséquence l'apparition de multiples produits de dégradation. L'un d'entre eux est l'ion ammonium qui doit être rapidement éliminé car il est toxique sous cette forme pour les cellules. L'utilisation des acides aminés intervenant dans tous les tissus périphériques, des systèmes de transport permettent d'emmener l'ammonium jusqu'au foie. Ce transport se fait grâce à deux acides aminés, l'alanine et la glutamine.

La glutamine est synthétisée par conjugaison de l'ion ammonium sur le glutamate grâce à la glutamine synthétase et permet de transporter une forme neutre de l'ammoniac. Rein, foie et intestin sont capables de capter la glutamine. Au niveau hépatique, la glutamine sera catabolisée en glutamate libérant ainsi son ammoniac. Ce dernier sera alors pris en charge par la machinerie enzymatique du cycle de l'urée pour être ensuite éliminé dans les urines (Figure 6).

L'alanine est synthétisée par transamination du groupe amine du glutamate vers du pyruvate par l'enzyme alanine aminotransférase (ALAT). Relarguée dans la circulation sanguine, elle sera prise en charge par le foie où elle pourra être à nouveau convertie en

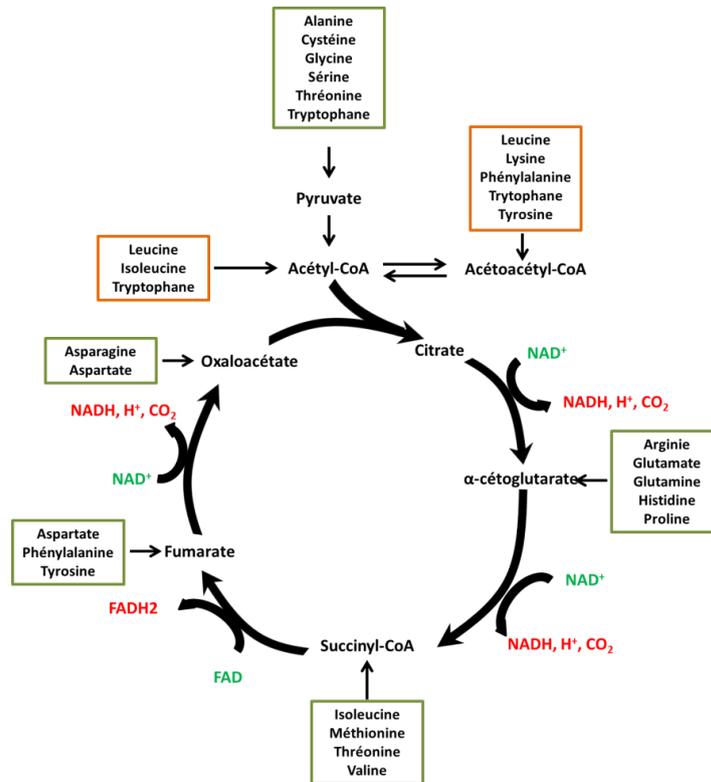


Figure 7 : Schéma d'entrée des acides aminés dans le cycle de Krebs. Les rectangles verts correspondent aux acides aminés glucoformateurs et les rectangles orange aux acides aminés cétoformateurs. Sur ce schéma, il est également indiqué la production de substrat énergétique (en rouge) lors de différentes étapes via la réduction des coenzymes NAD ou FAD (en vert).

Synthèse d'acides aminés par transamination :

$(\text{Glu, Ala ou Asp}) + \alpha\text{-cétocoacide} \leftrightarrow \text{Ac. } \alpha\text{-cétoglutarique} + \text{Acide aminé}$

$\alpha\text{-cétocoacide}$		Acide aminé
Ac hydroxypyruvique	→	Sérine
Acide $\alpha\text{-cétoglutarique}$	→	Glutamate
Acide oxaloacétique	→	Aspartate
Acide pyruvique	→	Alanine

Synthèse d'acides aminés par conversion :

Réaction réversible

Glycine \leftrightarrow Sérine

Réactions irréversibles

Méthionine	→	Cystéine par transsulfuration d'homocystéine
Phénylalanine	→	Tyrosine par hydroxylation
Aspartate	→	Alanine par décarboxylation
Glutamate	→	Proline par cyclisation

Tableau 3 : Synthèse des acides aminés non indispensables par transamination ou conversion

pyruvate pouvant être utilisé pour la néoglucogenèse et le groupement amine pris en charge par le cycle de l'urée.

Le catabolisme des 20 acides α -aminés aboutit à la formation de 7 composés : le pyruvate, des intermédiaires du cycle de Krebs (oxaloacétate, α -cétooglutarate, succinylCoA et fumarate), l'acétyl-CoA et l'acétoacétyl-CoA. Les acides aminés servant de substrats pour la formation d'acétyl-CoA et d'acétoacétyl-CoA, des corps cétoniques, sont dits cétoformateurs. Ceux qui en revanche, conduisent à la formation de pyruvate ou d'intermédiaires du cycle de Krebs sont appelés glucoformateurs car ils peuvent être convertis en phosphoénolpyruvate afin d'alimenter la voie de la néoglucogenèse (Figure 7).

D. Synthèse *de novo* des acides aminés

À l'exception des acides aminés indispensables, la synthèse *de novo* des acides aminés met en jeu deux types de réactions, soit la transamination, soit la conversion. La transamination est une réaction réversible consistant en l'échange d'un groupement amine primaire vers un α -cétoacide (Tableau 3). Cette réaction catalysée par une transaminase (ex. ASAT : aspartate aminotransférase) permet la formation d'acide α -cétooglutarique et d'un acide aminé spécifique de l' α -cétoacide de départ. Le glutamate est la principale source de groupement amine mais d'autres acides aminés comme la glutamine, l'alanine ou l'aspartate peuvent être également utilisés comme donneur. La conversion consiste à la synthèse d'un acide aminé à partir d'un autre acide aminé précurseur. Cette réaction irréversible, à l'exception de la conversion entre la sérine et la glycine, peut requérir des acides aminés indispensables. L'arginine est quant à elle synthétisée par conversion de l'arginosuccinate lors du cycle de l'urée.

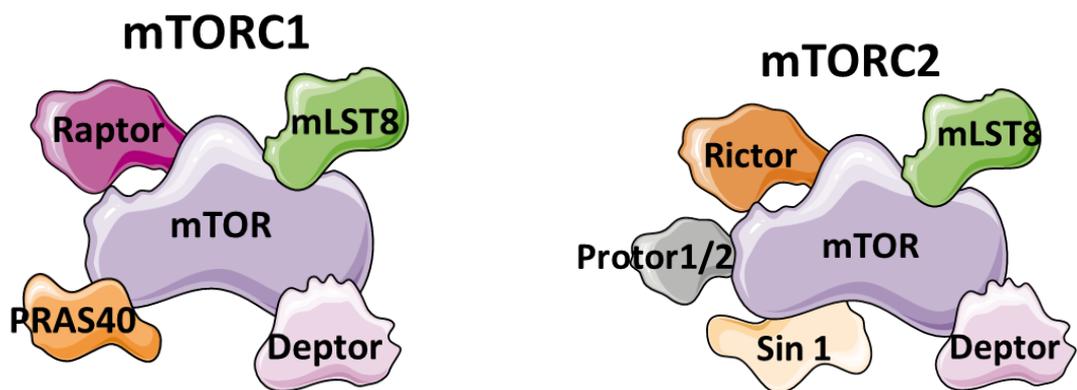


Figure 8 : Structure schématique des complexes mTORC1 et mTORC2. Dans les deux complexes, mTOR est liée à mLST8 et à Deptor. Dans le complexe 1, mTOR est associé spécifiquement à PRAS 40 et RAPTOR tandis que dans le complexe 2, mTOR s'associe à Rictor, Protor1/2 et Sin 1. Schéma adapté de Limon JJ *et al* 2012(Limon and Fruman, 2012)

CHAPITRE II : Voies GCN2 et mTORC1 : deux voies de signalisation régulant le métabolisme cellulaire en fonction de la disponibilité en acides aminés

Comme présenté au chapitre précédent, les acides aminés participent au fonctionnement de nombreuses voies métaboliques autres que la synthèse protéique. Ces utilisations sont cependant dépendantes de la disponibilité du ou des acides aminés impliqués. Au niveau de la cellule, il existe des systèmes qui permettent de moduler les fonctions cellulaires selon la concentration en acides aminés. Parmi eux, les voies de signalisation mTORC1 et GCN2, du nom des kinases impliquées, sont les systèmes majeurs permettant à la cellule de s'adapter à une variation de la disponibilité en acides aminés.

Dans ce chapitre, nous nous concentrerons sur le fonctionnement et la régulation de ces deux voies avant d'étudier plus précisément les mécanismes cellulaires qu'elles régulent en fonction de la disponibilité en acides aminés.

I. La voie mTORC1

A. La kinase mTOR et le complexe mTORC1

mTOR (mechanistic or mammalian target of rapamycin) est une enzyme de la famille des sérine/thréonines kinases. Découverte en 1991 chez la levure (Heitman et al., 1991) puis en 1994 chez les mammifères (Sabatini et al., 1994), cette kinase a été caractérisée comme la cible de la rapamycine, un antifongique produit par la bactérie *Streptomyces hygroscopicus*. mTOR est capable de s'associer à de nombreuses protéines. En particulier, deux protéines vont permettre de définir deux complexes différents : la protéine RAPTOR associée au complexe 1 (mTORC1 ou mTOR complexe 1) (Kim et al., 2002) et la protéine RICTOR associée au complexe 2 ou mTORC2 (Sarbasov et al., 2004) (Figure 8). mTORC2 contribue à la régulation du métabolisme cellulaire et à l'organisation du cytosquelette suite à la stimulation de la cellule par des facteurs de croissance (Frias et al., 2006). Cependant, pour réguler le métabolisme cellulaire en fonction de la disponibilité en acides aminés, c'est le complexe mTORC1 qui va entrer en jeu et particulièrement nous intéresser.

Le complexe mTORC1 est composé des protéines mTOR, RAPTOR (regulatory associated protein of mTOR), mLST8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8) et deux inhibiteurs PRAS40 et DEPTOR (Figure 8). Via son action sur différentes cibles, il concourt à la régulation de nombreux processus impliqués dans la croissance cellulaire.

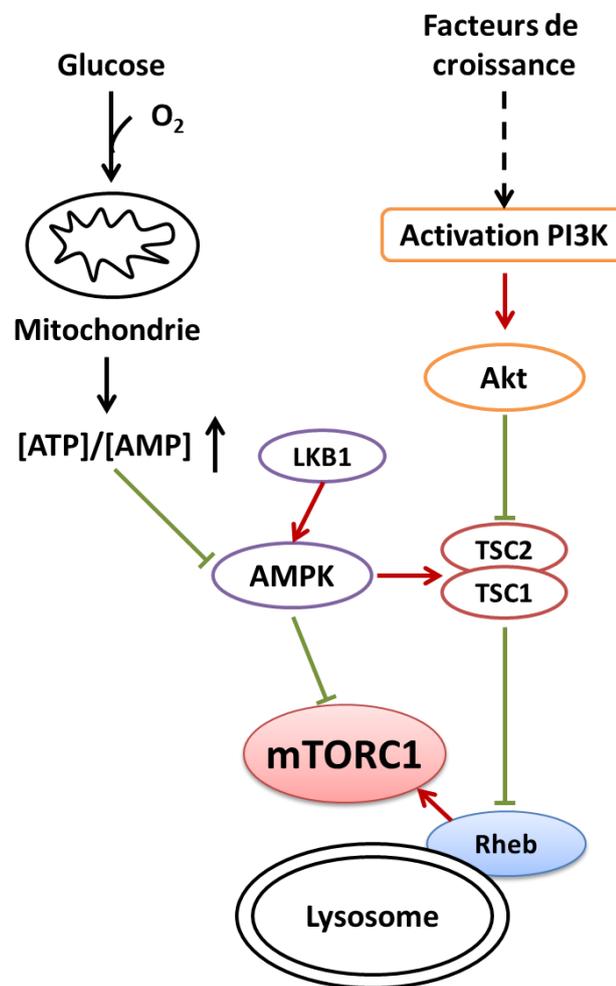


Figure 9: Schéma simplifié de la régulation de mTORC1 par le statut énergétique de la cellule et les facteurs de croissance. Les facteurs de croissance, l'O₂ et le glucose peuvent activer le complexe mTORC1 1) par l'activation de la voie PI3K-Akt et l'inhibition du complexe répresseur TSC1/2 ; 2) par l'augmentation du ratio ATP/AMP et l'inhibition de la kinase AMPK qui réprime mTORC1. Flèche activatrice en rouge, flèche inhibitrice en vert. Schéma adapté de Russell RC. *et al* 2014 (Russell et al., 2014).

L'activité de mTORC1 sur ses cibles est contrôlée en amont par la détection de divers signaux comme les facteurs de croissance, des stress ou la disponibilité en nutriments (Figure 9). Différentes voies de signalisations participent à la détection de ces signaux. C'est notamment le cas de la voie PI3K-AKT activée par la présence de facteurs de croissance afin de permettre l'activité de mTORC1 ou encore de la voie AMPK qui, à l'opposé, est activée par un faible statut énergétique afin d'inhiber l'activité du complexe. Ces deux voies vont contrôler mTORC1 en agissant différemment sur le complexe inhibiteur TSC (TSC1/TSC2). L'activité GTPase de TSC2 a pour cible le GTP associé à la protéine RHEB. Lorsque cette protéine est couplée à du GTP, elle permet l'induction de l'activité kinase de mTOR et ainsi la phosphorylation de ses cibles.

Plusieurs auteurs ont montré que RHEB pouvait être retrouvée dans différents compartiments de la cellule, que ce soit le noyau ou les membranes d'organites (Buerger et al., 2006; Yadav et al., 2013). La présence de RHEB dans ces différents compartiments de la cellule va permettre à cette protéine de réguler mTORC1 en fonction de signaux intracellulaires telle la disponibilité en acides aminés.

B. Régulation de mTORC1 par les acides aminés

Bien que l'impact de la carence en acides aminés sur mTOR soit connu depuis la fin des années 90 et les travaux de Hara *et al.* (Hara et al., 1998), les mécanismes exacts qui permettent cette régulation ne sont pas encore bien identifiés. Plusieurs protéines et complexes protéiques ont toutefois pu être identifiés comme participant à la détection des acides aminés et à la régulation de mTORC1. Ces régulateurs peuvent être retrouvés au niveau du cytosol ou lié à des organites comme les lysosomes.

1. Acides aminés et lysosomes

Le lysosome est un organite participant au recyclage des protéines et au maintien de l'homéostasie cellulaire ce qui fait de lui un des principaux réservoirs d'acides aminés de la cellule. Depuis quelques années, des auteurs ont montré que plusieurs protéines associées aux membranes des lysosomes participaient à la détection des acides aminés du lysosome et à la régulation de mTORC1. La V-ATPase, une pompe à proton de type V (vacuole) est nécessaire à l'activation de mTORC1 par les acides aminés (Zoncu et al., 2011). Lors d'apport suffisant en acides aminés, la V-ATPase va permettre d'induire l'activité GEF (guanine exchange factor) du complexe RAGULATOR ciblant des GTPases, les RAGs (Kim et al., 2008; Sancak et al., 2008, 2010). En se liant à la protéine RAPTOR de mTORC1, les RAGs permettent de

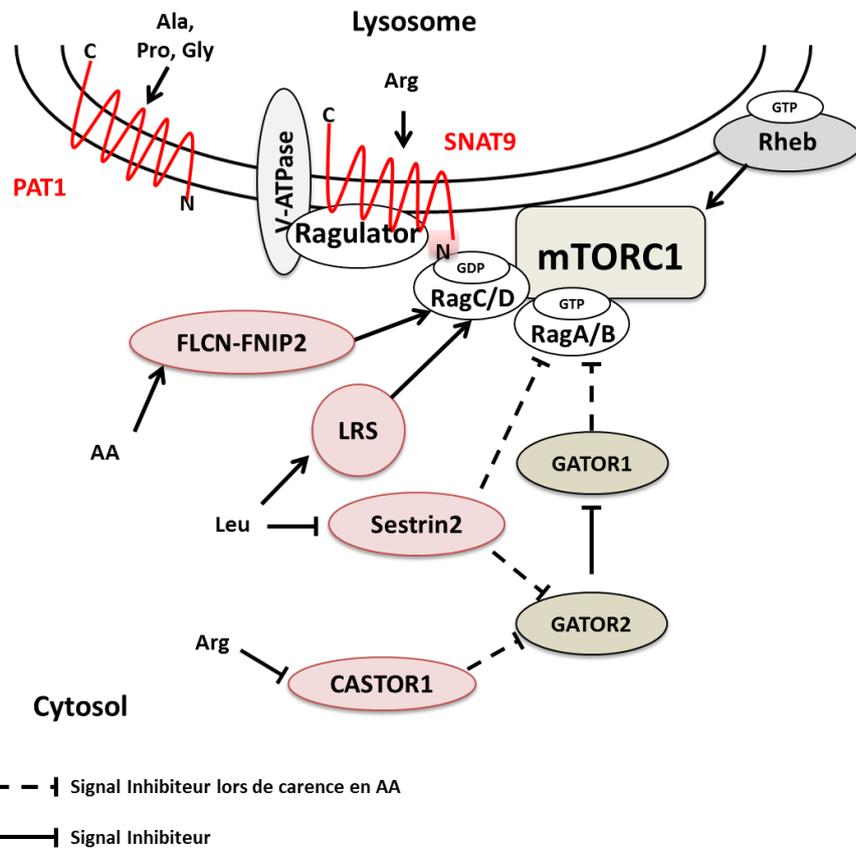


Figure 10 : Représentation schématique de la régulation de mTORC1 par les acides aminés. La régulation de mTORC1 par les acides aminés passe par la régulation de l'état GDP ou GTP des protéines RagC/D et RagA/B. Certains complexes régulateurs sont sensibles à la concentration cytosolique en acides aminés (FLCN-FNIP2, LRS, Sestrin 2 et CASTOR 1). La présence d'acides aminés détectés par des transporteurs (ex. SNAT9 ou PAT1) dans les lysosomes permet également de réguler l'activité de mTORC1. Cette action passe par la régulation de ces transporteurs sur la V-ATPase et le Ragulator. Schéma adapté **Goberdhan et al., 2016**

rapprocher mTOR de la protéine RHEB nécessaire à son activation (Sancak et al., 2008). L'activité de la V-ATPase serait modulée par des transporteurs d'acides aminés retrouvés au niveau de la membrane du lysosome tels que SNAT9, PAT1 (Heublein et al., 2010; Rebsamen et al., 2015) ou également LAT1 (Milkereit et al., 2015). Toutefois, les mécanismes précis qui permettent à ces transporteurs de réguler la V-ATPase ne sont pas encore caractérisés (Jewell and Guan, 2013). Par ailleurs, les transporteurs d'acides aminés ne sont pas les seules protéines impactant l'activité des RAGs, des protéines libres dans le cytoplasme peuvent également y participer complexifiant la régulation de mTORC1 par les acides aminés.

2. Régulation de mTORC1 en fonction de la concentration cytoplasmique en acides aminés

Il existe des complexes cytosoliques capables de réguler l'activité des RAGs et donc de mTORC1 en fonction de la concentration en acides aminés dans le cytoplasme. C'est notamment le cas du complexe FLCN-FNIP2 ciblant les RAGs C/D (Tsun et al., 2013) et participant à l'activité de mTORC1 en présence d'acides aminés. La leucine tRNA-synthétase (LRS) a été également caractérisée pour cibler les RAGs C/D en fonction de la concentration en leucine chez la levure mais reste sujet à débat chez les mammifères (Bar-Peled and Sabatini, 2014; Han et al., 2012). (Figure 10)

Parmi les carences en certains acides aminés spécifiques, les carences en leucine ou en arginine vont conduire à la plus forte inhibition de l'activité de mTORC1 (Hara et al., 1998). Cependant, les complexes ou protéines détectant la concentration cytoplasmique de ces acides aminés et agissant sur mTORC1 n'ont été découverts que très récemment. Concernant l'arginine, c'est la protéine CASTOR 1 (Chantranupong et al., 2016). Lors de carence en arginine, cette protéine peut s'homodimériser et inhiber le complexe GATOR2. N'étant pas fonctionnel, GATOR 2 ne pourra alors empêcher l'action inhibitrice du complexe GATOR 1 sur mTORC1 via son activité GTPase ciblant les RAGs A/B (Bar-Peled et al., 2013). Une autre protéine peut également inhiber l'action de GATOR 2, c'est la SESTRIN 2 (Chantranupong et al., 2014). Cette protéine est capable de lier la leucine libre faisant d'elle un senseur de la concentration cytoplasmique de cet acide aminé indispensable (Wolfson et al., 2016). En agissant sur GATOR2 ou directement sur les RAGs A/B, la SESTRIN2 permet d'inhiber l'activité de mTORC1 lors de carence en leucine (Peng et al., 2014).

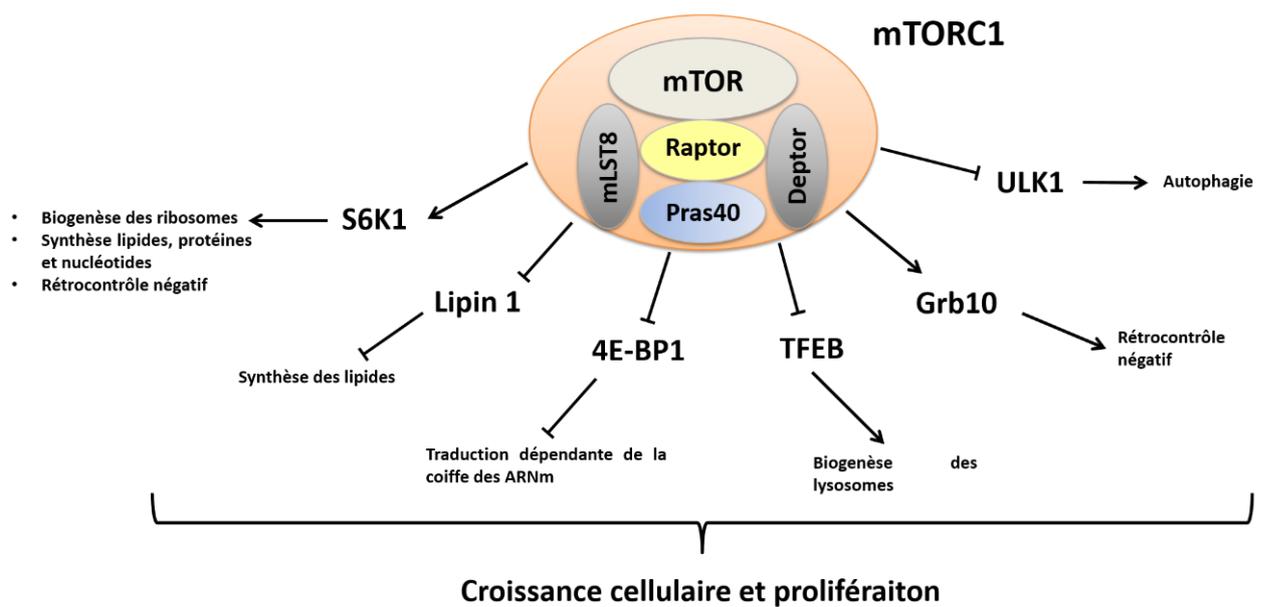


Figure 11 : Schéma simplifié des cibles de mTORC1 et des mécanismes régulés. Schéma adapté de (Huang and Fingar, 2014)

De manière intéressante, la transcription du gène *Sesn2* est décrite pour faire intervenir l'autre voie de signalisation sensible aux acides aminés, la voie GCN2 (Ye et al., 2015). Cette voie activée lors de carence en acides aminés permet l'expression d'ATF4 (cf. Chapitre suivant) qui pourra se fixer sur le promoteur de *Sesn2* afin d'induire sa transcription. Il est à noter que REDD1 (Regulated in DNA damage and development 1) est également une protéine inhibant mTORC1 dont la transcription est régulée par la voie GCN2-ATF4 (Jin et al., 2009)+Résultats non publiés). Toutefois, la régulation de l'activité inhibitrice de REDD1 ne serait pas dépendante de la concentration en acides aminés. Par ces mécanismes, la voie GCN2 participe à l'inhibition de mTORC1 lors de carences en acides aminés mais ce ne serait pas son seul moyen d'action. En effet, notre équipe a montré que GCN2 pourrait agir indépendamment d'ATF4 et serait un des mécanismes senseurs de la leucine et de l'arginine participant à la régulation de mTORC1 (Averous et al., 2016).

Une fois activé, mTORC1 n'est pas seulement confiné au lysosome. Des auteurs ont montré que ce complexe pouvait être retrouvé actif au niveau d'autres organites tels que le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi (Thomas et al., 2014). De plus, d'autres travaux de notre équipe ont montré que mTORC1 pouvait être activé sans liaison au lysosome augmentant ainsi un niveau de régulation de ce complexe par les acides aminés (Averous et al., 2014).

L'intégration de toutes ces informations sur le statut énergétique et nutritionnel de la cellule permettra alors à mTORC1 de réguler différents processus et d'adapter le métabolisme de la cellule à son environnement.

C. Protéines et mécanismes cibles de mTORC1

Comme précédemment discuté, mTORC1 participe de manière importante à la régulation de la croissance cellulaire. Cette régulation se fait par la phosphorylation par la kinase mTOR de nombreuses cibles impliquées dans les différents processus nécessaires à la croissance cellulaire (Figure 11). Depuis la caractérisation de mTOR, la synthèse protéique et l'autophagie sont les mécanismes régulés par mTORC1 les plus décrits dans la littérature.

mTORC1 participe au contrôle de la synthèse protéique via notamment deux protéines 4E-BP1 et p70-S6K1. 4E-BP1 est une protéine qui peut lier le facteur d'initiation de la traduction eIF4E. Ce dernier est une des protéines du complexe protéique eIF4F qui permet la traduction dépendante de la coiffe des ARNm. Dans ce complexe, eIF4E participe à la reconnaissance de la coiffe et au recrutement de la sous-unité 40S du ribosome au niveau des ARNm pour initier la traduction (Gingras et al., 1999). La liaison de 4E-BP1 avec eIF4E



Figure 12 : Structure de GCN2. GCN2 est composée d'un domaine d'interaction avec GCN1 et GCN20 nécessaire à son activation (RWD), un domaine pseudokinase dont la fonction n'est pas connue (PKD), un domaine protéine kinase, un domaine de liaison des ARNt non chargés (HisRS) et un domaine c-terminal responsable de la dimérisation et la liaison au ribosome (RBD).

va séquestrer ce facteur inhibant ainsi l'initiation de la synthèse protéique (Gingras et al., 1999). En phosphorylant 4E-BP1 sur plusieurs résidus, mTORC1 participe à la libération d'eIF4E et à la levée de l'inhibition de la synthèse protéique.

La phosphorylation du résidu Thr389 de p70-S6K1 par mTORC1 est nécessaire à l'activation de la kinase S6K1(Shah et al., 2000). Cette enzyme phosphoryle à son tour différentes protéines intervenant à différents niveaux de la traduction comme la formation des ribosomes (Jefferies et al., 1997; Meyuhas, 2008) ; l'initiation en phosphorylant eIF4B qui va alors se lier à eIF4A et favoriser la traduction dépendante de la coiffe en coopération avec eIF4E (Nielsen et al., 2011; Raught et al., 2004); et l'élongation en supprimant l'activité inhibitrice de l'eEF2K (eucaryotic elongation factor 2) sur le facteur d'élongation eEF2 (33,34).

Le complexe mTORC1 participe également à la régulation de l'autophagie, un des mécanismes protéolytiques de la cellule. S'il existe un niveau d'autophagie basale, ce mécanisme est majoritairement réprimé en absence de stress afin de maintenir la balance protéolyse/protéosynthèse dans la cellule. Cette répression se fait par la phosphorylation par mTORC1 de facteurs impliqués dans l'initiation de l'autophagie (ULK1 et ATG13)(Hosokawa et al., 2009; Kim et al., 2011) et en ciblant le facteur de transcription TFEB. Ce dernier est impliqué dans la biogénèse des lysosomes et sa phosphorylation par mTOR conduira à sa séquestration dans le cytosol par les protéines chaperonnes 14-3-3(Roczniak-Ferguson et al., 2012) (Ces mécanismes seront décrits dans le chapitre autophagie). Ces fonctions ne sont pas exclusivement régulées par la voie mTORC1, d'autres voies peuvent participer à leur régulation. C'est notamment le cas de la voie GCN2 et plus particulièrement lors de carences en acides aminés indispensables.

II. La voie GCN2/eIF2 α /ATF4

A. La kinase GCN2

GCN2 (General control non derepressible 2), une sérine/thréonine kinase, est avec mTORC1 le principal détecteur de la disponibilité en acides aminés de la cellule. C'est une protéine hautement conservée entre les eucaryotes au niveau fonctionnel et structurel (Figure 12) GCN2 est constituée de 5 domaines protéiques (de l'extrémité n-terminale à l'extrémité c-terminale) : le domaine RWD (RING finger proteins, WD-repeat-containing proteins, and yeast DEAD-like helicases) permettant de se lier à d'autres protéines comme GCN1/GCN20,

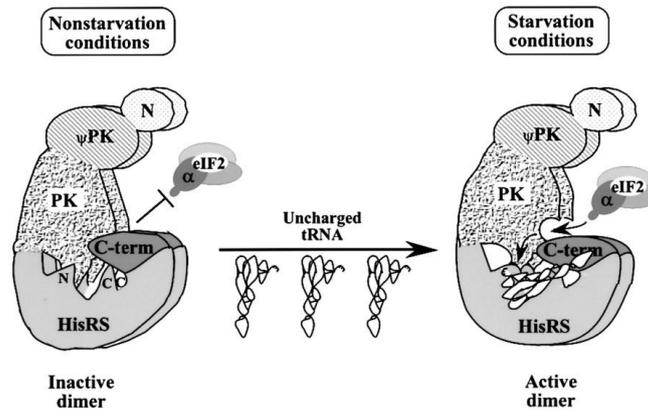


Figure 13 : Modèle d'activation de la kinase GCN2 par modifications allostériques suite à la liaison d'ARNt non chargés. Dans la forme inactive de GCN2 en conditions basales (à gauche), la liaison du C-term au domaine kinase(PK) empêche la liaison d'eIF2 α , ainsi que les interactions HisRS-N-PK. Dans des conditions de carence (à droite), les ARNt non chargés se lient à GCN2 en établissant des contacts avec le HisRS-N et le domaine C-terminal. L'ARNt lié induit des changements conformationnels dans les deux domaines qui sont transmis au domaine PK. Ainsi le domaine catalytique de la kinase devient accessible et peut alors phosphoryler eIF2 α (Qiu et al., 2001).

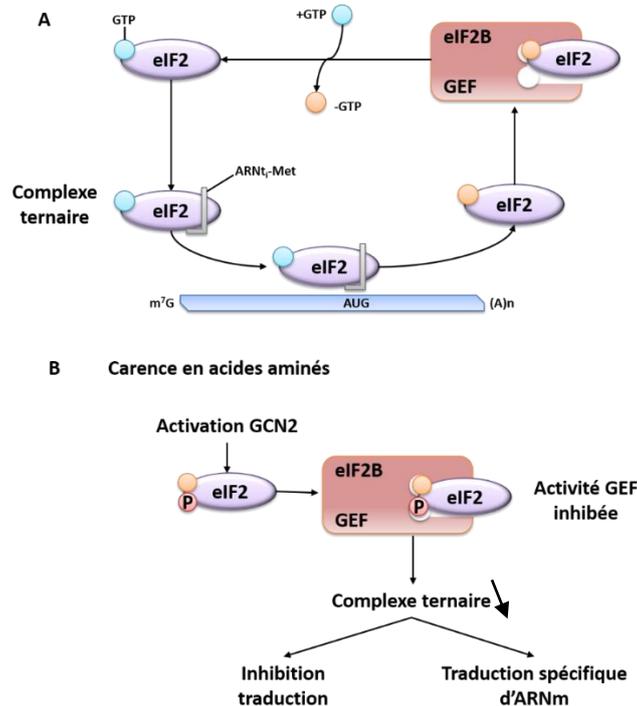


Figure 14 : Régulation d'eIF2 par eIF2B. (A) Le complexe ternaire formé d'eIF2, de GTP et de l'ARNt initiateur chargé de méthionine scanne l'ARNm jusqu'au codon initiateur AUG. L'hydrolyse du GTP permet de relarguer les facteurs d'initiation et à la traduction de commencer. L'eIF2-GDP sera pris en charge par le facteur d'échange à guanine eIF2B pour redonner de l'eIF2-GTP qui sera à nouveau utilisé. **(B)** Lorsque GCN2 phosphoryle eIF2 α lors de carence en acides aminés, il va séquestrer eIF2B et inhiber son action. Ceci réduit la quantité de complexe ternaire pour initier la traduction. (Schéma adapté de de Klann *et al* 2004) (Klann and Dever, 2004)

liaison nécessaire à l'activité de GCN2 (3, 9) ; un domaine pseudo-kinase sans activité catalytique; le domaine d'activité catalytique de l'enzyme ; un domaine présentant une forte homologie avec une des parties de l'histidyl-tRNA-synthétase (HisRD) pouvant lier des ARNt non chargés ; le domaine C-terminal serait responsable de la dimérisation de GCN2 et de sa liaison au ribosome (He et al., 2014; Narasimhan et al., 2004).

GCN2 est connue pour phosphoryler la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction eIF2 (eucaryotic initiation factor 2) lors de carence en acides aminés. La phosphorylation de ce facteur va conduire d'une part à l'inhibition de la synthèse protéique mais également, à l'expression spécifique du facteur de transcription ATF4 afin de permettre l'adaptation de la cellule. La méthionyl-tRNA-synthétase serait également une cible GCN2 mais spécifique de l'activation de GCN2 lors de rayonnements UV (Deng et al., 2002; Kwon et al., 2011). Les mécanismes d'activation de GCN2 par les rayonnements UV ne sont pas aussi bien décrits que ceux lors de carence en acides aminés.

Lors de carence en acides aminés, des ARNt non chargés vont s'accumuler dans la cellule et vont alors se fixer sur le domaine HisRD de dimères GCN2 inactifs. Cette fixation provoque un changement de conformation du dimère rendant accessible le domaine catalytique à l'ATP (Dong et al., 2000). Le changement de conformation du dimère va également conduire à l'autophosphorylation des résidus thréonines 882 et 887 permettant l'induction de l'activité kinase. GCN2 pourra alors phosphoryler le résidu Ser51 de la sous-unité α du facteur eIF2 (eIF2 α) ce qui a pour conséquence d'inhiber la synthèse protéique (Figure 13).

B. Synthèse protéique et phosphorylation d'eIF2 α

eIF2 est un facteur constitué de 3 sous-unités (α , β , γ) impliqué dans l'initiation de la synthèse protéique et plus particulièrement, dans la formation du complexe d'initiation ternaire constitué d'eIF2, de GTP et de l'ARNt initiateur chargé avec de la méthionine (Met-ARNti). Ce complexe ternaire va lier le complexe de pré-initiation 40S pour former le complexe 43S et lier le ribosome à l'ARNt initiateur. Une fois lié à l'extrémité 5' de l'ARNm (complexe 48S), ce complexe va scanner l'ARNm pour arriver au codon d'initiation AUG. La reconnaissance de ce dernier va permettre d'une part de relarguer les facteurs d'initiation et d'autre part, l'arrivée de la sous-unité 60S permettant la suite de la synthèse protéique. Ce relargage se fait par hydrolyse du GTP lié au facteur eIF2. eIF2-GDP sera ensuite recyclé en eIF2-GTP grâce au facteur eIF2B pour être utilisé dans un nouveau complexe ternaire (Figure

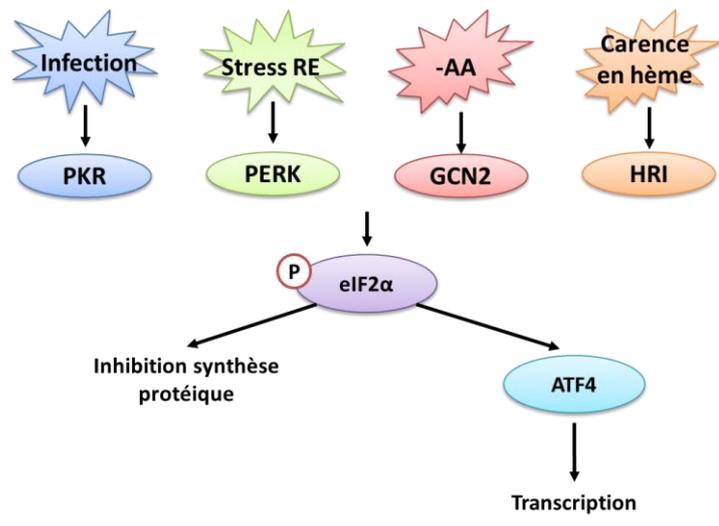


Figure 15 : La voie de réponse intégrée au stress. Il existe quatre kinases capables de phosphoryler eIF2 α lors de différents stress et d'induire l'expression d'ATF4 pour permettre l'adaptation des cellules à un stress. RE: réticulum endoplasmique. AA : acide aminé

14). La phosphorylation d'eIF2 α inhibe l'activité d'eIF2B en devenant un compétiteur (Krishnamoorthy et al., 2001). En effet, la concentration d'eIF2 est en excès par rapport à celle d'eIF2B. Ainsi, lorsqu'eIF2 α est phosphorylé, eIF2B est séquestré et inhibé par eIF2 réduisant la quantité disponible d'eIF2-GTP et de complexe ternaire dans la cellule. Cela aura pour conséquence une diminution de la formation des complexes d'initiation et donc une inhibition de la synthèse protéique.

L'inhibition de la synthèse protéique est un des mécanismes d'adaptation de la cellule qui lui permet d'économiser non seulement des acides aminés mais également de l'énergie pour faire face aux situations de stress. En effet, l'étape d'élongation de la traduction est un processus extrêmement coûteux en énergie. De plus, il a été démontré que la reprise de la synthèse protéique sans que le stress n'ait été résolu conduisait à l'apoptose des cellules (Han et al., 2013).

La carence en acides aminés n'est pas le seul stress qui conduit à la phosphorylation d'eIF2 α et à l'inhibition de la synthèse protéique. En effet, trois autres kinases phosphorylent eIF2 α lors de différentes situations : (1) la kinase PKR (double-stranded RNA-activated protein kinase) lors d'infection virale (Dar et al., 2005; Meurs et al., 1990); (2) la kinase PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase) lors de stress du réticulum endoplasmique (Harding et al., 1999); (3) la kinase HRI (Heme-Regulated eIF2 α kinase) lors de carence en hème (Donnelly et al., 2013) (Figure 15).

Dans les trois cas, la phosphorylation d'eIF2 α inhibera la synthèse protéique pour protéger la cellule. L'ensemble de ces kinases et des régulations par eIF2 α est communément appelé la voie de réponse intégrée au stress (voie ISR pour integrated stress response).

La phosphorylation d'eIF2 α et l'inhibition de la synthèse protéique favorisent également l'expression de certaines protéines, et notamment celle du facteur d'ATF4, qui sont nécessaires pour l'adaptation des cellules face à un stress.

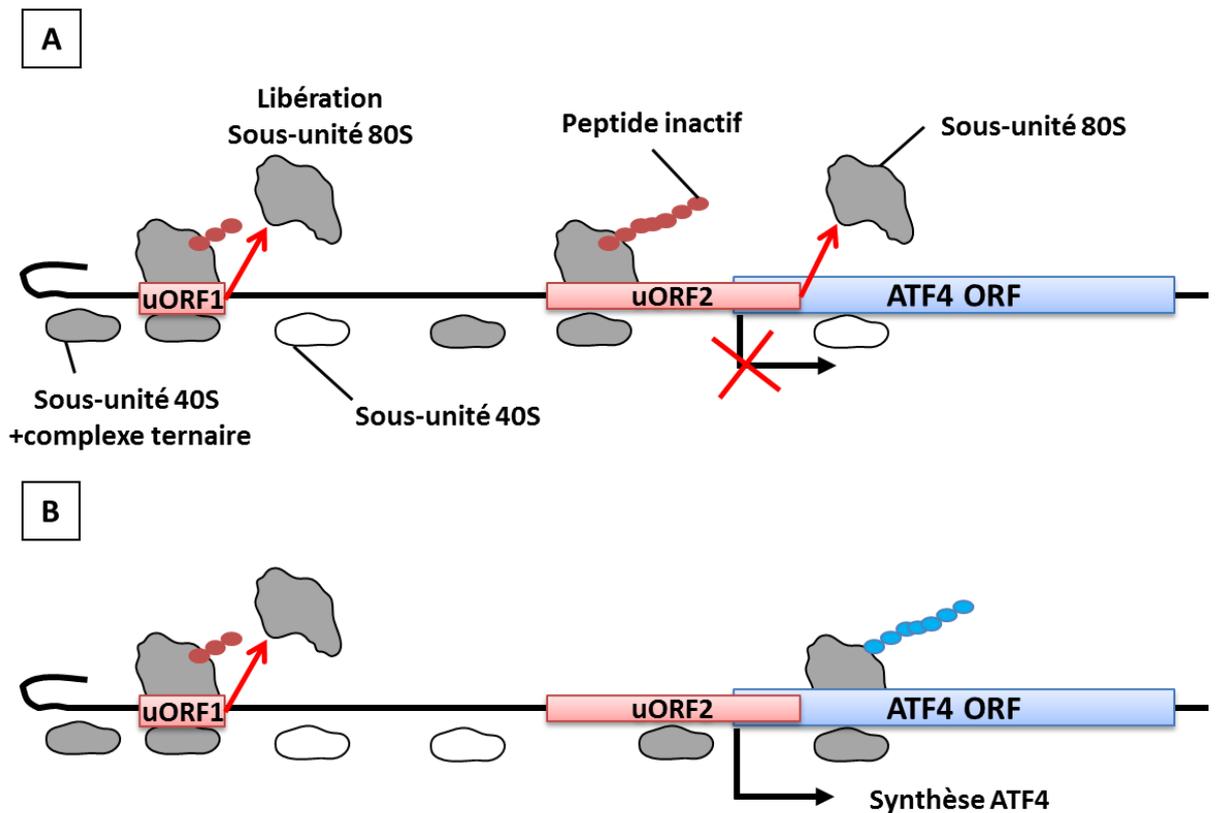


Figure 16 : Schéma représentant le contrôle de la traduction d'ATF4 par le facteur eIF2

(A) En absence de stress, le niveau de phosphorylation d'eIF2 α est faible. Ainsi les quantités de complexe eIF2-GTP et de complexes ternaires sont élevées, permettant d'initier la traduction au niveau de l'uORF 1 puis de la ré-initier au niveau de l'uORF2. Ce dernier chevauchant le cadre de lecture principale réduit fortement la probabilité d'expression d'ATF4. **(B)** Lors d'une carence en acides aminés, le niveau d'eIF2 α phosphorylé augmente entraînant la diminution de la quantité de complexe eIF2-GTP. Cette situation augmente la probabilité qu'un complexe ternaire s'associe au ribosome 40S après l'AUG initiateur de l'uORF2 ce qui permettra l'expression d'ATF4. Schéma adapté de Krishna M. Vattem (**Vattem and Wek, 2004**).

C. Expression d'ATF4 en condition d'inhibition de la synthèse protéique

L'ARNm codant pour le facteur de transcription ATF4 (activating transcription factor 4) est l'un des ARNm dont la traduction est augmentée lorsque le niveau de synthèse protéique est diminué. Cette traduction est rendue possible par la présence dans leur extrémité 5' non traduite de courtes séquences appelées uORF (upstream Open Reading Frame). Comme leur nom l'indique, ces uORFs se situent en amont du cadre de lecture principal et vont être responsables de la traduction sélective de la protéine en cas de phosphorylation d'eIF2 α . Le nombre, la disposition et la longueur des séquences uORFs sont autant de paramètres qui entrent en compte dans la régulation de l'expression de ces ARNm (Young and Wek, 2016). Afin de présenter le fonctionnement de la traduction dépendante des uORFs, la traduction de l'ARNm codant pour la protéine ATF4 sera utilisée comme exemple.

L'ARNm humain codant pour la protéine ATF4 comprend 2 uORFs dont le second est chevauchant avec le cadre de lecture codant pour ATF4 (Figure 16). En condition d'abondance nutritionnelle, le taux d'eIF2-GTP est élevé dans la cellule et permet la formation du complexe d'initiation de la traduction au niveau du premier AUG présent dans l'uORF1. Les ribosomes vont traduire cette courte séquence ne codant que pour 3 acides aminés et le ribosome 60S sera alors ensuite relargué. La petite sous-unité 40S va rester liée à l'ARNm et continuer à le scanner à la recherche d'un second AUG tout en se rechargeant avec un nouveau complexe ternaire. L'ensemble arrive alors au niveau du second AUG présent dans le deuxième uORF et va ré-initier la traduction à son niveau jusqu'à la rencontre d'un codon STOP. La terminaison de la synthèse de ce peptide inactif a lieu en aval du codon d'initiation de la protéine ATF4 et cette dernière ne peut alors être synthétisée.

En condition de carence en acides aminés, la phosphorylation d'eIF2 α par GCN2 et la séquestration d'eIF2B conduisent à la réduction de la quantité de complexe ternaire disponible dans la cellule. Après la traduction de l'uORF1, la sous-unité 40S ne va alors pas rentrer immédiatement en contact avec un nouveau complexe ternaire mais va tout de même, continuer à scanner l'ARNm. Dans ces conditions, la probabilité que le complexe ternaire se lie en amont de l'ORF d'ATF4 sans initier la synthèse au niveau du second uORF est fortement augmentée et permettra alors la traduction de la protéine ATF4.

Plus de 100 ARNm chez l'Homme présentent également une régulation de leur traduction par la présence d'uORFs dans leur séquence (Base de données <http://www.compgen.uni-muenster.de/tools/uorfdb/index.hbi?lang=en>). Parmi eux, on retrouve l'ARNm codant pour la protéine GADD34 qui participe au rétrocontrôle de la phosphorylation d'eIF2 α (Cf. Chapitre Rétrocontrôle), celui codant pour la protéine CHOP, un facteur de transcription régulant l'expression de gènes impliqués notamment dans l'apoptose ou encore celui codant pour la protéine VEGFA, un facteur proangiogénique (Bastide et al., 2008; Jousse et al., 2001; Lee et al., 2009).

Parmi ces ARNm, l'expression du facteur ATF4 a été bien caractérisée lors de divers stress (Harding et al., 2000). Ce facteur de transcription participe à la régulation de la transcription de nombreux gènes. De ce fait, il est l'un des principaux acteurs de l'adaptation des cellules.

D. Le facteur de transcription ATF4

ATF4 est un facteur de transcription à domaine basique-leucine zipper (bZIP) de la famille ATF/CREB (Activating Transcription Factor/c-AMP Response Element Binding Protein). Le domaine bZIP permet à cette protéine d'interagir avec l'ADN via la partie basique et de se complexer avec d'autres partenaires protéiques via le domaine leucine zipper (Hai and Hartman, 2001).

ATF4 est une protéine à faible demi-vie et rapidement dégradée en absence de stress. C'est en 2001 que Lassot *et al.*, ont démontré que cette dégradation impliquait le protéasome (Lassot et al., 2001). En effet, ATF4 présente un motif pouvant être reconnu par une protéine F-BOX, la β -TRCP. Lorsque la sérine présente dans ce motif est phosphorylée, β -TRCP va s'y fixer et permettre l'ubiquitination d'ATF4 par le complexe SCF-E3 ligase afin d'être dégradée par le protéasome.

Sa stabilité repose également sur son association avec d'autres protéines telles que p300 (Lassot et al., 2005). Ces deux mécanismes sont les mieux décrits pour réguler la stabilité d'ATF4. Plusieurs autres protéines peuvent interagir avec ATF4 et vont participer à la régulation de son activité. ATF4 peut notamment lier une sous-unité de l'ARN polymérase II pour induire la transcription de ses gènes cibles (De Angelis et al., 2003). À l'opposé, la liaison d'ATF4 au promoteur de ses cibles peut être inhibée si ATF4 est associée avec la protéine FIAT (factor inhibiting activating transcription factor 4 (ATF4)-mediated transcription) (Yu et al., 2005).

CARE elements are C/EBP-ATF composite sites

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

Figure 17 : Séquences CARE de différents gènes cibles de la voie eIF2 α /ATF4. Schéma de Kilberg M.S. *et al* 2009(Kilberg *et al.*, 2009)

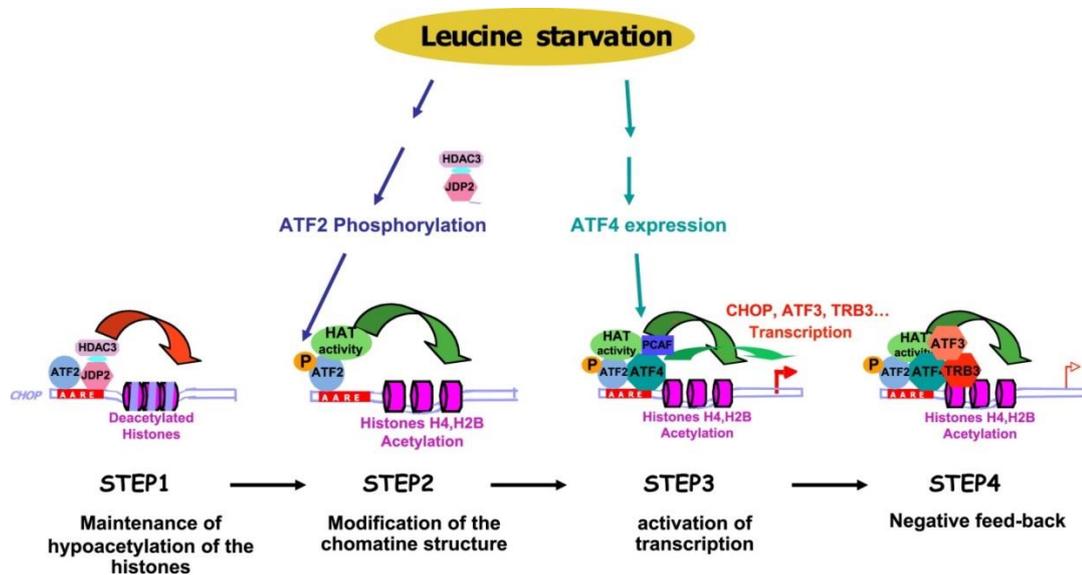


Figure 18 : Cinétique d'événements de fixation des protéines régulatrices sur l'AARE de CHOP au cours d'une carence en acides aminés (AA). (1) A l'état basal, les protéines ATF2 et JDP2 sont constitutivement fixées à l'AARE. JDP2 recrute une activité HDAC3 réprimant le gène. (2) Entre 0 et 30 minutes de carence en AA, ATF2 est phosphorylé sur la Thr71. Cette phosphorylation participe au recrutement d'une activité HAT qui va acétyler les histones H2B et H4. JDP2 et l'HDAC3 sont relargués de l'AARE. (3) Entre 1 et 4 heures, l'augmentation de l'expression d'ATF4 et sa fixation à l'AARE permettent le recrutement de PCAF. L'ensemble de ces facteurs participe à l'induction des gènes cible de la carence en AA. (4) Enfin, les protéines ATF3 et TRB3 vont lier l'AARE et réprimer la transcription AARE-dépendante, constituant ainsi une boucle de régulation négative (d'après Chaveroux. *et al*, 2009) (Chaveroux *et al.*, 2010).

Comme cité précédemment, l'expression d'ATF4 dépend majoritairement du niveau de phosphorylation d'eIF2 α . Lorsqu'ATF4 est exprimé, il va pouvoir transloquer dans le noyau et réguler l'expression de nombreux gènes cibles. Cette régulation est possible par la fixation d'ATF4 sur les séquences de type CARE (C/EBP ATF response element) présentes dans le promoteur de ces gènes (Figure 17). En contexte de carence en acides aminés, les séquences de type CARE sont également appelées séquence AARE (amino acids response element). Ces AARE sont composés du site ATF response element où se fixe ATF4 mais aussi d'un site consensus de fixation de C/EBP. L'activation de la transcription par ATF4 peut impliquer d'autres partenaires comme notre équipe l'a montré avec le gène CHOP qui possède un AARE (Figure 18)(Bruhat et al., 2009; Chaveroux et al., 2010). Bien qu'une séquence consensus ait été définie (Bruhat et al., 2002), les variations de celle-ci vont avoir un impact sur l'identité des partenaires d'ATF4 sur ces AARE.

Ces séquences AARE ont été retrouvées dans de nombreux gènes impliqués dans différentes voies métaboliques afin de permettre la réponse de la cellule face à un stress. Ces gènes sont notamment impliqués dans la synthèse des acides aminés, le transport d'acides aminés, l'autophagie ou encore l'apoptose (Tableau 4)

Si ces gènes participent à l'adaptation ou à la mort des cellules stressées, il existe également un rétrocontrôle de la voie afin de déphosphoryler eIF2 α et rétablir les niveaux de synthèse protéique. Ce rétrocontrôle passe par l'expression de GADD34 (Growth arrest and DNA damage-inducible protein 34), une sous-unité d'une phosphatase dont la transcription est régulée par ATF4 (Ma and Hendershot, 2003).

E. Rétrocontrôle de la voie

La phosphorylation d'eIF2 α est un évènement dynamique qui doit être finement régulé par la cellule. Cette régulation passe d'une part par les 4 kinases activées lors de différents stress ciblant cette protéine et d'autre part par le complexe phosphatase 1 (PP1). Chez les mammifères, la sous unité catalytique de ce complexe, PP1C, peut être recrutée par deux protéines afin de cibler la phosphorylation d'eIF2 α (He et al., 1997).

La première d'entre elles est la protéine CREP (constitutive repressor of eIF2 α Phosphorylation)(Jousse et al., 2003). Comme son nom l'indique, cette protéine, codée par le gène ppp1r15b, réprime la phosphorylation d'eIF2 α en condition basale en recrutant PP1C (68). C'est une protéine à faible demi-vie (~45min) exprimée de manière constitutive. En condition d'inhibition de la synthèse protéique, cette protéine est rapidement dégradée

Gène	Fonction (s)	Référence	
Asns	Asparagine synthétase	Synthèse de l'asparagine	(Siu et al., 2002)
Snat2/ Slc38a2	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2	Transporteur des acides aminés G P A S C Q N H M	(Gjymishka et al., 2008)
Atg16l1	Autophagy Related 16 Like 1	Autophagie	(B'chir et al., 2013)
Map1lc3b	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B	Autophagie	(Rzymiski et al., 2009)
Atg12	Autophagy-related protein 12	Autophagie	(Gjymishka et al., 2008)
Atg3	Autophagy-related protein 3	Autophagie	(Gjymishka et al., 2008)
Becn1	Beclin 1	Autophagie	(Gjymishka et al., 2008)
Gabarapl2	GABA Type A Receptor Associated Protein Like 2	Autophagie	(Gjymishka et al., 2008)
P62/ Sqstm1	Sequestosome 1	Autophagie	(Gjymishka et al., 2008)
Nbr1	Neighbor of BRCA1	Autophagie	(Gjymishka et al., 2008)
Atg7	Autophagy-related protein 7	Autophagie	(Gjymishka et al., 2008)
Chop	CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein	Autophagie/apoptose	(Bruhat et al., 1997)
Pepckm1	Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase	Néoglucogénèse	(Méndez-Lucas et al., 2014)
Chac1	ChaC glutathione specific gamma-glutamylcyclotransferase 1	Régulation stress oxydant /apoptose	(Mungrue et al., 2009)
Atf3	Activating transcription factor 3	Apoptose	(Pan et al., 2007)
Trib3	tribbles pseudokinase 3	Apoptose	(Carraro et al., 2010)
Asct2 /Slc1a5	ASC amino-acid transporter 2	Transporteur d'acides aminés	(Ren et al., 2015)
Xct /SLC7A11	cystine-glutamate antiporter	Transporteur d'acides aminés	(Lewerenz et al., 2012)
Lat1 /Slc7a5	L-type amino acid transporter 1	Transporteur d'acides aminés	(Cormerais et al., 2016)
Cat1 /Slc7a1	cationic amino acid transporter-1	Transporteur d'acides aminés	(Hyatt et al., 1997)

Tableau 4 : Liste non exhaustive des gènes possédant un AARE permettant une régulation par ATF4 et des fonctions métaboliques qui leurs sont associés.

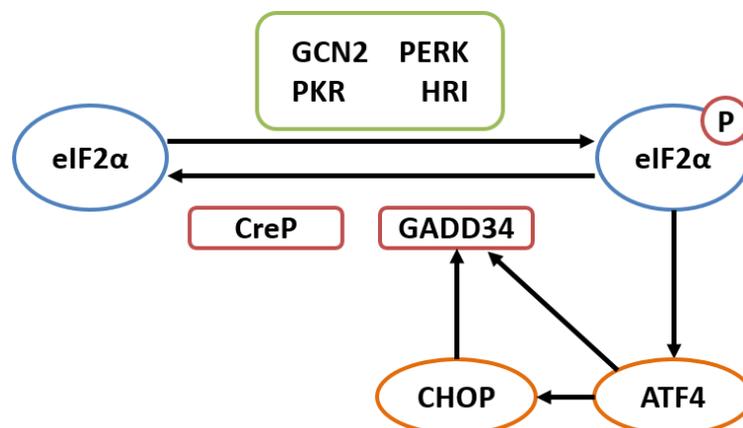


Figure 19 : Représentation schématique du rétrocontrôle de la voie ISR. Les quatre kinases GCN2, PERK, PKR et HRI sont capable de phosphoryler eIF2α qui à son tour va induire l'expression d'ATF4 activant ainsi la transcription des gènes en aval. Parmi eux, CHOP participe avec ATF4 à la transcription GADD34 qui recrutera la phosphatase PP1 pour déphosphoryler eIF2α. CREP est une sous-unité régulatrice constitutive d'une phosphatase qui déphosphoryle eIF2α.

coïncidant avec une augmentation de la phosphorylation d'eIF2 α et l'induction des voies de stress.

GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible 34) est la seconde protéine capable de recruter PP1C afin de déphosphoryler eIF2 α . GADD34 fait également partie de la famille ppp1r15 et est codée par le gène ppp1r15a. Contrairement à CREP, GADD34 n'est pas exprimée en condition basale. La transcription de son gène est notamment régulée par l'expression des facteurs CHOP (Marciniak et al., 2004) et ATF4 (Ma and Hendershot, 2003) en condition de stress. Tout comme l'ARNm codant pour ATF4, l'ARNm codant pour GADD34 possède 2 uORFs (Lee et al., 2009). Sa traduction est augmentée lorsque la synthèse protéique globale est inhibée grâce à la phosphorylation d'eIF2 α . GADD34 pourra alors recruter le complexe PP1C pour déphosphoryler eIF2 α créant ainsi une boucle de rétrocontrôle (Figure 19).

La déphosphorylation d'eIF2 α lors de carence en acides aminés est nécessaire afin que la cellule puisse augmenter la traduction des différents ARNm induits par ATF4 (Novoa et al., 2003). Ces protéines vont avoir un impact sur différents mécanismes qui permettront soit de la survie de la cellule et la résolution du stress, soit l'induction des programmes de mort cellulaire.

III. Mécanismes cellulaires régulés par les voies mTORC1 et GCN2 lors de carence en acides aminés

De par l'importance des acides aminés dans de nombreuses voies métaboliques, une diminution de leur disponibilité doit être rapidement résolue afin de rétablir l'homéostasie cellulaire. Pour cela, les voies GCN2 et mTORC1 vont réguler un grand nombre de mécanismes moléculaires (cycle cellulaire, statut rédox, métabolisme énergétique...). Toutefois, l'un des premiers objectifs de la cellule est de maintenir un stock suffisant d'acides aminés. Cet objectif est rempli d'une part par l'inhibition de la synthèse protéique afin d'économiser des acides aminés, et d'autre part par la synthèse *de novo* de certains acides aminés. L'autre stratégie est de trouver d'autres sources d'acides aminés via l'augmentation des transporteurs d'acides aminés ou la dégradation de protéines intra et extracellulaires.

La voie GCN2 est la principale voie d'adaptation des cellules à la carence en acides aminés. Elle participe d'une part à la régulation de la synthèse protéique par la phosphorylation d'eIF2 α et à la régulation des autres mécanismes via l'expression d'ATF4. En effet, ce facteur participe à la transcription de gènes impliqués dans la synthèse *de novo* des

acides aminés (ASNS : asparagine synthétase, PHGDH : phosphoglycérate déshydrogénase); dans le transport des acides aminés : CAT-1 (cationic amino acid transporter 1), SNAT2 (System A neutral amino acid transporter 2) ou encore LAT-1 (L-type amino acid transporter 1) (Fernandez et al., 2003; Gjymishka et al., 2008; Palii et al., 2004). D'autre part, ATF4 coopère avec la protéine CHOP pour réguler la transcription de gènes impliqués dans la régulation de l'autophagie ou de l'apoptose (B'chir et al., 2014).

La voie mTORC1 participe principalement à la régulation post-traductionnelle de protéines impliquées dans la synthèse protéique et l'autophagie. Ce niveau de régulation permet une adaptation rapide de la cellule lorsque la disponibilité en acides aminés varie.

L'autophagie, tout comme la synthèse protéique (cf. paragraphes précédents), est un des mécanismes majeurs régulés à la fois par la voie GCN2 et par la voie mTORC1. Elle peut être induite pour recycler des protéines intra ou extracellulaires en acides aminés libres afin de permettre transitoirement l'adaptation de la cellule à la carence. En revanche, si la durée et l'intensité de la carence sont trop importantes pour permettre l'adaptation, les voies de mort cellulaires peuvent alors être induites.

A. Autophagie

L'autophagie du grec autos : « soi-même », et phagein « manger » est un processus ubiquitaire visant la dégradation d'une partie du contenu cellulaire par les lysosomes de la cellule. Appelé également autophagocytose, ce mécanisme joue un rôle clé dans la croissance, le développement et l'homéostasie cellulaire via le maintien de la balance entre la synthèse et le recyclage de composants cellulaires. Il existe trois formes majeures d'autophagie : (1) la macro-autophagie consistant à la dégradation d'une portion du cytoplasme contenue dans une vacuole (autophagosome) qui fusionnera avec les lysosomes ; (2) la micro-autophagie où le contenu à recycler fusionnera directement avec les lysosomes via invagination de sa membrane ; (3) l'autophagie assurée par des protéines chaperonnes qui amènent aux lysosomes des protéines anormalement conformées pour les recycler. Pour la suite de ce chapitre, le terme autophagie désignera uniquement la macro-autophagie.

Au sein des cellules, il existe un niveau d'autophagie basale qui peut être modulé si les cellules font face à des stress tels que la carence en acides aminés. Ce mécanisme doit être finement régulé afin d'assurer le bon fonctionnement de la cellule. Perturber le fonctionnement de ce mécanisme peut avoir des conséquences néfastes pour la cellule voire pour l'organisme entier. Par exemple, un dysfonctionnement de l'autophagie est retrouvé dans

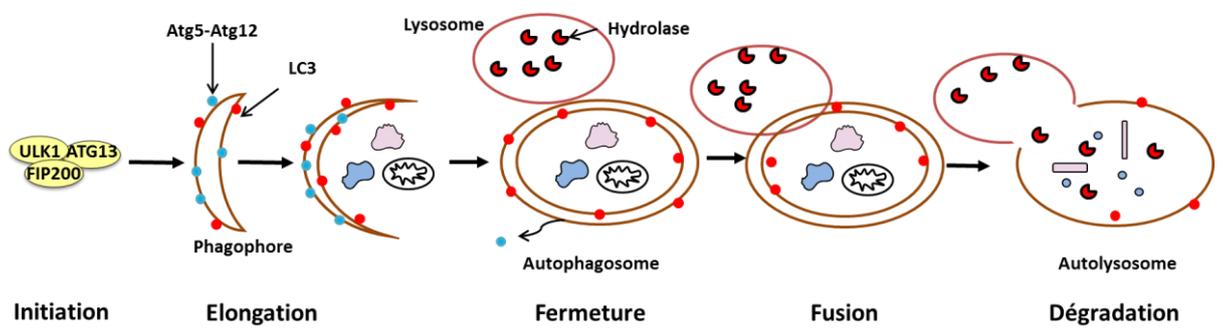


Figure 20 : Les principales étapes et principaux acteurs de l'autophagie. L'initiation dépend du complexe ULK-1-Atg13-FIP200 qui va permettre d'initier la formation du phagophore. Les complexes Atg5-Atg12-Atg16L1 et LC3 vont alors participer à l'élongation de cette membrane jusqu'à sa fermeture. Une fois l'autophagosome formée, celui pourra alors fusionner avec les lysosomes ce qui permettra aux enzymes lysosomales de dégrader le contenu des autophagosomes.

de nombreuses maladies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Nikoletopoulou et al., 2015). Un autre exemple est l'augmentation des niveaux d'autophagie dans les cellules cancéreuses soumises à de fortes carences en nutriments afin de favoriser leur survie (Kim et al., 2015b; Sato et al., 2007).

Dans ce chapitre, nous nous concentrerons sur la régulation des différentes étapes de l'autophagie lors de carence en acides aminés. Cette régulation se fait notamment à différents niveaux grâce aux voies mTORC1 et GCN2 qui sont les principaux senseurs des variations de la disponibilité en acides aminés dans la cellule.

1. Mécanismes moléculaires et gènes de l'autophagie

Au niveau moléculaire, la mise en place du processus autophagique implique de nombreuses protéines et gènes appelés ATG (autophagy related gene). Ces gènes sont très conservés au cours de l'évolution et sont impliqués dans les diverses étapes de régulation de l'autophagie ou de la formation/maturation des autophagosomes.

Le processus autophagique peut être divisé en trois étapes : (1) l'initiation et la formation de la membrane d'isolation, (2) l'élongation et (3) la terminaison ou la maturation de l'autophagosome par fusion avec le lysosome (Figure 20).

a) Initiation et formation de la membrane d'isolation

L'initiation consiste à la formation dans le cytoplasme d'une membrane d'isolation, également appelée phagophore qui va participer à la délimitation des composés cytoplasmiques à dégrader. Cette étape est sous le contrôle d'un complexe hétéro-trimérique ULK1/2-Atg13-FIP200.

b) Elongation

L'élongation consiste à l'expansion de ce phagophore autour de la portion cytoplasmique à dégrader grâce à deux complexes protéiques : un hétéro-trimère Atg5-Atg12-Atg16L1 et un système impliquant la protéine LC3 (Ohsumi, 2001).

c) Terminaison

La dernière étape de l'autophagie intervient avec la fermeture de l'autophagosome et sa fusion avec le lysosome afin de former l'autolysosome. Cette dernière structure permet alors de mettre en contact les enzymes du lysosome avec le contenu des vacuoles afin de permettre le recyclage de ces derniers. Cette fusion est dépendante du pH acide du lysosome

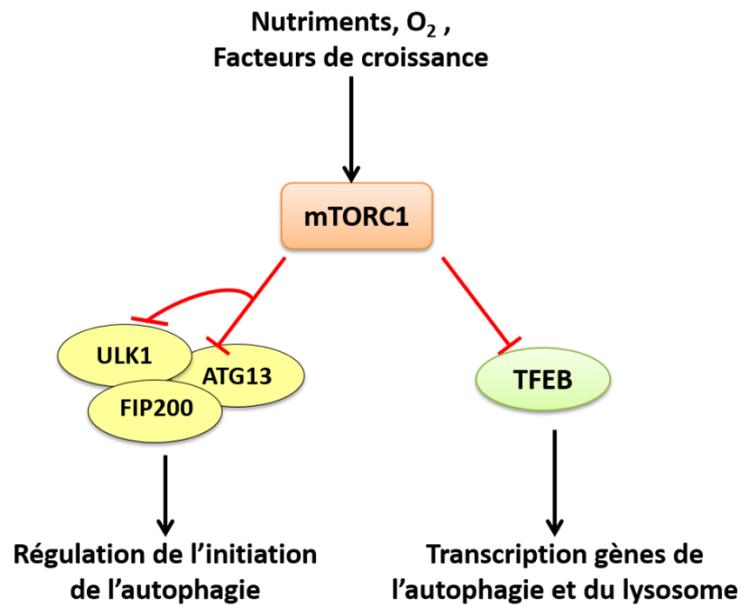


Figure 21 : Régulation de l'autophagie par mTORC1. Les lignes en rouges indiquent une action inhibitrice de mTORC1 sur ces cibles en absence de stress. Schéma adapté de (Kim and Guan, 2015)

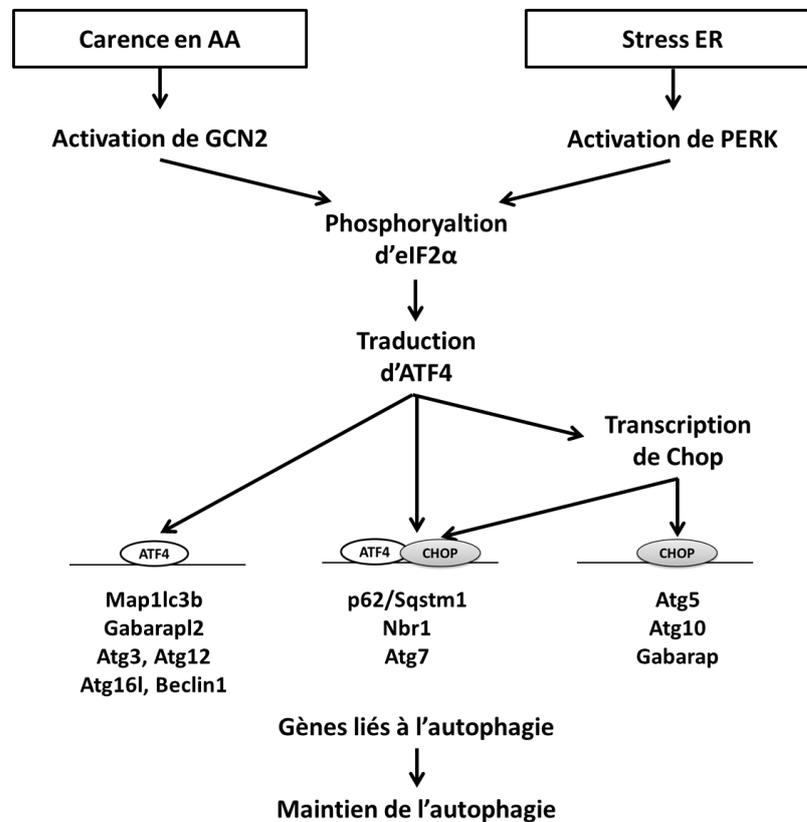


Figure 22 : Modèle de Régulation des gènes de l'autophagie par les facteurs ATF4 et CHOP. Trois classes de gènes de l'autophagie ont été identifiées en fonction de leur dépendance à ATF4, à CHOP ou au deux. Schéma adapté de (B'chir et al., 2013)

comme le montre les études utilisant des inhibiteurs des pompes H⁺ lysosomales (Bafilomycine A1(Mousavi et al., 2001)). Ces étapes vont être la cible des voies de signalisation mTORC1 et GCN2 afin de réguler l'autophagie lors de carence en acides aminés.

2. Régulation du processus autophagique lors de carence en acides aminés

En cas de carences en acides aminés, l'organisme va aussi favoriser les mécanismes de protéolyse afin de maintenir l'homéostasie. Foie, intestin et rein sont les principaux donneurs d'acides aminés au cours des premières heures de jeûne chez les mammifères. Au niveau du foie, l'autophagie est rapidement induite lors de carences en acides aminés. La mise en place de ce mécanisme est dépendante de plusieurs voies de signalisation qui vont agir rapidement par des modifications post-traductionnelles ou en agissant sur la transcription des gènes codant pour des acteurs de l'autophagie afin d'induire leur renouvellement (Ecker et al., 2010; Fougeray et al., 2012; Ye et al., 2010).

a) Régulation post-traductionnelle

Il existe de nombreuses kinases participant à la régulation de l'autophagie en fonction de divers stress comme l'AMPK ou AKT (Pietrocola et al., 2013; Xie et al., 2014). En fonction de la disponibilité en acides aminés, c'est la kinase mTOR qui y participe en ciblant le complexe ULK1-ATG13-FIP200 impliqué dans l'initiation de l'autophagie. En condition d'apport suffisant en acides aminés, le complexe mTORC1 s'associe à ce complexe via une liaison entre RAPTOR et ULK-1 et phosphoryle ATG13 et ULK1 (Hosokawa et al., 2009). La phosphorylation d'ULK1 inhibe son activité kinase ciblant FIP200 et ATG13 tandis que la phosphorylation d'ATG13 empêche la localisation du complexe au niveau des phagophores (Ganley et al., 2009; Puente et al., 2016). Lors de carence en acides aminés, mTORC1 est inactif et ne peut phosphoryler ULK1 et ATG13 permettant alors l'action de ces protéines et l'induction des premières étapes de l'autophagie (Figure 21).

Ces modifications post-traductionnelles sont importantes afin de permettre une réponse rapide à la carence en acides aminés. Cependant, si cette situation perdure, un autre niveau de régulation entre en jeu afin de renouveler les acteurs de l'autophagie. Cette régulation se fait par la régulation de la transcription des gènes codant pour ces protéines via la voie GCN2 et par le facteur TFEB.

b) Régulation transcriptionnelle

Lorsque GCN2 est activée lors de carences en acides aminés, elle va permettre l'induction du facteur de transcription ATF4. Ce dernier est capable de se lier au promoteur de certains gènes de par la présence des séquences AARE (B'chir et al., 2013). C'est notamment le cas des gènes Map1lc3b, Atg12 ou encore Atg3. ATF4 est également capable d'induire l'expression du facteur de transcription CHOP. Ce facteur va permettre d'induire l'expression de deux autres sets de gènes : des gènes dépendants d'ATF4 et de CHOP (par exemple p62/Sqstm1 et Atg7) ou fixant seulement CHOP (Atg10, Atg5 et Gabarap) (Figure 22). Le dernier groupe de gènes ne fixant que CHOP est néanmoins dépendant de l'expression d'ATF4 pour permettre l'expression de CHOP comme il a été montré par *B'Chir et al* en 2013 grâce à des expériences sur des cellules ATF4^{-/-} (B'chir et al., 2013).

Un autre facteur de transcription, le facteur TFEB (Transcription factor EB), participe également à la régulation de nombreux gènes de l'autophagie comme Sqstm1 et Map1lc3 (Sardiello et al., 2009). Cette protéine peut être phosphorylée par mTORC1 en condition basale ce qui va conduire à sa séquestration dans le cytoplasme par les protéines chaperonnes 14-3-3 (Peña-Llopis et al., 2011; Roczniak-Ferguson et al., 2012). L'inhibition de mTORC1 lors de carence en acides aminés permet alors à TFEB d'aller dans le noyau et participer à la régulation transcriptionnelle de l'autophagie.

L'autophagie peut également participer à la régulation d'autres mécanismes comme l'apoptose. En effet, il existe des interactions entre des protéines impliquées dans chaque système comme entre Atg4D et caspase-3 (Betin and Lane, 2009), Beclin-1 et l'anti-apoptotique Bcl-XL (Maiuri et al., 2007) ou encore Atg12 et Mcl-1 (Rubinstein et al., 2011) qui vont participer à l'adaptation des cellules à un stress. *B'Chir et al* en 2014 ont également montré que certains facteurs comme CHOP participaient à la régulation de ces deux processus en fonction de la durée de la carence en acides aminés (B'chir et al., 2014).

B. Apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un événement qui survient de manière naturelle au cours du développement et du vieillissement. Ce processus va permettre l'autodestruction de cellules et le maintien de l'homéostasie des tissus. L'apoptose est à différencier de la nécrose, un autre mécanisme de mort cellulaire non régulé induit par des stress extracellulaires, qui est toxique pour les cellules proches. Plusieurs caractéristiques morphologiques permettent de reconnaître les différentes étapes de l'apoptose : la réduction

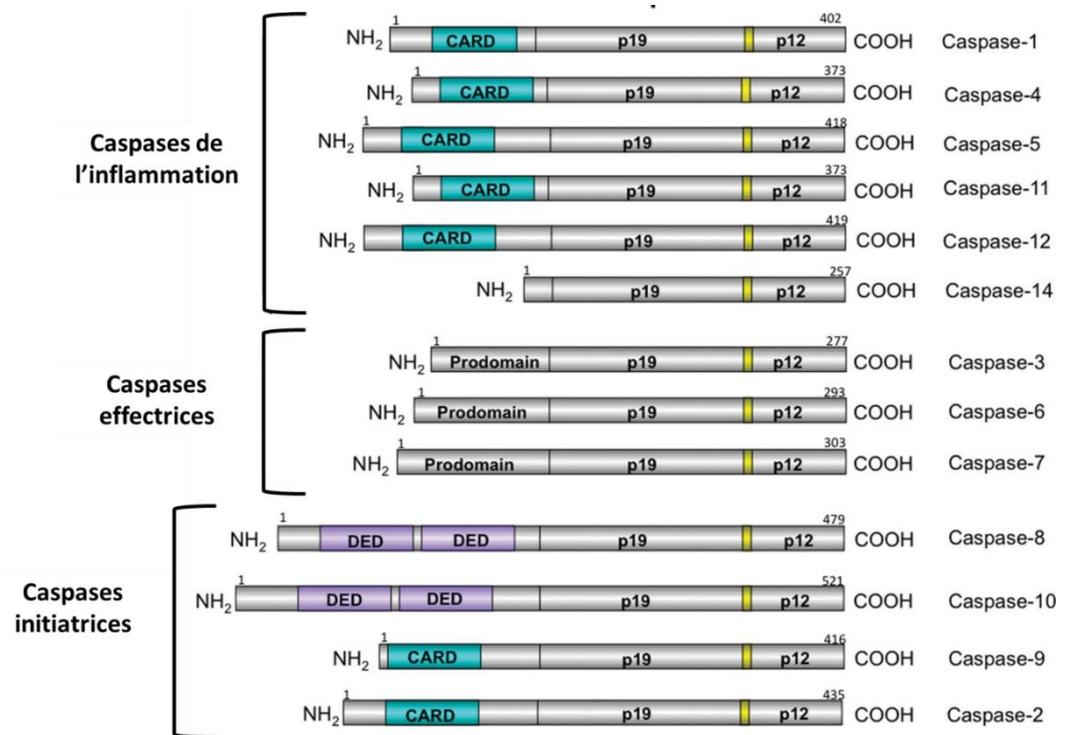


Figure 23 : Les principales caspases impliquées dans l'apoptose chez les mammifères. Tiré de Ribe 2008 (Ribe et al., 2008)

de la taille des cellules accompagnée d'une condensation de la chromatine ; l'ADN et le noyau sont ensuite fragmentés formant ainsi des corps chromatinien avec maintien de l'intégrité de la membrane cytoplasmique ; enfin, des protrusions de la membrane vont englober des portions du cytoplasme donnant ainsi des corps apoptotiques qui se détacheront de la cellule afin d'être phagocytés et recyclés par les cellules environnantes. Ces étapes sont toutes sous le contrôle de nombreux facteurs qui ont notamment été identifiés chez *Caenorhabditis elegans* (Horvitz, 1999). Ils participent à la fois à l'inhibition de l'apoptose en absence de stress mais aussi, à son induction et son bon déroulement en cas de signaux pro-apoptotiques pour rapidement dégrader la cellule stressée. Une perte ou mutation d'une ou plusieurs de ces protéines régulatrices va conduire à l'échappement de la cellule des signaux pro-apoptotiques. Par exemple *Mila E. McCurrach et al* ont montré que les fibroblastes de souris KO pour la protéine BAX, un facteur pro-apoptotique, étaient résistants à l'apoptose induite par des drogues (McCurrach et al., 1997). Il existe différentes voies de signalisations impliquées dans l'induction de l'apoptose en fonction du stress initial.

1. Les différentes voies d'induction de l'apoptose

En 1972 *Kerr et al* ont décrit les principales caractéristiques morphologiques de l'apoptose (Kerr et al., 1972). Leurs travaux ont depuis été approfondis ce qui a permis de définir différentes voies pro-apoptotiques. Ces voies présentent toutes la même finalité, à savoir compaction de l'ADN, dégradation des composants intracellulaires et formation des corps apoptotiques. Cependant, des différences existent quant aux signaux pro-apoptotiques et aux cascades d'activation conduisant à la mort cellulaire. Il existe trois voies de signalisation. La première impliquent les lymphocytes T cytotoxiques et des protéines de types perforine/granzyme afin d'induire la mort de cellules ciblées (Voskoboinik et al., 2015). Les deux autres voies majeures décrites par la suite permettent l'induction de l'apoptose suite à des signaux extra ou intracellulaires. Chacune est régulée par des acteurs spécifiques mais toutes font appel à une catégorie d'enzyme à savoir les caspases.

a) Les caspases

À ce jour, 18 caspases ont été identifiées chez les mammifères (Eckhart et al., 2008). Ces enzymes sont des protéases à cystéine exprimées sous forme inactives dans toutes les cellules.

Si la taille des caspases varie entre elles, leur structure est très conservée notamment au niveau de leur site catalytique. Elles sont exprimées dans les cellules sous la forme d'une

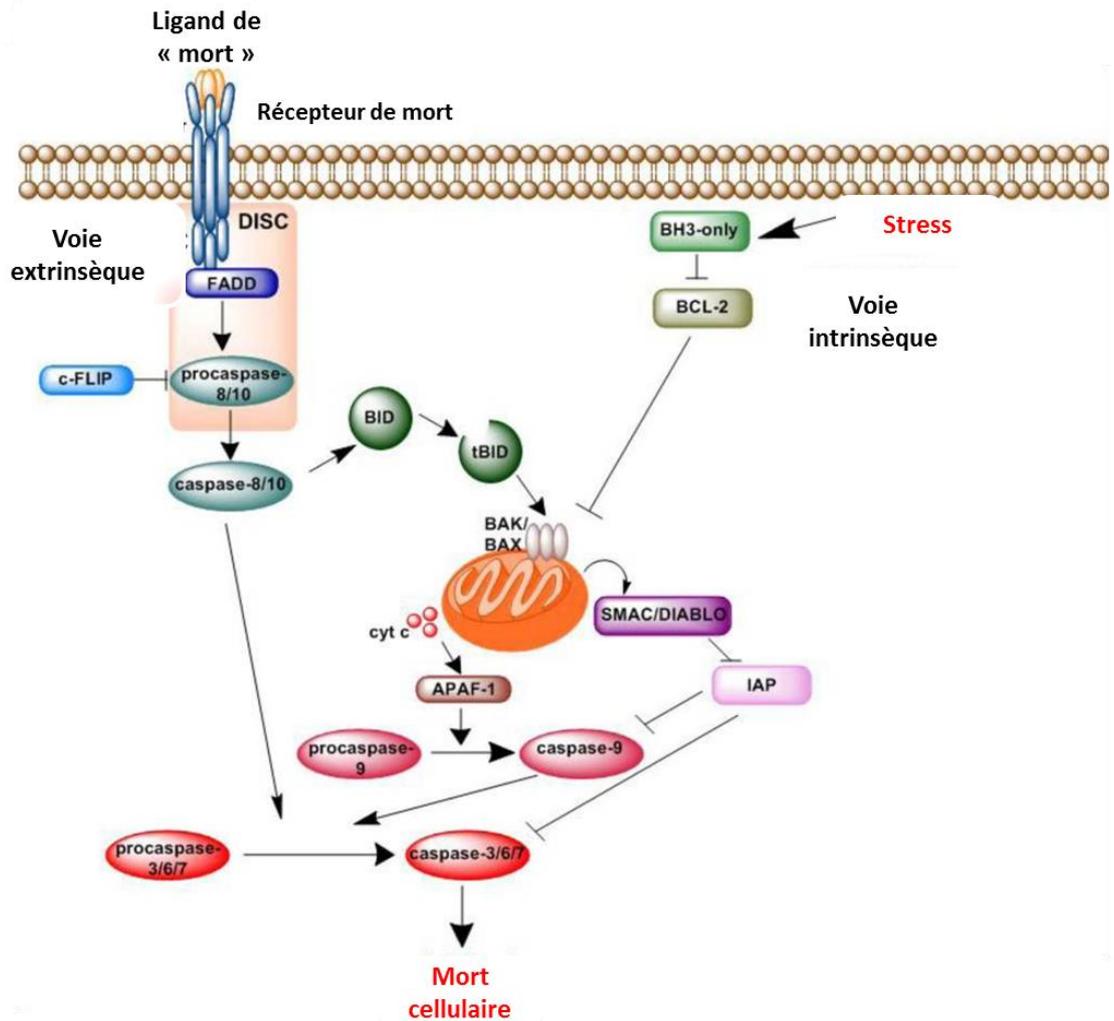


Figure 24 : Les voies d'apoptose intrinsèque et extrinsèque. (Gauche) La voie extrinsèque est activée par la liaison d'un ligand sur son récepteur de mort. Cette liaison permettra de recruter les protéines à domaine FADD et d'activer les caspases 8 et 10 afin d'activer les caspases effectrices. (Droite) La voie intrinsèque est activée suite à des signaux intracellulaires. Via une cascade d'activation de protéines, elle va conduire à la perméabilisation de la mitochondrie et à la libération de facteurs apoptotiques tels que SMAC/DIABLO et le cytochrome C. Ces facteurs permettront l'activation de la caspase 9 qui ira cliver les caspases effectrices pour permettre la mort de la cellule. La voie extrinsèque peut également passer par la voie intrinsèque via le clivage de la protéine BID par la caspase 8 et la perméabilisation de la mitochondrie. Schéma adapté de (Zaman et al., 2014).

proenzyme inactive constituée d'un domaine N-terminal très variable en longueur, puis de deux domaines qui constitueront les deux sous-unités de la protéine, la petite et la grande. Cette pro-enzyme va devoir être clivée afin de libérer les 2 sous-unités qui pourront alors s'associer afin de former un hétérodimère actif. La structure du domaine N-terminal va elle permettre de caractériser deux types de caspases : les caspases initiatrices et effectrices (Kumar, 2007) (Figure 23).

Les caspases initiatrices comme leur nom l'indique vont être les premières mobilisées à la suite d'un signal pro-apoptotique. Leur extrémité N-terminale renferme une structure appelée prodomaine. Ce prodomaine présente différentes sortes de domaines nécessaires à la transduction du signal grâce à des interactions avec d'autres protéines : le domaine CARD (caspase recruitment domain) qui permet la multimérisation ; et le domaine DED (Death effector domain) qui est capable de reconnaître ou de fixer des protéines adaptatrices afin de faciliter leur activation. Ces différents domaines vont participer à la cascade d'activation de différents acteurs afin de conduire à l'activation des caspases effectrices.

Les caspases effectrices vont, elles, mettre en place les différentes phases d'exécution de l'apoptose. Elles ne possèdent pas de prodomaine. De ce fait, leur régulation et activation se fait par clivage notamment via d'autres caspases. Les caspases effectrices peuvent aussi se cibler afin d'induire un rétrocontrôle positif sur l'induction de l'apoptose. Une fois active, elles vont médier les différentes phases de l'apoptose en dégradant certaines protéines pour conduire jusqu'à la formation des corps apoptotiques (cf. Chapitre Mécanismes de l'apoptose).

Si les caspases effectrices sont communes aux voies induisant l'apoptose, les caspases initiatrices peuvent être privilégiées dans une des voies. Ces différences permettent d'induire la cellule suite à des signaux externes ou internes donnant ainsi leur nom aux deux voies majeures : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque (Figure 24).

b) La voie extrinsèque

La voie extrinsèque induit l'apoptose suite à des signaux externes captés par la famille des récepteurs de mort. Cette famille de récepteurs transmembranaires possède au niveau de leur portion cytoplasmique un domaine de mort (DD death domain). En fixant leur ligand spécifique comme par exemple la cytokine TRAIL ou la protéine Fas-L, ces récepteurs vont conduire au recrutement sur leur domaine de mort de partenaires à domaine FADD (Fas associated death domain). Cette protéine adaptatrice pourra alors fixer la procaspase 8 ou 10 via son domaine DED ce qui conduira alors à son activation. Ces caspases vont participer à la

maturation des caspases effectrices comme la caspase 3 et ainsi induire l'apoptose de la cellule ciblée. Si la voie extrinsèque va conduire à la dégradation des protéines de la mitochondrie via les caspases effectrices, des auteurs ont montré que la caspase 8 pouvait agir sur celle-ci via la protéine BID (Li et al., 1998; Scaffidi et al., 1998). Lorsqu'elle est clivée par la caspase 8, cette protéine tronquée va induire la libération de facteurs proapoptotiques de la mitochondrie (cytochrome C SMAC1/DIABLO) et permettre la collaboration avec la voie intrinsèque pour induire l'apoptose (Katz et al., 2012; Li et al., 1998).

c) La voie intrinsèque

La voie intrinsèque est déclenchée suite à des signaux intracellulaires causés par divers stress comme l'absence de facteurs de croissance, l'hypoxie ou les carences en acides aminés. Ces signaux vont conduire à l'induction de l'apoptose via la modification de la perméabilité mitochondriale grâce aux protéines à domaine BH3. La mitochondrie va alors libérer dans le cytoplasme des protéines apoptotiques telles que SMAC1/DIABLO (Du et al., 2000) et le cytochrome C (Reed, 1997). SMAC1/DIABLO vont notamment participer à l'inhibition de protéines inhibitrices de l'apoptose telles que C-IAP1 (Du et al., 2000) et permettent la formation de l'apoptosome. Ce complexe contenant les protéines Apaf1 et le cytochrome C va participer à l'activation de la caspase 9. Cette dernière pourra alors cliver la procaspase 3 en caspase 3 active et permettre la suite de l'apoptose. La mitochondrie va également participer à d'autres étapes de l'apoptose via le relargage plus tardif des protéines AIF (apoptosis inducing factor) (Joza et al., 2001) et des endonucléases G (Li et al., 2001) qui sont impliquées dans la fragmentation de l'ADN nucléaire

La régulation de cette voie se fait majoritairement par les protéines de la famille Bcl-2. Ce groupe de plus de 25 gènes contient à la fois des gènes pro-apoptotiques (Bcl-10, Bax, Bak...) mais aussi des gènes anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-XL...) permettant alors de réguler l'apoptose à différents niveaux.

Que ce soit la voie intrinsèque ou la voie extrinsèque, il est communément admis que l'apoptose est irréversible notamment par l'activation des caspases effectrices. Ces caspases vont cibler différentes protéines afin de permettre l'avancée du processus apoptotique.

2. Mécanismes de l'apoptose

L'activation des différentes voies d'apoptoses va conduire au clivage et à l'activation des caspases effectrices, les caspases 3, 6 et 7. Ces caspases vont permettre l'activation

d'endonucléases (Sakahira et al., 1998) afin de dégrader le matériel nucléaire et des protéases pour dégrader des protéines du cytosquelette. Ces caspases peuvent également cibler certaines protéines comme la PARP (poly (ADP-ribose) polymérase), une protéine impliquée dans la réparation de l'ADN qui sera inhibée par son clivage par la caspase-3 (Lakhani et al., 2006) ou encore des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. Les protéines inhibitrices de l'apoptose comme Bcl-2 ou Bcl-XL sont également clivées par les caspases générant ainsi un rétrocontrôle positif sur l'induction de l'apoptose (Clem et al., 1998; Kirsch et al., 1999).

3. Apoptose et carence en acides aminés

Si les cellules sont capables de survivre à des carences de courtes durées en acides aminés en régulant les mécanismes d'autophagie, de transport des acides aminés ou de la synthèse protéique, une carence prolongée n'est pas viable (Martinet et al.; Núñez et al., 2006). La carence en un acide aminé indispensable tel la leucine induit le clivage de la caspase 3 dès 16h de carence dans des fibroblastes embryonnaires de souris (B'chir et al., 2014). Cette induction est notamment permise par l'expression du facteur de transcription ATF4 puis celle de CHOP qui participe à la régulation des facteurs pro-apoptotiques BIM et PUMA (Puthalakath et al., 2007; Wang et al., 2009b) (Galehdar et al., 2010). Ces facteurs vont agir via la voie intrinsèque en régulant la perméabilité mitochondriale et le relargage de cytochrome C (Kim et al., 2009). ATF4 régule d'autres facteurs proapoptotiques comme ATF3 et TRB3 (Ohoka et al., 2005; Weng et al., 2016). De plus, l'association d'ATF3 et ATF4 permet d'induire l'expression d'un autre facteur proapoptotique, NOXA (Wang et al., 2009b). ATF4 induit également l'expression de CHAC1 qui participe à la dégradation du glutathion et l'installation d'un stress oxydant (Crawford et al., 2015; Ronchi et al., 2010). Ces résultats sont notamment confortés par les travaux de Guoliang Qing *et al.* en 2012 qui ont montré qu'en cas de carence en glutamine, l'inhibition de l'expression de NOXA, PUMA et TRB3, augmentait la résistance de cellules cancéreuses à ce stress (Qing et al., 2012).

Si l'induction de l'apoptose lors de carences en acides aminés indispensables est bien établie, certaines cellules comme les cellules cancéreuses sont néanmoins capables de s'adapter à cette situation de stress. La carence en acides aminés peut survenir à cause d'une faible vascularisation de la tumeur et être accompagnée par des carences en glucose et en oxygène. Ces conditions de stress bien que néfastes, vont induire une pression de sélection sur les cellules et des cellules résistantes peuvent émerger. La recherche des mécanismes de résistance est importante dans le développement de stratégies anticancéreuses. Des mécanismes de résistance à la carence en glucose et à l'hypoxie ont déjà été caractérisés. Par

contre, les connaissances sur les mécanismes permettant l'adaptation des cellules à des carences prolongées en acides aminés sont moins bien déterminées. Notamment, malgré leur importance dans le métabolisme cellulaire, peu de données sont disponibles quant au rôle potentiel des voies mTORC1 et GCN2 à ces adaptations.

CHAPITRE III : Variation des apports en nutriments et en oxygène au niveau des tumeurs : Contexte favorable à l'émergence de cellules résistantes

I. Développement de carence au niveau tumoral

Les cancers sont les maladies causées par le développement d'une tumeur maligne au sein d'un organe. L'origine de cette tumeur est due à l'échappement d'une cellule des systèmes de contrôle de la prolifération et de la mort cellulaire causée par des mutations génétiques. Cette cellule va se multiplier de manière anarchique jusqu'au développement d'une tumeur perturbant la physiologie de l'organe où elle s'est développée. La progression et l'agressivité tumorales sont étroitement associées à un métabolisme cellulaire exacerbé. Un fort apport en nutriments et en oxygène sont alors nécessaires pour soutenir ce métabolisme singulier de la tumeur.

La vascularisation de la tumeur est la principale voie d'apports de nutriments nécessaires à sa croissance et son niveau de vascularisation va conditionner son niveau de croissance. En effet, une faible vascularisation ou une trop grande distance séparant une région tumorale des vaisseaux sanguins vont alors générer des zones carencées en nutriments et hypoxiées au sein de la tumeur. Selon l'intensité de la carence, les cellules de ces régions présenteront soit un niveau de prolifération réduite ou totalement inhibé, soit l'induction des mécanismes de mort cellulaire.

Pour autant, cette faible vascularisation n'est pas définitive pour la tumeur. En effet, des voies de signalisation sensibles à ces conditions de carence vont permettre d'induire l'expression de facteurs proangiogéniques comme le facteur de croissance VEGFA (Mécanisme décrit dans le chapitre), le principal membre de la famille VEGF, (vascular endothelial growth factor) (Potente et al., 2011). L'expression de ce facteur va stimuler l'angiogenèse en direction des zones carencées. Cette augmentation de la vascularisation accroît alors d'une part l'apport en nutriments à la tumeur mais également le risque de dissémination métastatique.

Certaines stratégies anti-tumorales consistent à inhiber l'angiogenèse tumorale afin de soumettre la tumeur à des carences en nutriments et à des conditions hypoxiques, conditions connues pour induire la mort des cellules. C'est notamment le cas de l'Avastin[®], un anticorps monoclonal inhibant la fixation du VEGFA sur ses récepteurs. Cependant, des tumeurs comme celles du pancréas se développent malgré une faible vascularisation diminuant

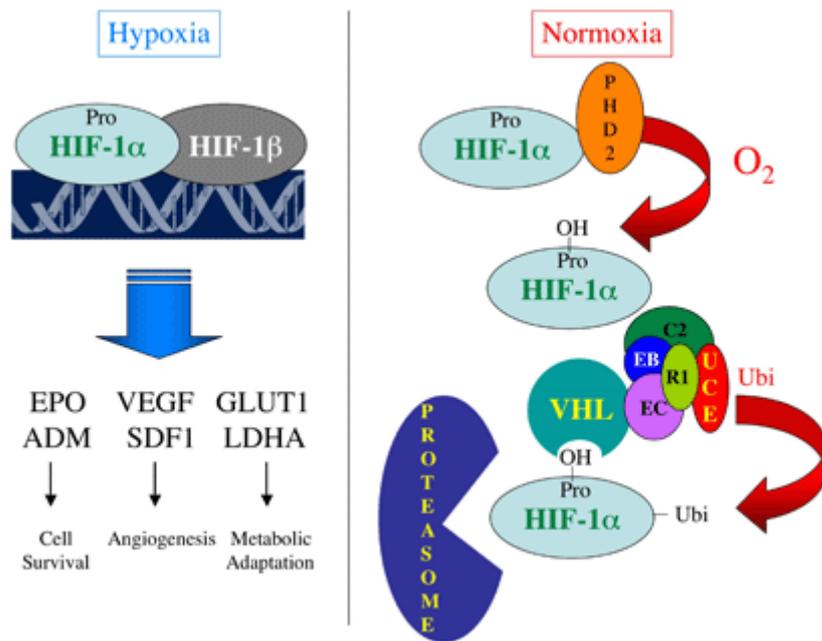


Figure 25 : Régulation d'HIF-1 α en situation hypoxique ou normoxique. (Droite) En condition normoxique, HIF-1 α est hydroxylé par PHD2 via une réaction nécessitant de l'O₂ et liant VHL (Von Hippel–Lindau Tumor suppressor). VHL recrute un complexe ubiquitin ligase comprenant les protéines elongin C (EC), elongin B (EB), cullin 2 (C2), ring box protein 1 (R1) ainsi qu'une ubiquitin conjugating enzyme (UCE). L'ubiquitination d'HIF-1 α conduira à sa dégradation par le protéasome. **(Gauche)** En hypoxie, PHD2 est inhibée ce qui permet à HIF-1 α d'être accumulée dans la cellule et de se dimériser avec HIF-1 β formant ainsi le facteur HIF-1 actif. Celui pourra lier l'ADN et activer la transcription de ses gènes cibles. Les protéines produites par ces gènes joueront un rôle crucial dans la réponse physiologique à l'hypoxie.

l'efficacité de ces stratégies anticancéreuses (Casanovas et al., 2005; Giatromanolaki and Harris, 2001). Cette faible efficacité est d'une part due à la redondance de acteurs angiogéniques comme EGF ou IGF-1 (Korc, 2003). D'autre part, le maintien de cellules dans des conditions carencées peut potentiellement conduire à l'émergence de cellules résistantes. Des mécanismes d'adaptation des cellules cancéreuses à l'hypoxie et à la carence en glucose ont déjà été caractérisés (Akakura et al., 2001; Wu et al., 2012). En revanche, il existe moins de données concernant les mécanismes d'adaptation des cellules tumorales face aux carences en lipides ou en acides aminés. Dans le contexte de la carence en acides aminés, la mise en place de mécanismes de résistance est d'autant plus importante que neuf d'entre eux ne peuvent pas être synthétisés de novo.

II. HIF-1 et résistance à l'hypoxie

En règle générale, l'hypoxie conduit tout d'abord à un arrêt du cycle cellulaire avant d'éventuellement induire les mécanismes de mort cellulaire. Cependant, cette situation de stress peut avoir pour effet d'imposer une pression de sélection conduisant à la génération de cellules résistantes à l'hypoxie. Différentes stratégies peuvent être menées par les cellules afin de faire face à cette situation de stress comme induire l'angiogenèse ou encore inhiber l'apoptose. Il a été découvert que la majorité de ces adaptations se faisait via le facteur de transcription HIF-1, un facteur régulé par de nombreux suppresseurs de tumeurs (Chen et al., 2003; Mole et al., 2001; Semenza, 2003). Suite à des mutations touchant ces suppresseurs ou des gènes codant pour les sous-unités d'HIF-1, celui-ci peut alors être retrouvé surexprimé dans les zones hypoxiques de la tumeur, ce qui est communément associé à de mauvais pronostics vitaux (Akakura et al., 2001; Chen et al., 2014; Generali et al., 2006).

A. Régulation d'HIF-1

HIF est une famille de facteur de transcription dont le représentant majeur est HIF-1. HIF-1 est formée de 2 sous-unités : HIF-1 α et HIF-1 β . En condition normoxique, HIF-1 α est fortement instable et rapidement dégradée par le protéasome (Salceda and Caro, 1997). Cette dégradation fait intervenir l'enzyme PHD2 qui hydroxyle HIF-1 α . Cette forme sera ensuite reconnue par la protéine suppresseur de tumeur VHL (Von Hippel-Lindau) qui recrutera un complexe qui ubiquitinera HIF-1 α . HIF-1 α sera alors prise en charge par le protéasome pour être dégradée. (FIGURE 25). En hypoxie, l'activité de PHD2 est inhibée, ce qui inhibera cette voie de dégradation d'HIF-1 α . Elle peut alors s'associer au facteur HIF-1 β formant ainsi le complexe actif HIF-1. Ce complexe va pouvoir alors se fixer sur les éléments de réponse à

l'hypoxie (HRE) et réguler l'expression de près de 70 gènes.

B. Mécanismes régulés par HIF-1 participant à la résistance à l'hypoxie

Lors d'hypoxie, HIF-1 va se fixer sur les éléments de réponse à l'hypoxie ou HRE présents dans de nombreux gènes et faciliter leur transcription. Plusieurs de ces gènes ont été caractérisés pour exprimer des protéines favorisant la survie des cellules cancéreuses lors d'hypoxie. C'est le cas de VEGFA qui participe à la régulation de l'angiogenèse vers les régions hypoxiques de la tumeur (Forsythe et al., 1996; Levy et al., 1995). Plusieurs gènes sont impliqués dans la modification du métabolisme énergétique (GLUT-1, GLUT-3, pyruvate déshydrogénase kinase...) (Ebert et al., 1995; Kim et al., 2006; O'Rourke et al., 1996) ou encore dans la survie et la prolifération (p21) (Carmeliet et al., 1998).

HIF-1 impacte également l'expression de la carbonic anhydrase IX (CAIX). Cette enzyme catalyse l'hydratation du dioxyde de carbone et va participer à la régulation du pH afin de contrecarrer l'acidose du microenvironnement tumoral (Chiche et al., 2009). L'expression de cette protéine dans les zones hypoxiques de la tumeur est un marqueur de mauvais pronostic et de radiorésistance (Koukourakis et al., 2006). Ludwig Dubois *et al.* en 2011 ont montré que l'inhibition spécifique de CAIX augmenterait les effets anticancéreux des traitements par irradiation (Dubois et al., 2011).

L'expression d'HIF1- α est le principal mécanisme de résistance des cellules cancéreuses à l'hypoxie mais également de résistance à certaines drogues. C'est pourquoi de nombreux auteurs se penchent sur le développement d'inhibiteur d'HIF-1 afin de resensibiliser la tumeur aux effets néfastes de l'hypoxie (Onnis et al., 2009; Semenza, 2003). Toutefois, certaines tumeurs ont été caractérisées comme étant résistantes à l'hypoxie indépendamment de l'expression d'HIF-1 (Adamski et al., 2013; Doktorova et al., 2015). Si les mécanismes de résistance n'ont pas été identifiés, d'autres protéines sont également connues pour être exprimées lors d'hypoxie.

C. Autres mécanismes régulés lors d'hypoxie

HIF-1 n'est pas la seule protéine régulée par l'hypoxie. En effet, le facteur ATF4 voit sa traduction augmentée lors d'hypoxie via la phosphorylation d'eIF2 α par la kinase PERK (Bi et al., 2005). L'inhibition de la synthèse protéique par la phosphorylation d'eIF2 α participe à l'adaptation des cellules à l'hypoxie. De même, l'expression d'ATF4 a été associée à la

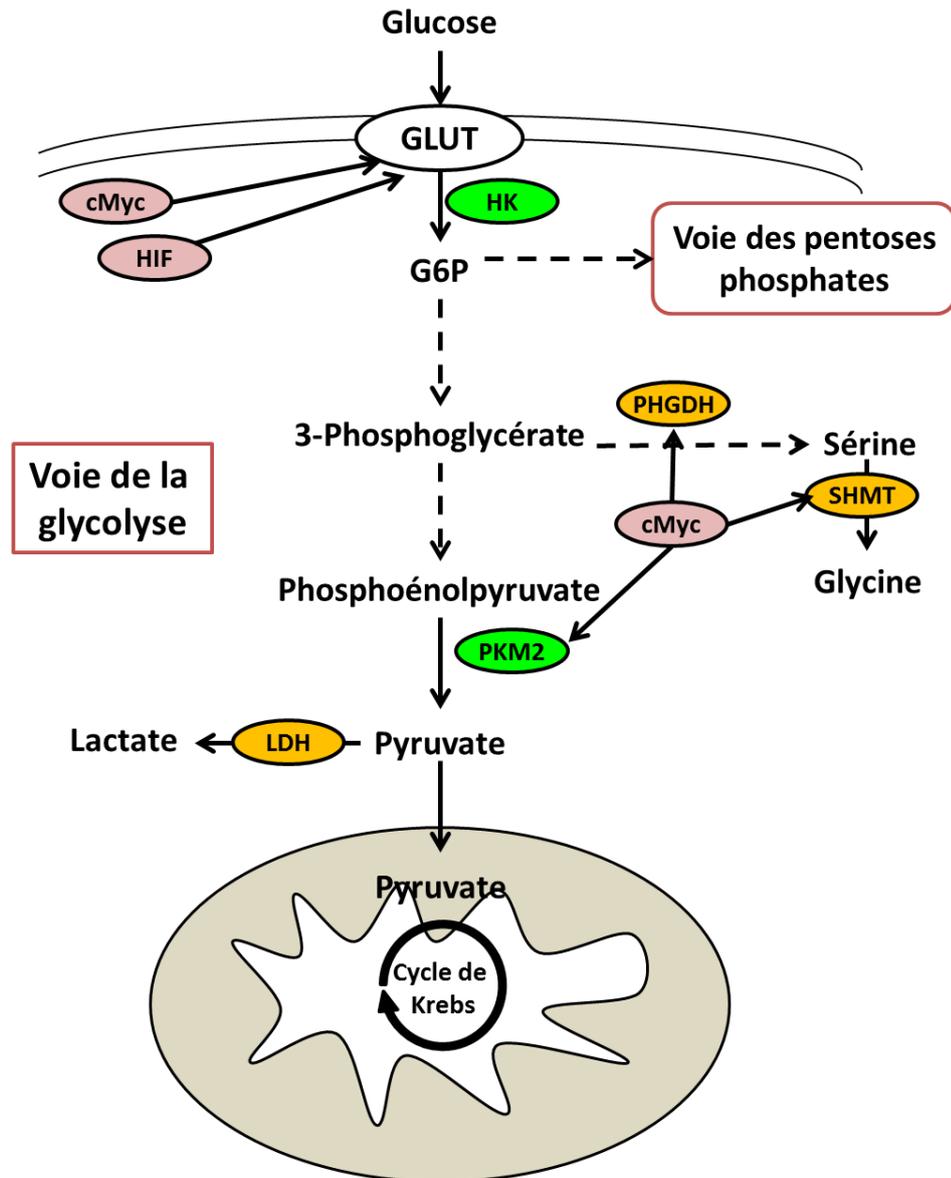


Figure 26 : Schéma simplifié de la régulation du métabolisme du glucose dans les cellules cancéreuses. Le glucose pénètre dans la cellule via les transporteurs de glucose (GLUT) afin d'être utilisé par la cellule dans la voie de la glycolyse et donner du pyruvate. La vitesse d'entrée du glucose par GLUT de même que sa vitesse de dégradation par l'hexokinase (HK) et la pyruvate kinase isozyme de type 2 (PKM2) font partis des étapes limitantes de la glycolyse (cercle vert). Des métabolites de la glycolyse peuvent être détournés pour d'autres voies telles que la voie des pentoses phosphates (synthèse des riboses des nucléotides) et la voie de synthèse de la sérine et de la glycine. Le pyruvate pourra ensuite soit être converti en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) lors de la glycolyse anaérobie ou être pris en charge par le cycle de Krebs dans la mitochondrie. Plusieurs des acteurs peuvent voir leur expression perturbée dans les cellules cancéreuses. En dehors de mutations directes des acteurs, ces modifications peuvent être dues à des mutations touchant les oncogènes les régulant comme HIF et c-MYC (Cercle rouge). Schéma tiré de **(Li and Zhang, 2015)**

régulation de l'autophagie et à l'adaptation de cellules cancéreuses à l'hypoxie (Fels and Koumenis, 2006; Rzymiski et al., 2009). Contrairement au rôle en faveur de la survie d'HIF-1 α , ATF4 peut également participer à la régulation de gènes pro-apoptotiques comme NOXA et PUMA (Pike et al., 2012). Ces deux effets opposés compliquent le traitement de cellules résistantes à l'hypoxie en ciblant ATF4.

III. Adaptation des cellules cancéreuses à la carence en glucose

Le glucose est la principale source énergétique pour la cellule de par son implication dans de nombreux processus tels que la glycolyse ; la voie des pentoses phosphates permettant la synthèse des riboses nécessaires aux acides nucléotidiques ; la voie de synthèse de la sérine ; le cycle de Krebs dans la mitochondrie et la lipogenèse (Figure 26). De plus, le glucose est également utilisé par la cellule dans les phénomènes de glycosylation de certains lipides et protéines, une modification souvent nécessaire pour leurs assurer leurs fonctions physiologiques. Ayant un impact sur de nombreuses voies métaboliques, la carence en glucose doit être rapidement résolue afin de ne pas induire des mécanismes d'apoptose (Andreev et al., 2015; Cadena et al., 2013; Cui et al., 2007; Graham et al., 2012; León-Annicchiarico et al., 2015).

Afin de faire face à une carence en glucose, plusieurs stratégies peuvent être mises en place par la tumeur : augmenter les apports en glucose à la cellule via l'augmentation de l'angiogenèse (Nishimoto et al., 2014) ou l'expression de transporteur de glucose (Boado and Pardridge, 2002); synthétiser du glucose à partir de molécules glucoformatrices (acides aminés, lactate) ; ou encore moduler l'activité des enzymes des voies du métabolisme du glucose. L'utilisation du glucose par les cellules cancéreuses est une des modifications du métabolisme tumoral qui est le plus étudié. Dans ce paragraphe, nous nous concentrerons sur certains aspects de la carence en glucose.

A. Régulation de l'entrée du glucose dans la cellule

Le premier niveau de régulation de l'utilisation du glucose dans la cellule est retrouvé au niveau de la bicouche lipidique des cellules car le glucose ne peut diffuser à travers la membrane. Afin d'y parvenir, les gènes de la famille SLC2 (solute carrier family 2) codent pour des transporteurs nommés GLUT permettant le transport facilité de glucose dans la cellule (Mueckler and Thorens, 2013). L'expression de ces transporteurs, qui peuvent être spécifiques d'un tissu donné, est notamment régulée par des oncogènes. C'est le cas de GLUT1, le premier membre caractérisé de cette famille (Mueckler et al., 1985), qui est

régulé par HIF-1 α (Chen et al., 2001) (Cf. chapitre précédent) ou par l'oncogène c-Myc (Osthus et al., 2000). GLUT1 est retrouvé surexprimé dans de nombreuses tumeurs favorisant ainsi l'entrée de glucose et la glycolyse (Boado and Pardridge, 2002; Yun et al., 2009) et son expression a également été corrélée à de faible pronostic de survie (Pinheiro et al., 2011; Saigusa et al., 2012).

B. Carence en glucose et stress du réticulum endoplasmique

La carence en glucose pourra également induire l'apparition d'un stress au niveau du réticulum endoplasmique (Cadena et al., 2013). Le réticulum est le siège de la glycosylation de certaines protéines qui est nécessaire à leur bonne conformation ou leur transport extracellulaire. La diminution de la glycosylation va conduire à l'accumulation de protéines malformées et à l'activation de la kinase PERK et de la voie ISR (Muaddi et al., 2010). La phosphorylation d'eIF2 α par PERK va mener à l'inhibition de la synthèse protéique ralentissant ainsi la glycosylation des protéines afin d'épargner du glucose et donc de l'énergie à la cellule. Elle permet également l'expression d'ATF4 qui peut induire d'une part l'expression de VEGFA afin de favoriser l'angiogenèse et l'apport en glucose (Terashima et al., 2013; Wang et al., 2013). D'autre part, ATF4 régule la transcription de Grp78, un gène codant pour une protéine chaperonne qui participe au repliement des protéines (Luo et al., 2003). Plusieurs études ont montré que l'inhibition de Grp78 sensibilisait à nouveau certaines lignées tumorales aux effets délétères de la carence en glucose (Matsumura et al., 2014; Wang et al., 2009a)

C. Utilisation du lactate comme molécule glucoformatrice

L'autre adaptation possible est l'utilisation par la cellule tumorale d'autres molécules glucoformatrices comme le lactate (Wu et al., 2012). Le lactate est un produit de la catalyse du pyruvate par la lactate déshydrogénase (LDH) en condition anaérobie. Il peut aussi être à nouveau converti en pyruvate grâce à la LDH qui catalyse également la réaction inverse (Juel and Halestrap, 1999). Le pyruvate pourra alors être à nouveau utilisé par les cellules dans le cycle de Krebs et dans la néoglucogenèse pour alimenter la cellule. La LDH est l'enzyme clé d'utilisation du lactate dans la cellule. Une augmentation de son expression est fréquemment retrouvée dans des cellules cancéreuses notamment glycolytiques (Koukourakis et al., 2003; Otto et al., 2015). La LDH étant un des mécanismes de résistance à la carence en glucose, de nombreux travaux se concentrent à cibler cette enzyme afin de resensibiliser aux effets apoptotiques de la carence en glucose (Doherty and Cleveland, 2013).

IV. Métabolisme lipidique

Doubler sa biomasse est un prérequis pour les cellules afin de pouvoir se diviser rapidement. En dehors des protéines, l'augmentation de la quantité de lipides est également indispensable pour créer les membranes de la nouvelle cellule. Il est clairement établi que le métabolisme lipidique joue un rôle crucial dans la tumorigenèse. La surexpression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme lipidiques a été associée à l'agressivité de nombreux cancers (Swierczynski et al., 2014). Le métabolisme lipidique contribue à de nombreux aspects du fonctionnement de la cellule tumorale, de ce fait il est la cible de nombreuses stratégies antitumorales. En particulier, plusieurs traitements visent à altérer le métabolisme du cholestérol afin d'entraîner l'apoptose de cellules tumorales via l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique (Carracedo et al., 2006; LaPensee et al., 2016; Sbiera et al., 2015)

En revanche, il existe moins de données concernant la résistance proprement dite des cellules tumorales à la carence en lipide. Cette notion est relativement complexe à appréhender du fait que la très grande majorité des lipides peut être synthétisée *de novo*. Cette dernière peut se faire grâce aux lipides exogènes ou par la production de citrate par l'entrée de glucose et de la glutamine via le cycle de Krebs (Beloribi-Djefafli et al., 2016). Toutefois, des auteurs ont montré que leur absence pouvait être critique lorsqu'elle était associée à certaines conditions de stress. Regina M. Young *et al* en 2013 ont notamment montré que les tumeurs présentant des mutations pour TSC2 devenaient dépendantes de l'apport exogène de lipides en cas d'hypoxie (Young et al., 2013).

V. Importance du métabolisme des acides aminés dans le contexte tumoral

Depuis quelques années, il existe un regain d'intérêt pour l'implication des acides aminés dans la croissance tumorale. Cet intérêt est porté d'une part par l'existence d'acides aminés indispensables pour la survie des cellules. D'autre part, de nombreux acides aminés non indispensables sont impliqués dans des voies métaboliques importantes pour la croissance cellulaire. Dès lors, une modification des apports en acides aminés pourra avoir des conséquences néfastes pour les cellules tumorales. Des auteurs tentent d'utiliser cette caractéristique pour développer de nouvelles stratégies anticancéreuses. Ces stratégies peuvent cibler un acide aminé particulier et certaines voies métaboliques. D'autres ciblent plus précisément les mécanismes d'apport en acides aminés.

A. Utilisation spécifique de certains acides aminés par la tumeur

1. Utilisation de l'asparagine

Depuis de nombreuses années, la dégradation de l'asparagine par la L-asparaginase en combinaison de radiothérapie est utilisée comme traitement anticancéreux des leucémies aiguës (Ertel et al., 1979). La sensibilité de ces tumeurs à ce type de traitement est due à la faible expression d'Asns (Asparagine synthétase), une enzyme clé de la synthèse d'asparagine à partir de glutamine (Li et al., 2006). Asns fait partie des gènes dont la transcription est régulé par ATF4 (Bruhat et al., 2002; Levintow, 1957). Ye *et al* en 2010 ont montré que l'inhibition d'ATF4 ou de GCN2 et par conséquent, celle d'ASNS réduisait fortement la croissance tumorale (Ye et al., 2010). Ils ont également observé que l'expression exogène d'ASNS restaure la croissance des tumeurs confirmant l'importance de la voie GCN2-ATF4-ASNS dans la survie des tumeurs.

Le niveau d'expression d'ASNS peut également avoir un impact dans d'autres situations. Zhang *et al* en 2014 ont observé que les effets apoptotiques de la carence en glutamine pouvaient être compensés par l'expression d'ASNS ou l'ajout d'asparagine aux cellules (Zhang et al., 2014). Ils ont pu associer le niveau d'expression d'ASNS à différents stades de gliomes ce que d'autres avaient également observés dans des cancers gastriques (Yu et al., 2016). Cibler ASNS et la synthèse d'asparagine semblent prometteur dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. D'autres auteurs se concentrent plus particulièrement sur la glutamine dont la présence est indispensable à la synthèse d'asparagine mais également à de nombreuses autres voies métaboliques.

2. Utilisation de la glutamine

La glutamine est l'acide aminé le plus représenté dans le corps humain (Bergström et al., 1974). Cet acide aminé est impliqué dans de nombreux processus anaboliques nécessaires à la croissance cellulaire comme la synthèse des nucléotides, des acides aminés ou encore des lipides. La glutamine est indispensable aux cellules à fort taux de prolifération comme certaines cellules tumorales afin de maintenir l'apport à la cellule de ces substrats nécessaires à la croissance.

Comme indiquée dans le chapitre I, la glutamine peut être utilisée comme substrat énergétique pour la cellule. Cette voie est particulièrement utilisée par les tumeurs pour subvenir à leurs forts besoins énergétiques et peut conduire au développement d'une addiction des cellules cancéreuses à cet acide aminé pour survivre (Wise and Thompson, 2010). Ces

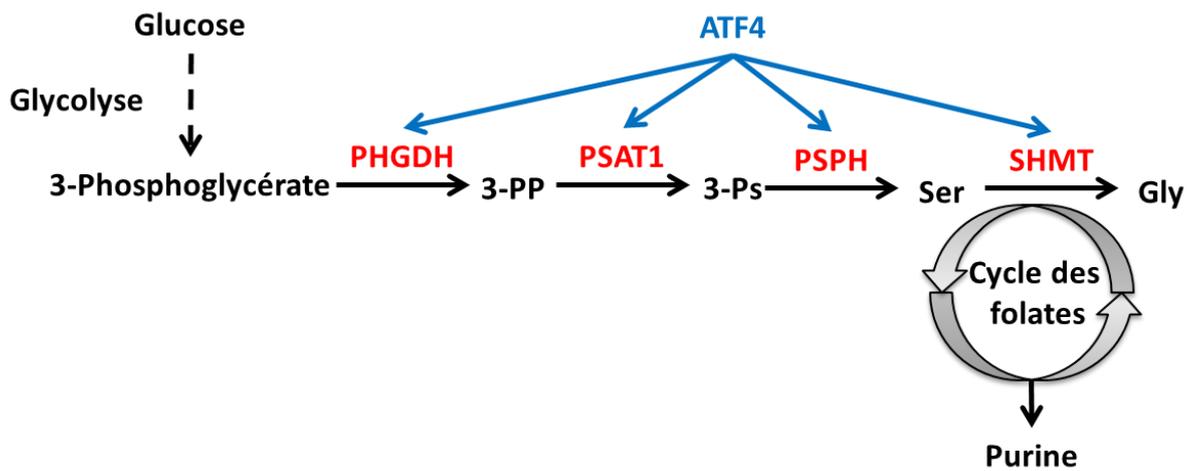


Figure 27 : La synthèse de la sérine et de la glycine. Cette synthèse se fait en détournant le phosphoglycérate produit par la glycolyse par l'enzyme PHGDH. Les différents enzymes impliqués dans cette voie sont indiqués en rouge. Le facteur de transcription ATF4 participe à régulation de toutes ces enzymes. 3-PG : 3 phosphoglycérate. 3-PP : 3-phosphohydroxypyruvate. 3-PS : 3-phosphosérine. Ser : Sérine. Gly : Glycine; GSH : glutathion. Cys : Cystéine. Schéma adapté de (DeNicola et al., 2015)

addictions sont notamment dues à des modifications de l'expression du proto-oncogène c-MYC qui régulent certains facteurs clés du métabolisme de la glutamine. L'expression de ce facteur de transcription influence notamment l'expression de la glutaminase (GLS). Cette enzyme convertit la glutamine en glutamate qui sera à son tour converti par GLUD1 en α -cétoglutarate afin d'être pris en charge par le cycle de Krebs pour fournir de l'énergie à la cellule (Zhdanov et al., 2014).

Les fortes concentrations de glutamine dans la cellule favorisent également l'activité de la voie mTORC1 et par conséquent, les mécanismes de croissance cellulaire. Les transporteurs de glutamine SLC1A5 (ASCT2) et SLC7A5 (LAT1) (van Geldermalsen et al., 2016; Hayashi et al., 2012) sont particulièrement importants pour permettre cette régulation via un mécanisme qui sera décrit dans le chapitre *Transport des acides aminés*.

Priver la cellule cancéreuse de glutamine peut conduire à l'induction des mécanismes d'apoptose via l'expression d'ATF4 et de ses gènes cibles pro-apoptotiques PUMA et NOXA (Qing et al., 2012). Cette caractéristique a également été utilisée afin de développer de nouvelles thérapies anticancéreuses (Wise and Thompson, 2010). Cependant, certaines tumeurs comme les glioblastomes ne sont pas sensibles à ces thérapies. Dans ces tumeurs, la glutamine est utilisée de manière préférentielle pour la synthèse des purines plutôt que pour le cycle de Krebs et la fourniture d'énergie, réduisant alors l'impact de ces stratégies (Tardito et al., 2015).

3. Utilisation de la sérine et de la glycine

Sérine et glycine ne sont pas des acides aminés indispensables mais leur disponibilité pour la tumeur va jouer un rôle important sur son métabolisme. En effet, ils interviennent dans le métabolisme des monocarbonés, un ensemble de voies métaboliques permettant de transférer carbone et groupement méthyl nécessaires à d'autres voies comme la méthylation de l'ADN, la synthèse des purines et des lipides ou encore à la maintenance du statut rédox via la méthionine (Locasale, 2013).

a) Synthèse de la sérine et de la glycine

La synthèse *de novo* de la sérine passe par la voie de la phosphoglycérate déshydrogénase (PHGDH) (Figure 27). Cette voie du nom de son enzyme détourne le 3-phosphoglycérate produit lors de la glycolyse pour donner un des substrats de la synthèse de la sérine. À la suite de la synthèse de la sérine, celle-ci pourra être prise en charge par l'enzyme serine-hydroxyméthyltransférase (SHMT).

SHMT permet la conversion réversible de la sérine en glycine et le transfert d'un groupement méthyl sur le tetrahydrofolate utilisé pour la synthèse des purines. Deux isoformes de cette enzyme existent, l'enzyme SHMT1 cytosolique et l'isoforme SHMT2 retrouvée au niveau de la mitochondrie (Garrow et al., 1993) et sont tous deux régulés par l'oncogène c-MYC (Nikiforov et al., 2002). Si ces isoformes ont récemment été caractérisées pour avoir une activité redondante (Anderson and Stover, 2009), des modifications de l'une ou de l'autres ont été caractérisées dans certains modèles cancéreux (Kim et al., 2015a; Paone et al., 2014; Wang et al., 2015b; Woo et al., 2014). Les niveaux d'expression et d'activité de PHGDH et SHMT sont fréquemment modifiés dans certains types de cancers et associés à un mauvais pronostic vital.

b) SHMT et PHGDH dans le contexte tumoral

Dans les tumeurs, la glycolyse est utilisée majoritairement pour les apports en énergies des cellules mais dans certaines, 10% du 3-phosphoglycérate qui est produit est détourné par la cellule afin de soutenir les mécanismes précédemment cités (Locasale et al., 2011). Ce détournement est notamment permis par l'amplification du gène codant pour la PHGDH dans les mélanomes (Mullarky et al., 2011) et les cancers colorectaux (Jia et al., 2016) et permettrait également la résistance des cellules à des carences en sérine (Ou et al., 2014). Les inhibiteurs de l'activité de cette enzyme n'ont été développés que très récemment mais ont montré des résultats intéressants sur certaines cellules cancéreuses (Mullarky et al., 2016; Pacold et al., 2016). Plutôt que cibler ces enzymes, Kung *et al* en 2012 ont montré qu'en cas de carence en sérine, l'activation de la kinase PKM2 (une enzyme de la glycolyse) pouvait empêcher le détournement du 3-phosphoglycérate inhibant ainsi la synthèse de sérine et réduisant la prolifération cellulaire (Kung et al., 2012).

c) Adaptation des cellules à la carence en sérine

Si la carence en glycine n'inhibe pas la prolifération cellulaire (Tang et al., 2015), celle en sérine peut conduire à l'apoptose des cellules. En 2012, Yang Ou *et al* ont montré que la répression de PHGDH par P53 serait déterminante dans la réponse apoptotique des cellules tumorales carencées en sérine (Ou et al., 2014). Ces auteurs ont montré qu'en surexprimant PHGDH ou lorsque p53 n'est pas exprimé, les cellules cancéreuses étaient plus résistantes à la carence en sérine.

Le facteur ATF4 est également exprimé lors de carence en sérine et participe à la régulation de plusieurs enzymes impliquées dans la biosynthèse de la sérine dont PHGDH

et SHMT2 (DeNicola et al., 2015; Ye et al., 2012). Cette régulation serait dépendante de l'expression de l'histone déméthylase KDM4C, une enzyme fortement exprimée dans les cancers (Berry and Janknecht, 2013) dont l'inhibition réduirait la transcription d'Atf4 (Zhao et al., 2016).

De nombreuses études tentent de cibler le métabolisme de la sérine dans les tumeurs mais aussi, de limiter les apports en glycine et sérine pour amplifier les effets des traitements. Cette stratégie a déjà montré des résultats prometteurs *in vitro* (Li et al., 2016) mais qui doivent être confirmés au niveau clinique (Bental and Deutsch, 1993).

B. Utilisation des autres sources d'acides aminés

Si certains acides aminés sont utilisés de manière spécifique dans le métabolisme tumoral, l'hypovascularisation de la tumeur a pour conséquence de diminuer la disponibilité de l'ensemble des acides aminés. Comme décrit dans le chapitre II, l'inhibition de la synthèse protéique via la régulation des voies mTORC1 et GCN2 permet à la cellule d'épargner des acides aminés et de ralentir son métabolisme.

En cas de carence, la synthèse *de novo* ne permet d'apporter à la cellule que certains acides aminés. Pour tous les autres et notamment les indispensables, les cellules tumorales doivent développer des mécanismes afin de subvenir à leur besoin et éviter les effets néfastes de la carence. Ces mécanismes se basent soit sur une augmentation des apports à la tumeur par l'angiogenèse soit sur une meilleure utilisation des éléments extracellulaires via l'expression de transporteur ou l'induction de la macropinocytose.

1. Angiogenèse

L'angiogenèse est nécessaire pour la création et la maintenance des réseaux sanguins permettant la diffusion des nutriments à l'ensemble des cellules. Ce mécanisme est également nécessaire à l'expansion des vaisseaux en direction de zones carencées en nutriments et en oxygène (Beck and Plate, 2009). Cette stimulation est notamment rendue possible par l'expression dans ces zones stressées des facteurs de croissance de la famille VEGF et notamment VEGFA, le premier facteur de cette famille cloné en 1989 (Holmes and Zachary, 2005; Keck et al., 1989).

VEGFA doit son importance dans les études sur l'angiogenèse tumoral par son expression inductible par différents stress. Comme décrits dans le chapitre II-B, l'hypoxie et la carence en glucose sont toutes deux capables d'induire l'expression d'HIF1 qui pourra alors se

fixer sur l'élément de réponse à l'hypoxie HRE présent dans le promoteur de Vegfa (Forsythe et al., 1996; Levy et al., 1995; Liu et al., 1995; Nishimoto et al., 2014) pour participer à la survie des cellules. Ces stress induisent également l'expression d'ATF4 (Rzymiski et al., 2010; Wang et al., 2012). Ce facteur va participer à la régulation de Vegfa grâce à la présence dans son gène de plusieurs éléments de réponse aux acides aminés AARE permettant la fixation d'ATF4 (Abcouwer et al., 2002; Roybal et al., 2005).

De ces deux facteurs, seul ATF4 semble être en mesure de réguler Vegfa lors de carence en acides aminés. En effet, HIF1- α ne s'accumule pas suite à une carence en acides aminés et le facteur de transcription HIF1 ne peut être stabilisé (Durán et al., 2013). Yugang Wang *et al* en 2013 ont montré que le knockdown de GCN2 dans des xénogreffes de tumeurs diminuait fortement leur vascularisation (Wang et al., 2013). Cette diminution est due à la sous-expression d'ATF4 et donc de VEGFA montrant ainsi l'importance de la voie GCN2-ATF4 dans la vascularisation de la tumeur.

2. Transport des acides aminés

Comme décrits dans le paragraphe I-C-2, les acides aminés pénètrent dans la cellule à l'aide de transporteurs, chacun présentant des spécificités pour certains groupes d'acides aminés et pouvant même être augmentés lors de carence en acides aminés grâce au facteur ATF4 (ex. SNAT2 ou CAT-1 (Gjymishka et al., 2008; Hyatt et al., 1997)). Des transporteurs comme LAT1 sont bien décrits pour participer via le transport de certains acides aminés à la régulation de voie métabolique comme mTORC1. Néanmoins, de plus en plus d'études associent leur expression au développement tumoral. Parmi les plus connus, on retrouve les transporteurs LAT1, ASCT2 et xCT.

a) LAT1

LAT1 est un antitransporteur d'acides aminés neutres qui n'est normalement exprimé que dans certains tissus (placenta, cerveau, rate, colon et testicule notamment) (Kanai et al., 1998; Napolitano et al., 2015). Ce transporteur est associé à la protéine chaperonne CD98. Cette association stabilise LAT1 et permet sa localisation au niveau des membranes plasmiques (Kaira et al., 2008). LAT1 est fréquemment retrouvé surexprimé dans de nombreuses tumeurs telles que les glioblastomes et les lymphomes ainsi que leurs métastases (Kaira et al., 2008; Yanagida et al., 2001). Son expression est importante pour la croissance tumorale comme l'ont montrée de nombreux auteurs via des études de sous-expression ou par traitement pharmacologique (Cormerais et al., 2016; Ohshima et al., 2016).

b) ASCT2

ASCT2 est le second transporteur qui est également surexprimé dans de nombreux cancers (Shimizu et al., 2014; Toyoda et al., 2014). L'importance de ce transporteur dans le métabolisme tumoral est représentée principalement par sa capacité de transport de glutamine (Collins et al., 1998), acide aminé important pour la croissance de nombreux types de tumeurs (Cf. chapitre 3-E-2). L'entrée de glutamine par ASCT2 va avoir un impact sur LAT1. En effet, LAT1 fait sortir la glutamine de la cellule pour permettre l'entrée d'autres acides aminés dont la leucine. Cette collaboration favorise ainsi le contrôle de la concentration en acides aminés intracellulaires (Fuchs and Bode, 2005) et par conséquent, participe à la régulation de la voie mTORC1. Cibler le transport de glutamine en ciblant directement ASCT2, est une stratégie que développent certains auteurs et dont les premiers résultats *in vitro* présentent des résultats encourageants (Chen and Cui, 2015; Ren et al., 2015; Schulte et al., 2016; Wang et al., 2014b, 2015a; Xu et al., 2015).

c) xCT

Tout comme LAT1, le transporteur xCT s'associe également à la chaperonne CD98 afin de pouvoir permettre son action. Ce transporteur est particulièrement important pour le transport de la cystine, la forme oxydée de la cystéine qui sera utilisée par la cellule dans la régulation du stress oxydant (Conrad and Sato, 2011). L'expression cancéreuse de xCT est associée à un faible pronostic de survie et à la résistance à certains traitements de chimiothérapie (Baba, 2012; Huang et al., 2005; Lewerenz et al., 2013; Okuno et al., 2003). Inhiber le transport de cystine par xCT a déjà été démontré comme induisant la mort cellulaire (Références). Cependant, il a été caractérisé que cette mort cellulaire passerait par un mécanisme non apoptotique résultant de l'accumulation de fer dans la cellule, la ferroptosis (Dixon et al., 2012). Ces traitements doivent alors être améliorés pour ne cibler que les cellules tumorales et éviter de causer des dégâts secondaires irréversibles (neurodégénération) (Do Van et al., 2016).

L'expression de ces trois transporteurs est régulée par ATF4 notamment en cas de carence en acides aminés ce qui pourrait faire d'ATF4 une cible intéressante pour inhiber leur expression et impacter le métabolisme tumorale (Cormerais et al., 2016; Ren et al., 2015; Sato et al., 2004). Cependant, ATF4 n'est pas le seul facteur régulant la transcription de ces gènes comme MYC pour LAT1 (Hayashi et al., 2012). De plus, l'absence de l'un d'eux pourrait également être compensée par d'autres transporteurs comme Broër *et al.* en 2016 ont pu

l'observer pour la compensation d'ASCT2 par SNAT 1 et 2 dans le transport de la glutamine (Bröer et al., 2016).

Des études sont également menées sur l'impact d'autres transporteurs dans le contexte tumoral comme GLYT1 et gliome (Morioka et al., 2008) ou encore SLC6A14 et cancer du sein (Babu et al., 2015). Ce dernier est particulièrement intéressant car sa délétion n'a pas d'impact sur la croissance des souris mais réduit fortement la croissance de cancer du sein spontané. Ces résultats font de lui une cible intéressante dans le développement d'agent anti-cancéreux.

3. Mécanismes de transport des peptides

Les acides aminés libres ne sont pas la seule source d'acides aminés pour la cellule. Les peptides présents dans la circulation peuvent également représenter une source d'acides aminés pour la cellule. Tout comme les acides aminés libres, les protéines ne peuvent traverser la membrane plasmique des cellules qu'avec l'aide de certains mécanismes comme les transporteurs (Leibach and Ganapathy, 1996). Certains de ces transporteurs comme PEPT1 (Pet1 ou Peptide transporter 1) sont spécifiques du transport de petits peptides issus de la digestion enzymatique (Adibi, 1997) notamment aux niveaux de certains types de cellules comme les cellules rénales et intestinales. Si PEPT1 est exprimée de manière fonctionnelle au niveau de ces cellules, de hauts niveaux d'expression de ce transporteur sont également retrouvés dans certaines lignées cancéreuses comme celle de cancer du pancréas, dans des fibrosarcomes et dans des cancers gastriques ((Gonzalez et al., 1998; Inoue et al., 2005; Nakanishi et al., 1997). On peut alors faire l'hypothèse que l'expression de ce transporteur va augmenter l'apport en peptides à la cellule qui pourront alors être dégradées afin d'obtenir des acides aminés libres utilisables pour les fonctions métaboliques de la cellule.

L'importance de l'expression de ces transporteurs dans le métabolisme tumoral n'est pas bien identifiée mais a été récemment associée à une augmentation du risque et de l'agressivité des cancers colorectaux (Viennois et al., 2016). Par contre, leur spécificité de transport de peptide est particulièrement étudiée afin de cibler certaines drogues vers des cellules cancéreuses (Gonzalez et al., 1998). Ces transporteurs ne sont pas les seules voies d'entrées des peptides dans la cellule. La macropinocytose qui est un mécanisme aspécifique permet à la fois l'entrée de peptides mais également de protéines intactes dans la cellule.

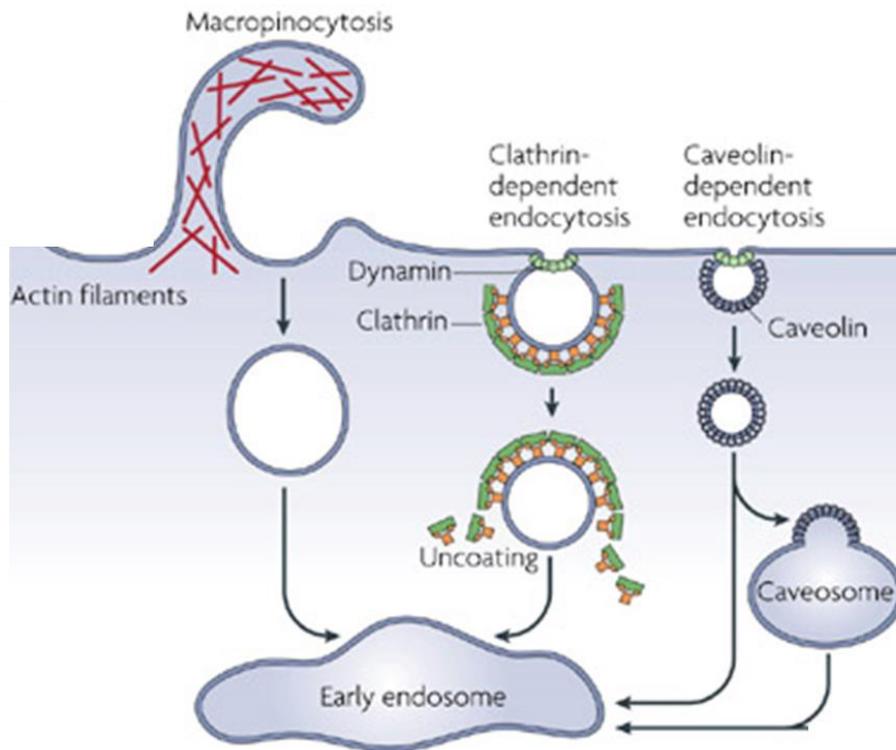


Figure 28 : Les différents types d'endocytose. La macropinocytose qui permet d'englober des portions du milieu extracellulaire de manière non sélective. L'endocytose dépendante de la clathrine, une molécule retrouvée au niveau de certaines régions de la membrane ; L'endocytose dépendante des cavéolines, grâce à ses interactions avec les radeaux glycolipidiques qui participent à la captation de cholestérol. Schéma adapté de **(Mayor and Pagano, 2007)**

4. La macropinocytose

Les protéines du milieu extratumoral sont présentes sous différentes formes : soit sous forme libre comme par exemple l'albumine ; soit présentes dans des vacuoles provenant de la dégradation d'autres cellules ou sous forme d'exosome. Différentes routes sont possibles afin de permettre la captation de ces molécules par la cellule comme la fusion des membranes lipidiques des vacuoles avec celle des cellules (Parolini et al., 2009) ou encore la macropinocytose, une forme d'endocytose qui peut être fortement augmentée dans le contexte tumoral.

L'endocytose est un terme regroupant différents mécanismes de transport de molécules vers l'intérieur de la cellule. Ces mécanismes peuvent être utilisés par toutes les cellules à l'exception de la phagocytose qui n'est permise que par certaines cellules spécialisées comme les macrophages. Parmi eux, on retrouve l'endocytose médiée par la clathrine et celle dépendante de la cavéoline qui va permettre l'internalisation de substrats spécifiques dans la cellule grâce à des systèmes ligands récepteurs (Figure 28).

Le dernier de ces mécanismes d'endocytose est la macropinocytose qui ne cible pas de molécules extracellulaires spécifiques. Ce mécanisme permet l'évagination de la membrane plasmique qui va englober une portion de l'environnement cellulaire jusqu'à la formation de macropinosomes. Ces derniers seront ensuite internalisés dans la cellule afin d'être pris en charge dans le but de libérer le contenu de leur vacuole. La macropinocytose ne ciblant pas de molécules particulières, elle va permettre l'entrée dans la cellule d'acides aminés libres mais également de protéines qui pourront être dégradées notamment par le lysosome afin d'alimenter le pool d'acides aminés.

a) Régulation de la macropinocytose

La macropinocytose peut voir son niveau d'activité varier en fonction des signaux intracellulaires (Guest et al., 2008; Racoosin and Swanson, 1992). Cette régulation se fait notamment au niveau de son processus principal à savoir le réarrangement des filaments d'actine F (Lee and Knecht, 2002). La polymérisation des filaments d'actine permet l'évagination de la membrane plasmique pour pouvoir entourer une portion extracellulaire (Figure 29). Si on traite les cellules avec une drogue comme la cytochalasin A qui se lie à l'actine et empêche sa polymérisation, on bloque complètement la macropinocytose (Seastone et al., 2001).

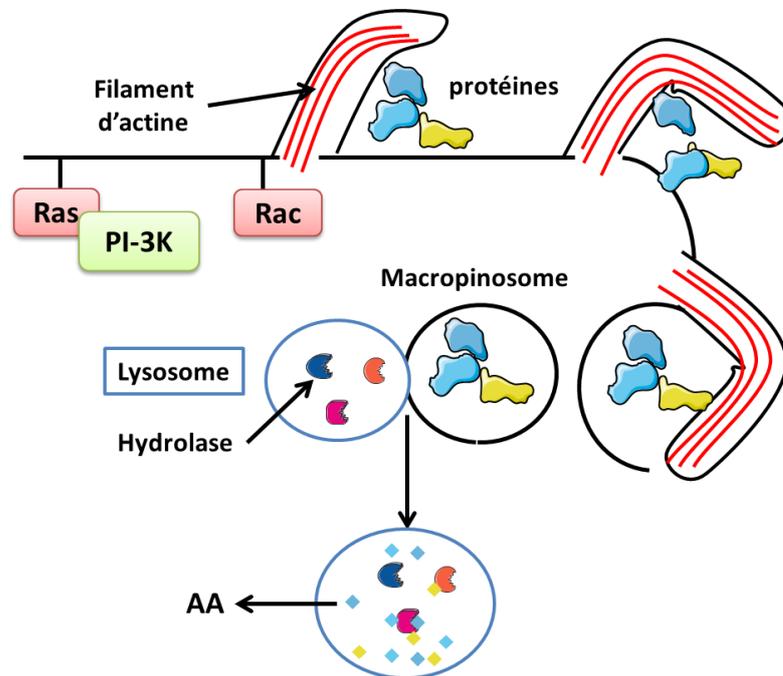


Figure 29 : Schéma de la régulation de la macropinocytose par Ras. L'oncogène active la polymérisation de l'actine en augmentant l'action de la PI-3K sur Rac. L'évagination de la membrane consécutive à la polymérisation de l'actine permettra d'englober une portion de l'environnement extracellulaire. La membrane se repliera afin de former les vésicules de macropinosomes. Ces dernières fusionneront avec les lysosomes ce qui permettra la dégradation des protéines en acides aminés qui pourront être utilisés par la cellule. Schéma adapté de (Zwartkruis and Burgering, 2013).

L'organisme modèle utilisé pour étudier la macropinocytose est un amibe, le *Dictyostelium*, qui possède un cytosquelette et des mécanismes d'endocytose similaires aux cellules humaines. Les études sur cet unicellulaire ont permis de mettre en évidence des mécanismes de régulation de la macropinocytose communes aux cellules humaines. La régulation de ce mécanisme se fait principalement par la protéine Ras. La superfamille Ras regroupe de petites GTPases impliquées dans la transduction du signal notamment pour permettre la croissance cellulaire (Aktas et al., 1997), le contrôle de la différenciation cellulaire (Crespo and León, 2000) et la survie des cellules dans certaines conditions comme la stimulation par les facteurs de croissance (Bonni et al., 1999). Ras permet l'activation des phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) de classe I grâce à sa liaison sur le domaine Ras des kinases permettant ainsi la synthèse de PIP3 (Rodriguez-Viciana et al., 1994). La présence de PIP3 dans la macropinocytose est importante dans la formation de macropinosome dans des portions précises de la membrane plasmique (Veltman et al., 2014). De plus, sa présence permet de restreindre la polymérisation de l'actine au niveau des futures cloisons de la vacuole et non pas en son centre (Bernitt et al., 2015). Réprimer l'expression de Ras ou diminuer la production de PIP3 vont inhiber fortement la macropinocytose (Araki et al., 2007; Chubb et al., 2000).

b) Sensibilité de la macropinocytose au variation du PH

Il est important de noter que la macropinocytose est sensible au niveau de pH sousmembranaire. En effet, la stimulation de la cellule par les facteurs de croissance comme l'epidermal growth factor (EGF) va également induire l'expression d'échangeur Na⁺/H⁺ conduisant à une augmentation du pH cytosolique et un influx de Na⁺ (Koivusalo et al., 2010). Des inhibiteurs de ces échangeurs comme l'amiloride et ses dérivés, l'EIPA par exemple (ethylisopropylamiloride (Masereel et al., 2003)) ont montré que leur action conduisait à une acidification du pH sous-membranaire et une inhibition de la formation des macropinosomes. Cependant, les mécanismes responsables de ces inhibitions ne sont pas clairement identifiés notamment à cause du nombre et de la présence d'échangeurs dans d'autres compartiments cellulaires et de la faible spécificité de ces inhibiteurs pour une isoforme d'échangeur particulière.

c) Ras et macropinocytose

Comme les voies de signalisations régulées par Ras participent à la prolifération cellulaire, les protéines de cette famille peuvent être considérées comme oncogènes en cas de mutations géniques. Chez l'Homme, les 3 gènes de cette famille, HRas, KRas et NRas sont

les oncogènes les plus communs dans les cancers humains. Environ 20% de tous les types de cancer ont des mutations qui conduisent à l'activation constitutive de Ras (Bos, 1989), ce pourcentage pouvant monter à 90% dans le cas du cancer du pancréas. Ces derniers sont d'ailleurs bien décrits dans la littérature pour avoir des environnements fortement carencés en nutriment et donc en acides aminés dus à une faible vascularisation (Kamphorst et al., 2015). L'activation constitutive de la macropinocytose dans ces cancers est un mécanisme important dans la résistance de ces cellules à la carence en acides aminés (Commisso et al., 2013). Les recherches d'inhibition de résistance par la macropinocytose se concentrent principalement à cibler les protéines Ras (Downward, 2003) soit en ciblant les kinases qui participent à sa régulation comme le récepteur tyrosine kinase de l'EGF (EGFR) (Sibilia et al., 2000) ou encore en ciblant les voies régulées par Ras (Hunger et al., 2001).

Si les cellules peuvent capter des protéines extracellulaires, leur utilisation serait dépendante d'une voie de signalisation précédemment décrite, la voie mTORC1. Wilhelm Palm *et al* en 2015 ont montré que l'utilisation des protéines extracellulaires captées par la macropinocytose dépendrait du niveau d'activité de mTORC1 (Palm et al., 2015). Plus précisément, l'inhibition de mTORC1, notamment en cas de carence en acides aminés, est nécessaire afin de permettre la dégradation des protéines captées par macropinocytose au niveau du lysosome.

CHAPITRE IV : Conclusion : Paradoxe du rôle de la voie GCN2-eIF2 α -ATF4 dans la survie des tumeurs

Les situations de stress nutritionnels ou hypoxiques peuvent se produire au sein des tumeurs faiblement vascularisées ou dans des régions tumorales trop éloignées des vaisseaux sanguins. Bien que néfastes, des auteurs ont montré qu'il existait des types de cancer développant des résistances à ces stress. Il existe peu d'informations concernant la résistance des cellules à la carence en acides aminés. En plus d'être essentiels à la cellule pour la synthèse protéique, les acides aminés sont impliqués dans de nombreuses voies métaboliques. Ces caractéristiques contribuent largement à définir la carence prolongée comme une situation pro-apoptotique impliquant que les cellules tumorales acquièrent des mécanismes de résistance à cette condition.

Deux voies de signalisations participent majoritairement à l'adaptation des cellules non tumorales à la carence en acides aminés : la voie mTORC1 et la voie GCN2. La voie mTORC1 inhibée en absence d'acides aminés participe à la régulation de nombreux mécanismes impliqués dans la croissance cellulaire (synthèse protéique, autophagie, biogenèse ribosome...). Il existe un consensus quant au rôle de l'activation de mTORC1 en faveur de la survie cellulaire.

En revanche, il n'existe pas un tel consensus concernant le rôle de la voie GCN2. L'activation de GCN2 lors de carences en acides aminés conduit d'une part à l'inhibition de la synthèse protéique et d'autre part, à l'expression du facteur de transcription ATF4. Le facteur ATF4 permet notamment l'expression d'ASNS et de VEGFA ce que des auteurs ont décrit comme essentielle à la survie des tumeurs (Ye et al., 2010) (Wang et al., 2013). Cependant, l'activation de GCN2 et l'expression d'ATF4 sont également décrites comme régulant l'expression de facteurs apoptotiques dans d'autres conditions comme la carence en glucose. En effet, il est connu que le déficit de glucose peut être compensé par l'utilisation de la glutamine comme substrat énergétique. Cependant, si cette situation perdure, une carence en glutamine peut s'installer et activer alors la voie GCN2-ATF4 et l'expression du facteur CHOP pour induire l'apoptose des cellules (Shin et al.). Par ailleurs, plusieurs auteurs ont également montré que l'induction de la mort cellulaire suite à des traitements pouvait être médiée par l'activation de GCN2 augmentant ainsi le paradoxe quant au rôle de cette voie (Klampfer et al., 1999) (Gentz et al., 2013) (Wei et al., 2015a) (Habibi et al., 2012) (Sidhu et al., 2015).

Si les connaissances augmentent quant aux mécanismes de régulations et aux cibles des voies mTORC1 et GCN2, le rôle précis de ces voies de signalisation dans l'adaptation des cellules à des carences prolongées en acides aminés reste cependant flou. De par leur forte instabilité génétique, on pourrait s'attendre à ce que les cellules cancéreuses présentent des modifications des voies de signalisations mTORC1 et GCN2 afin de favoriser la survie et l'adaptation des cellules à la carence en acides aminés. De ce fait, il semble important d'identifier le rôle de ces voies lors de carences prolongées en acides aminés mais aussi d'étudier d'autres mécanismes qui pourraient également participer à cette adaptation.

Stratégie expérimentale

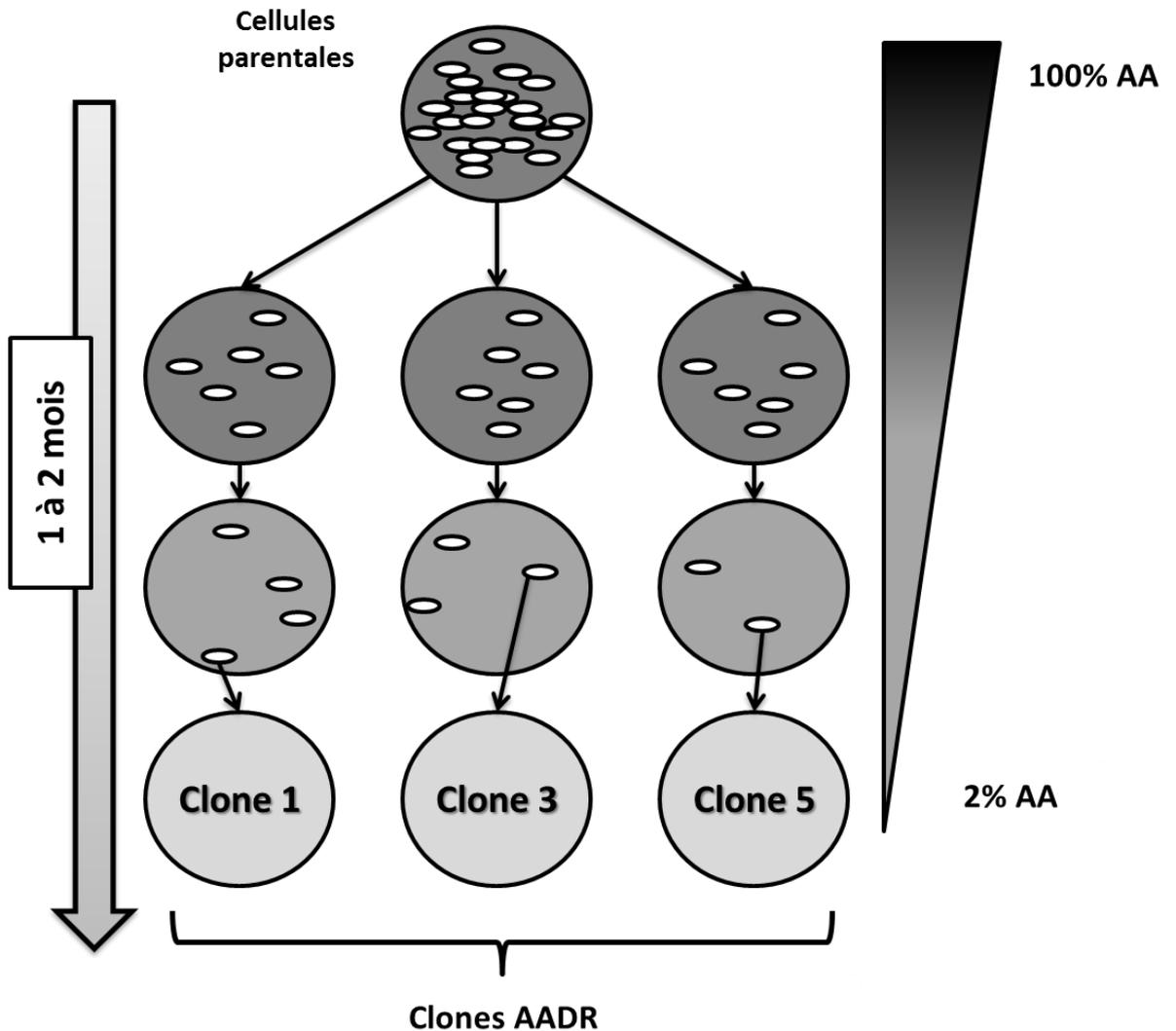


Figure 30 : Schéma du protocole d'obtention des clones. Des fibroblastes embryonnaires de souris entretenus en milieu contrôle (100 %AA) ont été soumis à des milieux de plus en plus carencés en acides aminés jusqu'à ne contenir que 2% des acides aminés du milieu contrôle. Cette diminution progressive a conduit à la mort de la majorité des cellules et à la sélection des cellules les plus résistantes à la carence. À la fin du protocole, trois clones ont été obtenus nous donnant ainsi nos lignées de clones AADR (Amino acid deprivation resistance).

Stratégie expérimentale

Afin d'identifier les mécanismes de résistance des cellules cancéreuses à la carence en acides aminés, nous avons utilisé une approche originale qui a consisté à développer un modèle de cellules résistantes. Pour générer ces lignées de cellules résistantes, nous avons utilisé des lignées de fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) immortalisés au SV40. Nous avons choisi ce type de cellule pour avoir également accès à des MEFs invalidés pour des gènes potentiellement impliqués dans les mécanismes de résistance.

Pour obtenir nos cellules résistantes, nous avons tout d'abord soumis les MEFs (cellules parentales) à des milieux de plus en plus carencés en acides aminés. Cette diminution graduelle de la concentration en acides aminés a permis d'induire une pression de sélection de plus en plus forte causant la mort de la majorité des cellules (Figure 30). Pour créer le milieu de sélection, nous avons dilué le milieu d'entretien basal des cellules parentales dans un milieu dépourvu d'acides aminés. Ce milieu a ensuite été complété avec du sérum de veau fœtal (SVF) qui a été dialysé pour éliminer les acides aminés tout en conservant les autres nutriments et facteurs de croissance nécessaires aux cultures *in vitro*. Le processus de sélection a duré plusieurs mois jusqu'à descendre à un milieu de sélection ne contenant que 2% d'acides aminés, milieu qui sera par la suite référé à milieu 2%. À la fin du processus, une colonie de cellules par boîte a été repiquée donnant ainsi plusieurs lignées de cellules résistantes indépendantes les unes des autres. Ces lignées ont été renommées clones AADR (amino acid deprivation resistant).

Cette approche présente plusieurs avantages à l'étude directe de lignées cancéreuses capables de résister à la carence en acides aminés. S'il existe des données sur la résistance des lignées cancéreuses à la carence en nutriments, peu de données attestent que ces lignées sont également résistantes à la carence en acides aminés. De plus, il n'est pas certain que la résistance de telles cellules soit directement due à une adaptation face à une carence en acides aminés. Le principal avantage de cette approche est qu'elle offre également la possibilité de pouvoir comparer les clones résistants avec les cellules dont elles sont issues afin d'identifier les mécanismes ayant permis d'acquérir la résistance.

Résultats expérimentaux

Publication 1

Florent Mesclon, Sarah Lambert-Langlais, Valérie Carraro, Laurent Parry, Isabelle Hainault, Céline Jousse, Anne-Catherine Maurin, Alain Bruhat, Pierre Fafournoux, and Julien Averous

"Decreased ATF4 expression as a mechanism of acquired resistance to long term amino acid limitation in cancer cells"

Oncotarget, en cours de soumission

Résultats expérimentaux

Publication 1

Diminution de l'expression d'ATF4 et résistance de cellules cancéreuses à la carence en acides aminés.

I. Introduction

La première partie du projet a d'abord consisté à évaluer plus précisément les capacités de résistances et de prolifération des clones AADR en milieu 2% AA par rapport à leurs cellules parentales. La seconde partie du projet a ensuite été d'étudier la régulation des principales voies de signalisation régulées par les acides aminés, les voies mTORC1 et GCN2, et leur implication éventuelle dans ce processus d'adaptation.

II. Résultats et conclusions

Notre modèle de sélection a permis de générer des cellules résistantes à la carence en acides aminés. La résistance des clones AADR à la carence en acides aminés se caractérise par une absence des marqueurs d'apoptose (clivage caspase-3 et compaction de l'ADN) qu'on peut notamment observer chez les cellules parentales. Par ailleurs, en plus de pouvoir proliférer en milieu 2% AA, les clones présentent une meilleure survie en milieu 0% AA par rapport à leurs cellules parentales, une caractéristique utilisée dans la littérature pour décrire des cellules tumorales résistantes.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux deux voies de signalisation majeures régulées par la disponibilité en acides aminés. La voie mTORC1 est réprimée de la même manière dans les cellules parentales que dans les clones AADR en milieu 2% AA indiquant qu'elle n'a pas été modifiée pendant la sélection. De manière intéressante, nous avons pu observer que les 3 clones indépendants présentaient tous une altération de l'expression d'ATF4. Cette sous-expression de l'ARNm et de la protéine étaient accompagnées d'une faible transcription de nombreux gènes cibles d'ATF4 (Atf3, Trb3, Atg12, Map1lc3b). Ces résultats faisant penser que la sous-expression d'ATF4 favoriserait la survie des cellules lors de carence en acides aminés, nous avons réalisés des expériences de sous-expression d'ATF4 par

shRNA sur les cellules parentales. L'utilisation de shRNA permettait de réduire fortement l'expression d'ATF4 sans toutefois l'invalider. Nous avons ainsi pu observer que les cellules exprimant le shRNA ciblant Atf4 présentaient une meilleure survie en milieu 2%AA que les cellules parentales. Ce résultat nous a permis de confirmer que la sous-expression d'ATF4 favorise effectivement la survie de cellules lors de carences en acides aminés.

Enfin, nous avons étudié plusieurs lignées cancéreuses pour étudier si des lignées résistantes à la carence en acides aminés présentaient ce même phénotype de sous-expression d'ATF4. Nous avons ainsi pu observer dans la lignée BxPC-3 de cancer du pancréas présentait une faible expression d'ATF4 et une meilleure prolifération en milieu 2%AA par rapport à deux autres lignées sensibles (MIA-PaCa-2 et Hela). De plus, en surexprimant ATF4 dans la lignée BxPC-3, les cellules étaient à nouveau sensibles aux effets apoptotiques d'ATF4 en milieu 2%AA.

Notre approche d'étude des mécanismes de résistance des cellules à la carence en acides aminés par les clones AADR a permis de mettre en évidence le rôle clé d'ATF4 dans la survie des cellules à des carences en acides aminés. Ayant de plus retrouver ce mécanisme dans une lignée cancéreuse, ces résultats permettent de confirmer que notre approche a permis de reproduire des mécanismes pouvant se développer au sein de tumeurs carencées en nutriments. Des études plus approfondies des clones AADR permettront de mieux caractériser les mécanismes de sous-expression d'ATF4 pour le développement de nouvelles cibles dans le cadre des traitements anticancéreux.

Decreased ATF4 expression as a mechanism of acquired resistance to long term amino acid limitation in cancer cells.

Mesclon F₁, Lambert-Langlais S, Carraro V₁, Parry L₁, Hainault I₂, Jousse C₁, Maurin AC₁, Bruhat A₁, Fafournoux P₁*, Averous J₁*

Affiliations:

¹ UNH, INRA, Université Auvergne, 63122, Saint-Genès-Champanelle, France.

² Institute of Cardiometabolism and Nutrition, Université Pierre et Marie Curie, INSERM, UMR S1138, Centre de Recherche des Cordeliers, 75006 Paris, France.

Contact informations:

* Correspondence should be addressed to J. Averous (julien.averous@clermont.inra.fr) phone :+33(0)4 73 62 42 04; fax: +33(0)4 73 62 47 55 or P. Fafournoux (pierre.fafournoux@clermont.inra.fr) phone :+33(0)4 73 62 45 62; fax: +33(0)4 73 62 47 55.

Key words: ATF4, amino acids, apoptosis, cancer, resistance

Abstract.

The uncontrolled growth of tumor can lead to the formation of hypoxic area deprived in nutrients. Due to their high genetic instability, tumor cells can develop resistance to this proapoptotic environment. Among the resistance mechanisms, those involved in the resistance to long-term amino acid restriction aren't elucidated. A long-term restriction in amino acid is particularly deleterious since nine of them cannot be synthesized by the cells. In order to determine how cancer cells face a long-term amino acid deprivation, we exerted a selection pressure on mouse embryonic fibroblast to isolate clones able to survive with low amino acid concentration. The study of several clones revealed an alteration of the amino acid regulated pathway GCN2/eIF2 α /ATF4. Compared to the parental cells, the clones exhibited a decreased expression of the transcription factor ATF4 and its target genes. The knock-down of ATF4 in parental cells renders them resistant to amino acid deprivation. Moreover, the association between a low level of ATF4 protein and the resistance to amino acid deprivation was observed in the cancer cell line BxPC-3. This resistance was abolished when ATF4 was overexpressed. Therefore, decreasing ATF4 expression may be one important mechanism for cancer cells to survive under prolonged amino acid deprivation.

Introduction

Tumor cells are characterized by an uncontrolled proliferation rate. This feature requires an increasing demand of nutrients to provide the energy and the building blocks to sustain their growth. Such anarchic development of the tumor mass may be accompanied by an inadequate vascularization of the tumors[1]. As a consequence, nutrients and oxygen may not be provided sufficiently and could contribute to growth arrest and necrosis of the tumor[2]. However, tumor cells exhibit high genetic instability which can lead to the development of resistance mechanisms to nutrients and oxygen deprived environment[3]. Mechanisms concerning lack of glucose and oxygen have been extensively studied[4,5]. In contrast, less is known on how tumor cells can adapt to the lack of lipids or amino acids. Since several years, there is an increasing interest for the role of the non-essential amino acids as precursors of intermediate metabolites in the context of cancer[6,7]. This interest is linked to the renewal of studies concerning the importance of the metabolism in tumor development[8–10]. A particular attention is given to amino acids such as glutamine, glycine or serine for their role as precursors for energetic metabolism or nucleotide synthesis [7]. As well, modification of the expression of enzymes involved in the synthesis of amino acids such as serine can contribute to tumorigenesis[11,12]. However, when facing a global restriction in amino acid availability, less is known on how tumor cells can face this stressful environment especially the lack of essential amino acids that cannot be synthesized by any mammalian cell. It remains puzzling that some tumor cells facing such a deficit can not only survive but also maintain minimal growth. While, it is established that, in non-tumor cells, the withdrawal of one essential amino acid can promote growth arrest and ultimately apoptosis if this condition persists [13].

Two pathways are well known to be controlled by amino acid availability, GCN2 and mTORC1. GNC2 is a kinase activated under amino acid starvation [14]. The phosphorylation of its target, the translation initiation factor eIF2 α leads to global inhibition of protein synthesis

but also, derepresses the translation of specific mRNAs possessing uORF in their 5'UTR such as the one encoding ATF4 [15]. Expression of this transcription factor conducts to the expression of a subset of specific genes involved in the adaptation to the lack of amino acids [16], these genes can be either pro-survival or pro-apoptotic. The multi-protein complex mTORC1 is a major regulator of cell growth which coordinates anabolic and catabolic processes according to nutrients and energy environment. The activity of this complex relies on the protein mTOR which has been initially identified as the kinase targeting S6K1 and 4EBP1, two proteins involved in the control of protein synthesis [17].

It exists an important literature concerning the role of mTORC1 in process of tumorigenesis. It is established that the induction of mTORC1 activity can occur in tumors as negative regulator of mTORC1 activity are often found to be mutated in cancer cells [18]. A constant and uncontrolled activation of mTORC1 can contribute significantly to the tumorigenesis through the control of different cell functions such translation or autophagy [19]. Moreover, the overexpression of amino acids transporter that contributes to induce mTORC1 activity is a characteristic of numerous cancer cells [20,21]. The role of GCN2 in the tumorigenesis has been studied to a lesser extent. Several studies have shown that the presence of GCN2 can contribute to tumors growth in the context of hypoxia or non-essential amino acid deprivation [22,23]. Nevertheless, GCN2 has also been shown to contribute to cell death of cancer cell in a different setting [24]. This apparent discrepancy reflects the duality of the GCN2/eIF2 α /ATF4 pathway which, as other stress pathway, can promote either survival or apoptosis [25,26].

In order to understand how a cell can adapt to a long term amino acid deprivation, we choose to develop a cell line able to resist to this stress condition. Considering that the

mechanisms involved in the resistance to amino acid deprivation most of the time originate from secondary mutations, we established this model of resistant cell line from mouse

embryonic fibroblasts rather than from a specific tumor cell line. Indeed, we assumed that the secondary mutations result from the pressure exerted by the environment of the tumor as it is observed for treatment [27–29]. MEFs cells were cultured under selection pressure in a medium containing very low concentration of amino acid. As in the Darwinian selection, few cells evolved to the capacity to survive in this environment, each of which grows as clonal population. This selection allows us to generate several independent clones that were able to proliferate with low concentration of amino acids and that were also resistant to the apoptosis induced by amino acid deprivation.

In these clones, the study of the two main pathways involved in the maintenance of proteostasis (i.e. GCN2/eIF2 α /ATF4 and the mTORC1) revealed a down regulation of ATF4 expression and function. The same characteristic were also observed in a cancer cell line resistant to amino acid deprivation. Our study, in the context of a long term amino acid deprivation, designed ATF4 not only as proapoptotic factor but especially as a major limiting factor in the process of acquisition of amino acid deprivation resistance.

Results

Selection and characterization of clones able to grow in low level of amino acids.

In order to generate clones able to survive and proliferate with very low level of amino acids, we progressively submitted mouse embryonic fibroblasts to a decreasing amount of amino acids. At the end of the selection process, cells were cultured in a so called “2% medium” in which the concentration of each amino acid represented 2% of the initial concentration presents in the control medium (DMEM) (see mat meth for more details). Three independent clones were selected from different culture plates for their capacity to proliferate in the 2% medium. Those clones will be further designated as Amino Acid Deprivation

Resistant clones or AADR clones. When submitted to the same 2% medium, parental cells exhibit a weak proliferation during the first 48 hours (Fig. 1A) together with a strong proportion of high chromatin compaction, an apoptosis marker (Fig. 1B). After 48h of AMINO ACID deficiency, the number of parental cells decreased. At the contrary, the AADR clones present a very weak percentage of apoptotic cells, similar to the one observed in the parental cells cultured in the control medium. This observation was corroborated by the study of the cleaved form of the caspase 3. Indeed, an increase of this apoptosis marker was observed after 24 hours of amino acid limitation in the parental cells whereas no significant signal was observed in the AADR clones cultured in the same condition (Fig. 1C). These results demonstrate that the AADR clones are not only able to proliferate in a low concentration of amino acids, but they have also developed the ability to resist to the apoptotic process. Strikingly, the AADR clones were also able to survive to the total absence of amino acids (Fig S1.), a drastic situation known to induce cell death [30]. Prior to further analysis, we have checked whether the clone's ability to proliferate and survive in low level of amino acid was reversible or not. The resistant clones were cultured in complete medium for two weeks before going back to 2% medium to test whether their ability to resist to amino acid deprivation persists. We have shown (Fig. S2.) that all the resistant clones have kept the capacity to proliferate (with no latency) in 2% medium thus, confirming that this feature was acquired in a stable manner.

Activity of the amino acid-regulated pathways in the AADR Clones

Amino acid availability is known to regulate mainly two pathways, i.e. the GCN2 and mTORC1 pathways. These two pathways have been characterized for their contribution to the control of proteostasis through the regulation of translation and autophagy during amino acid deprivation. We thus assessed whether the adaptation of AADR clones to amino acid deficiency resulted in a modification of one of these pathway. In the parental cells, the 2% medium induces the phosphorylation of eIF2 α , known as the target of GCN2 [14] , and the inhibition of S6K1

phosphorylation, a target of mTORC1 (Fig.2A). The phosphorylation states of these proteins are associated with a drastic inhibition of protein synthesis in 2% medium compared to control medium as shown in figure 2B by SUnSet techniques. In the AADR clones, we showed that the levels of phosphorylation of these two proteins and of protein synthesis were equivalent to those observed in the parental cells cultured in 2% medium. This result is consistent with what was described in several studies that have highlighted the importance for cells, notably tumor cells, to reduce protein synthesis level in order to face nutrient restriction [31]. It also suggests that the decrease of protein synthesis is not the limiting step concerning the ability to proliferate or not upon amino acid scarcity.

These two pathways are also known to regulate autophagy during amino acid deprivation [32–37]. We thus checked the level of LC3 lipidation (LC3-II, a marker of autophagy) in presence or in absence of chloroquine (an inhibitor of lysosome-autophagosome fusion), to have an insight into the autophagic flux [38]. In parental cells, chloroquine addition in 2% medium induced a strong increase of LC3-II level whereas only a faint increase was observed in control medium treated with chloroquine (Fig. 2C). This demonstrates that autophagy is induced in parental cells cultured in 2% medium. As for clones, strikingly, the protein level of LC3-I and II were weaker than in the parental cell. The addition of chloroquine demonstrated that there is a significant autophagy flux in the AADR clones but apparently reduced compared to parental cells (Fig.2C).

This experiment does suggest that the difference of LC3 protein level is not due to a drastic increase in the autophagic flux but rather to a decrease of its expression. That was indeed confirmed by measuring the level of mRNA encoding LC3 protein. A decrease of around 60% of the level of the map1Lc3b transcript was observed in the AADR clones cultured in

2% medium compared to parental cell (Fig. 2D). Interestingly, *map1Lc3b* transcription is known to be controlled by ATF4, a downstream factor of GCN2-eIF2 α pathway [39,40].

Expression of ATF4 and its target genes in AADR clones

Considering that ATF4 is involved in the control of *map1Lc3b* transcription, we decided to investigate its protein level in the AADR clones. As expected, in parental cells, the phosphorylation of eIF2 α is associated with the increase of ATF4 protein level during amino acid deprivation (Fig. 3A). As previously described for a single essential amino acid deprivation [41], the level of *Atf4* mRNA was also increased by the 2% medium (Fig. S3.). Despite an equivalent level of eIF2 α phosphorylation (cf. Fig. 2A), the amount of ATF4 is significantly lower in the AADR clones compared to the parental cells cultivated in the 2% medium. In accordance with this result, we observed that the level of *Atf4* mRNA was also lower in the clones in comparison with the parental cells (Fig. S3.). These results illustrate that AADR clones present a significant lower expression of ATF4 at both protein and mRNA level.

In order to determine whether this lower expression of ATF4 is sufficient to impact the ATF4-dependent gene expression program, we studied, in addition to *Map1Lc3b*, the mRNA expression of several ATF4-dependent genes such as *Asns*, *Atf3*, *Atg12* and *Trb3* [36,42–44]. As expected, the increase of ATF4 expression in the parental cells cultured in 2% medium was associated with an important increase in the expression of these different genes compared to the control condition (Fig. 3B). However, for all these genes, the amounts of their mRNA were significantly lower in the AADR clones compared to the parental cells cultured in 2% medium. The alteration of these ATF4-target genes regulations in AADR clones is coherent with the observation that these clones present an alteration of ATF4 expression. To rule out that the decrease in ATF4 expression and its target genes was a consequence of the long term culture in 2% medium rather than a modification linked to the adaption mechanism, we cultured the AADR clones for two weeks in the control medium before to replace them in 2% medium for

24 and 48 hours (a protocol similar to the one applied to the parental cells). This experimental paradigm shows that the down-regulation of ATF4 and its targets gene is a stable trait acquires during the selection (Fig. S4).

Role of the downregulation of ATF4 in conferring resistance to amino acid deficiency

It was crucial to determine if this down-regulation of ATF4, acquired during the selection, contributes to the adaption to the low amino acid environment or if it is just a consequence of this adaption. To assess this question, MEFs cells were infected with a lentivirus containing a shRNA targeting *Atf4* mRNA or a control shRNA. The level of *Atf4* mRNA and protein were dramatically decreased in the cells infected with the shRNA ATF4 cultivated in the 2% medium compared to the cells infected with the shRNA control (Fig.4A). This decrease of ATF4 expression resulted in the decrease of *Asns* mRNA level, confirming the functional impact of ATF4 knock-down (Fig. S5). Then, the consequence of the down regulation of ATF4 expression on cell survival in 2% medium was determined. Knocking-down ATF4 in parental cells resulted in an absence of caspase 3 cleavage after 24h and 48h in 2% medium whereas caspase 3 cleavage is observed in parental cells infected with the control ShRNA (Fig. 4B). As for proliferation, the absence of ATF4 consecutive to the infection with *Atf4*-shRNA enables control cells to slightly proliferate after 5 and 7 days in 2% medium whereas the number of cells significantly decreases after infection with the control shRNA (Fig. 4C). This result demonstrates that the decrease of ATF4 expression increases the ability of cells to survive during prolonged amino acid deprivation.

ATF4 expression in amino acid deficiency-resistant cancer cell lines.

It is already admitted that ATF4 can contribute to cell death during prolonged or intense stress [25]. Our knock-down experiments confirm this concept for MEFs in the setting of a partial amino acid starvation. We made the hypothesis that a similar adaptation to amino acid

deprivation could be observed in cancer cell lines. In order to support this hypothesis, we studied the level of expression of ATF4 in different cancer cell lines in order to determine whether the ability to resist to a long term amino acid deprivation can be associated with a low level of ATF4 expression. We choose to focus our study on pancreatic cancer cell lines. Indeed, pancreatic tumors present a high metabolism and a dense stroma which conduct to an impaired development of the tumor vasculature and thus, to the development of hypoxic and nutrient deprived region [45,46]. We tested two human pancreatic cancer cell lines: Miapaca-2 and BxPC-3. MIA PaCa-2 have been characterized for their poor tolerance to nutrient deprivation whereas BxPC-3 have been shown to be more resistant [47] . Based on our previous study, we also used HeLa cells, a cervical cancer cell line, as a positive control of ATF4 expression under amino acid deprivation [41] . Among those cell lines, the BxPC-3 exhibited the strongest increase of their cell number after 3 days of cultures in 2% medium (Fig. 5A). In addition, if we express the proliferation capacity of this cell line in 2% medium relatively to the proliferation capacity in control medium, BxPC-3 proliferation was only reduced by 40% in 2% medium after 72h (Fig. 5B).

Comparatively, HeLa and MIA PaCa-2 presented a strong decrease, respectively of 90% and 95% of their proliferation rate. In these two cell lines, the strong inhibition of cell growth was accompanied by an induction of apoptosis as shown by the appearance of the cleaved form of PARP, a target of caspase-3 (Fig. 5C). In BxPC-3, the cleaved form of PARP was not detected, indicating that the 2% medium did not induce apoptosis in this cell line. Remarkably, this capacity of the BxPC-3 to resist to apoptosis was associated with the weaker level of expression of ATF4 among the 3 cell lines tested (Fig. 5C).

Thus, the capacity of a human tumor cell line to survive in low amino acid environment also seems to be associated with a decreased expression of ATF4. Therefore, overexpressing ATF4 in resistant cells may be a good strategy to sensitize them to the 2% medium. Indeed,

overexpression of ATF4 by adenovirus infection lead to the induction of apoptosis of BxPC-3 cells in 2% medium as shown by the detection of the cleaved form of PARP (Fig. 6A).

Moreover, this apoptosis induction was associated with a reduction of proliferation compared to BxPC-3 cells infected with Ad-GFP (Fig. 6B).

All together, these results confirm the hypothesis that a weak level of expression of ATF4 can contribute to the capacity of tumor cell able to survive and proliferate in low concentration of amino acid.

Discussion.

The aim of this study was to identify mechanisms of resistance that can occur in tumor cells due to the pressure of selection from an environment deprived in amino acid. For that purpose, we generated clones able to grow in a medium containing low amount of amino acid. It is noticeable that parental cells exposed to a very low level of amino acid exhibit after 24 hours the initiation of apoptosis while their growth is not yet totally abolished. In contrast, the AADR clones were resistant to the apoptosis induced by a very low concentration of amino acid. Until now two signaling pathways, mTORC1 and eIF2 α /ATF4, are well known to be involved in the adaption to the variation of amino acid supply. The mTORC1 pathway did not appear to behave differently in the AADR clones and the parental cells since in both cases S6K1 phosphorylation was abolished upon amino acid limitation. If the inhibition of mTORC1 has been proposed as a therapeutic strategy to treat cancers, it is now established that its inhibition alone may not be sufficient to induce apoptosis [48].

Interestingly, we observed an alteration of the eIF2 α /ATF4 pathway in the AADR clones. Indeed, compared to the parental cells, the level of ATF4 protein was decreased in the clones despite an equivalent level of eIF2 α phosphorylation. It remains complex to determine the cause of this low expression level as ATF4 expression is highly regulated at the level of its transcription, translation and protein stability [49]. The low amount of ATF4 protein is

associated with a decreased amount of Atf4 mRNA. But, it cannot be concluded that the decrease of Atf4 mRNA is the initial event contributing to a low ATF4 protein level as it has been suggested that ATF4 might regulate its own transcription [50]. ATF4 is well known to be highly regulated at the translational level [51]. Nevertheless, the levels of both eIF2 α phosphorylation and protein synthesis observed in the AADR clones suggest that the underexpression of ATF4 is not due to a defect of its translation. If further studies would be necessary to determine the exact cause of this under expression, it has to be kept in mind that this cause may differ for each AADR clones.

The fact that the down regulation of ATF4 and its target genes are common characteristics of the tested clones suggests that this alteration may have an important role in the resistance to amino acid deprivation. This concept has been confirmed by the knock-down of ATF4 in the parental cell which have acquired a resistance to the apoptosis induced by the deprivation in amino acid. This pro-apoptotic role of ATF4 is in accordance with data of the literature showing that the induction of ATF4 expression, notably by drugs [52], has a pivotal role in the initiation of apoptosis [53].

However, others studies have demonstrated that ATF4 is necessary for the survival of tumor cells in deprived environment [22]. ATF4 has been shown to be necessary for the regulation of VEGF expression in low vascularized area to promote angiogenesis and so, the furniture of amino acids [22]. The study of Ye et al. demonstrates that the presence of ATF4 is necessary to synthesize non-essential amino acids and more particularly asparagine. Nevertheless, they used for their in vitro experiments a medium lacking the non-essential amino acids [23]. Our model differs from that approach as the scarcity concerns all the amino acid and in particular the essential ones that cannot be synthesized. These two examples illustrate the complexity to establish a model concerning the role of ATF4 in the balance survival/apoptosis in the different contexts of amino acid deprivation. This complexity of the

role of ATF4 resides in the fact that it regulates the expression of numerous pro-survival and pro-apoptotic genes. In addition, the capacity to resist to amino acid scarcity is likely to reside in the modification of expression of a set of genes rather in the down regulation of only one pro-apoptotic gene such as Trb3 or Atf3. Our data clearly show that ATF4 down regulation protects from the apoptosis induced by the long term deprivation in amino acid. It is reasonable to make the hypothesis that other mechanisms, independently of ATF4 down regulation, can contribute to the resistance of the AADR clones. Another important observation is that the phosphorylation of eIF2 α is conserved in the AADR clones, suggesting that this event could be necessary to face the amino acid deprivation. This hypothesis is in accordance with the study of Han et al. which has demonstrated that the phosphorylation of eIF2 α and the resulting inhibition of protein synthesis are in favor of the survival [54]. The importance of protein synthesis limitation to resist to long term amino deprivation is well illustrated by the study of Leprivier et al [31]. The authors demonstrate that the decrease of the elongation rate through the activation of the eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase (eEF2k) promotes cell survival during nutrient deprivation. Moreover, a high level of eEF2K is associated with poor diagnostic in different kind of tumors [31]. The protective effect of eEF2K has been shown to rely on the inhibition of protein synthesis and not on the induction of autophagy [55] which has been reported to be induced by eEF2K [56,57]. As well, in the clones our results suggest that their capacity to survive in amino acid deprived medium do not rely on the increase of autophagy. Indeed, the levels of autophagic genes were decreased and the total autophagic flux also seems to be decreased. As already mentioned, a high level of autophagy can represent only a transient adaption to a lack of amino acids. Moreover, it has been demonstrated that a link exists between autophagy and the induction of apoptosis [13],

consequently, limiting the autophagy may represent an efficient strategy to resist to a long term amino acid deprivation.

Finally, we have been able to establish that this feature of a low level of ATF4 expression leading to amino acid deprivation resistance occurred also in cancer cell lines. Indeed, BxPC-3 pancreatic cancer cell line exhibited both the capacity to grow in amino acid deprived medium and a low level of ATF4 expression. Moreover, overexpression of ATF4 in BxPC-3 cells re-sensitizes them to the apoptosis induced by amino acid deprivation. As cancer cells emerged from a primal mutation which could be followed by others, it remains striking to observe the same characteristics of amino acid deprivation resistance in BxPC-3 as in the AADR clones. Despite the presence of differential selection pressures and maybe different mechanisms between AADR clones and BxPC-3, the decreased expression of ATF4 seems to be an important characteristic in order for cell to survive to amino acid deprivation. This observation establishes that the cellular model that we developed is pertinent to identify a feature of the resistance to amino acid deprivation that can be shared by cancer cells. However, we do not claim that there is a strict correlation between ATF4 and the resistance to amino acid deprivation. As mentioned above others mechanisms of resistance may arise in tumor cells. Yet, increasing the level of expression of ATF4 might be an efficient strategy to target specific tumor cells able to resist to deprived environment, not only because ATF4 can be a pro-apoptotic factor but also, because low level of ATF4 might be the cause of the resistance. For that reason, the comprehension of the causes of the decrease in ATF4 expression would be of particular importance. It remains that strategies to target ATF4 expression will have to be considered in the complexity of tumor heterogeneity and it is likely that combined or sequential therapies will be necessary.

Figures

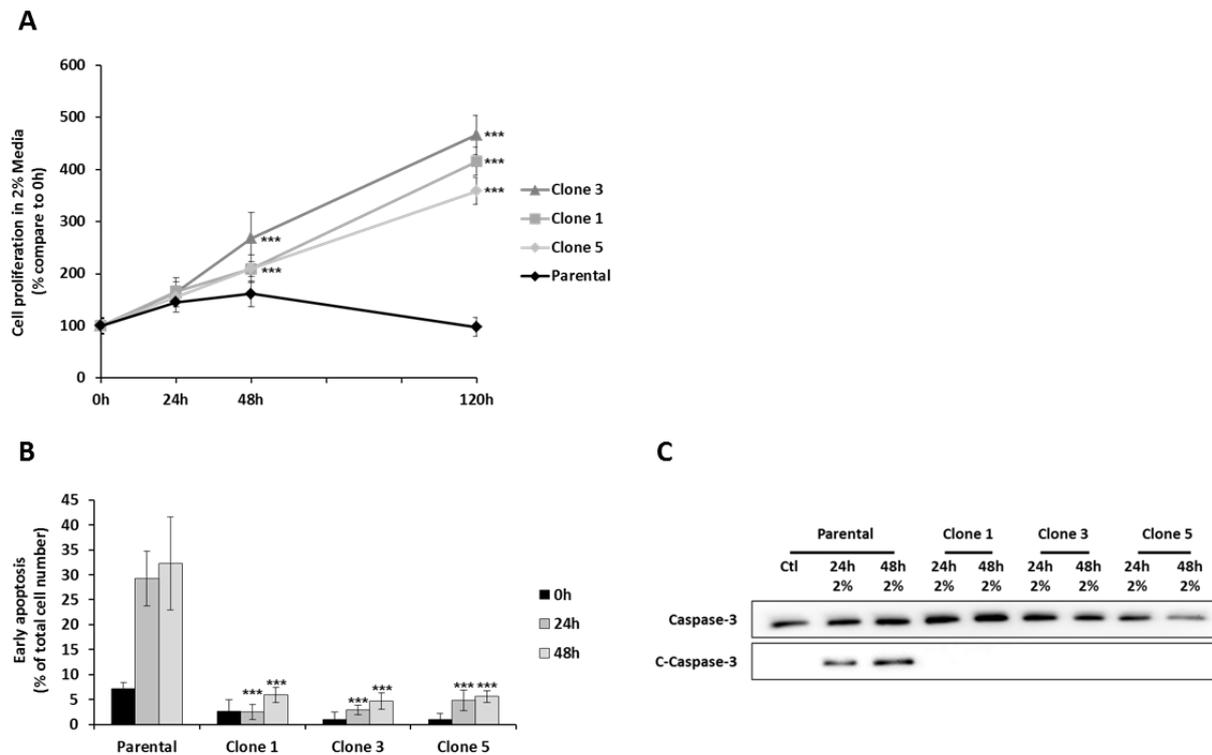


Figure 1: The AADR clones are resistant to the apoptosis induced by amino acid deprivation. (A) Proliferation assay of parental cells (Parental) and 3 independent clones (Clone 1, 3, 5) cultured for 24, 48 and 120 hours in 2% medium (Concentration of amino acid compared to the control medium). Cell numbers were determined by counting. For each cell type, cell number is expressed relative to the number of cells at 0h. The graph show means \pm S.E.M. of 3 independent experiments. Differences were assessed by 1-way ANOVA; *** indicates a significant difference ($p < 0,001$) between clones and parental cells. (B) Early apoptosis detection using hoechst 33342 labelling in parental cells and AADR clones cultured for 0, 24 and 48 hours in 2% medium. Results are expressed as the percentage of cells presenting high hoechst staining. Graph shows means \pm S.E.M. of 3 independent experiments. Differences were assessed by 1-way ANOVA; *** indicates a significant difference ($p < 0,001$) between clones and parental cells. (C) Parental cells and AADR clones were cultured in control medium (Ctl) or in 2% medium (2%) for 24h and 48h. Immunoblot analyses of caspase 3 cleavage were performed.

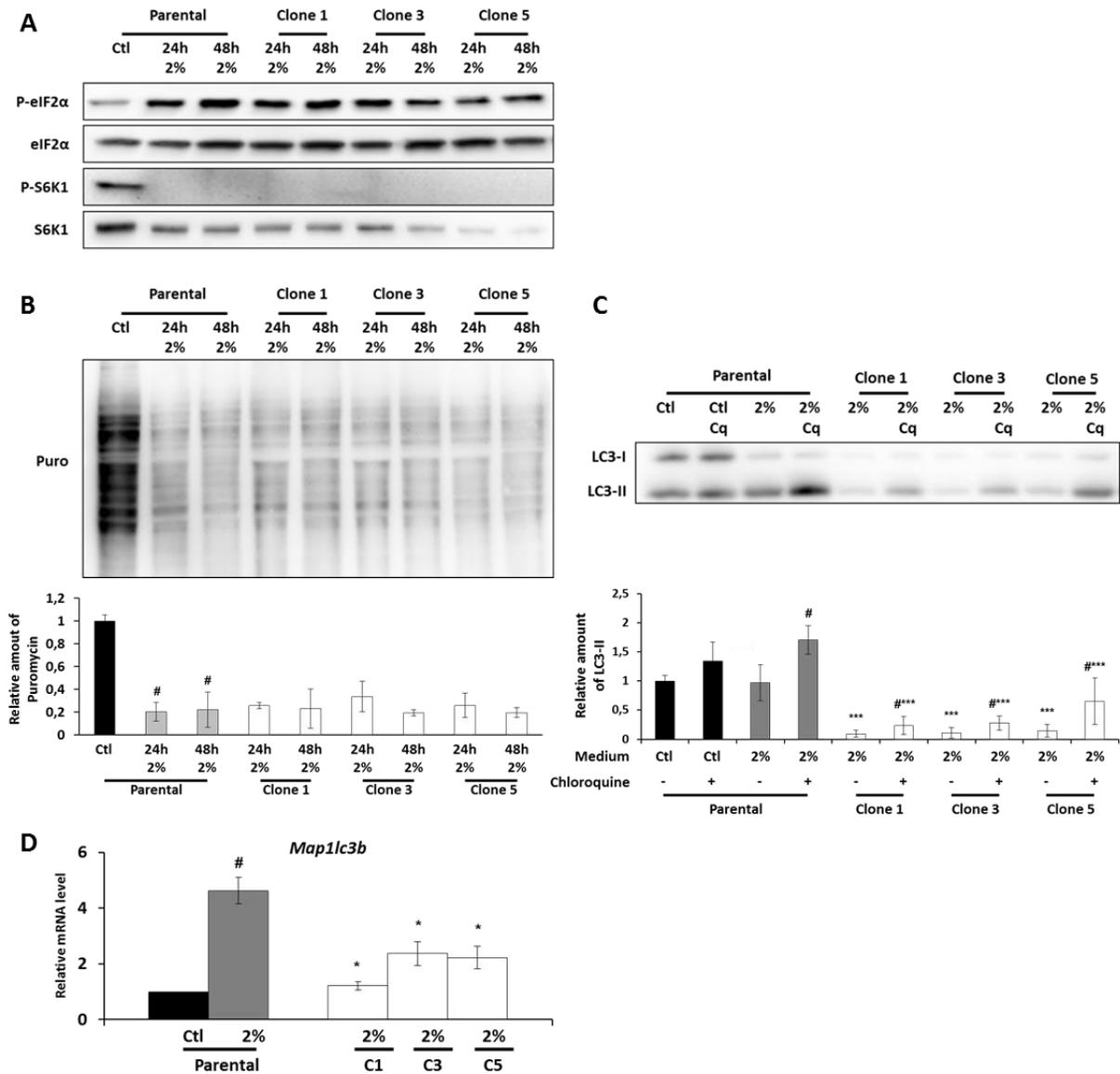


Figure 2: The GCN2 and the mTORC1 pathways are still regulated in the AADR clones. Parental cells (Parental) and AADR clones (Clone 1, 3, 5) were cultured in control medium (Ctl) or in 2% medium (2%) for 24h and 48h (A) Immunoblot analyses of eIF2α, S6K1 and their phosphorylated form were performed. (B) (Upper panel) Protein synthesis was measured by Sunset method, immunoblot analyses of puromycin incorporation into proteins were performed. (Lower panel) Puromycin incorporation was determined by densitometry analysis. Graph shows means ± S.E.M. of 3 independent experiments. Differences were assessed by 1-way ANOVA; # indicates a significant difference (p<0,001) compared to parental cells in control medium. (C) Parental cells and AADR clones were cultured for 24h in control medium or in 2% medium. When indicated, 20μM of chloroquine (Cq) was added during the last hour of treatment. (Upper panel) Immunoblot analyses of LC3B processing (LC3-I and LC3-II) were performed. (Lower panel) LC3-II level was determined by densitometry analysis and normalized by red ponceau. Graph shows means ± S.E.M. of 3 independent experiments. Differences were assessed by 1-way ANOVA; *** indicates a significant difference

($p < 0,001$) between clones and parental cells for a same treatment, # indicates a significant difference ($p < 0,01$) between cells treated or not with chloroquine. **(D)** Parental cells and AADR clones were cultured in control medium or in 2% medium for 24h. *Map1lc3b* mRNA level was determined and normalized by the level of β -actin mRNA, results are expressed relative to the value observed in parental cells in control medium. Graph shows means \pm S.E.M. of 5 independent experiments. Differences were assessed by 1-way ANOVA; # indicates a significant difference ($p < 0,001$) compared to parental cells in control medium, * indicates a significant difference ($p < 0,05$) between clones and parental cells.

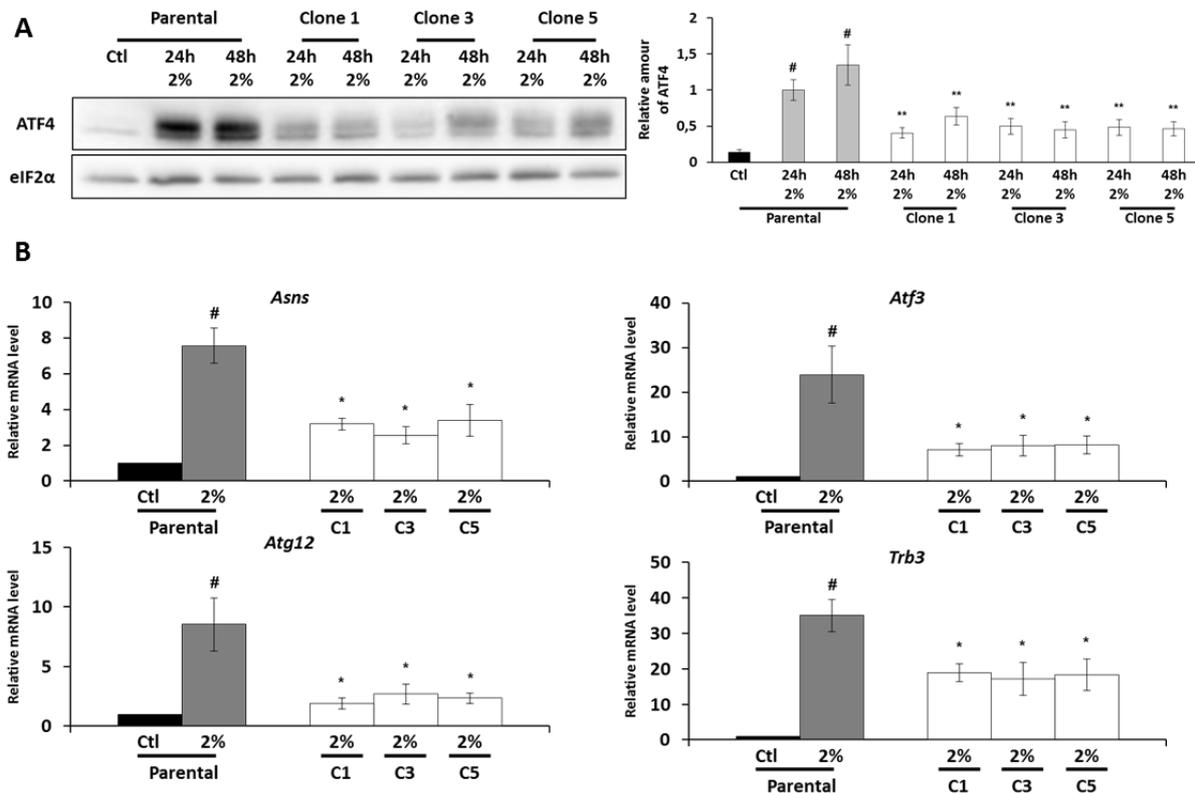


Figure 3: The expression of ATF4 protein and its target gene is diminished in the AADR clones.

Parental cells (Parental) and AADR clones (Clone 1, 2, 3) were cultured in control medium (Ctl) or in 2% medium (2%) for 24h and 48h. **(A)** (Left panel) Immunoblot analyses of ATF4 and eIF2 α were performed. (Right panel) ATF4 level was determined by densitometry analysis. Graph shows means \pm S.E.M. of 5 independent experiments. Differences were assessed by 1-way ANOVA. # indicates a significant difference ($p < 0,001$) compared to parental cells in control medium. ** indicates a significant difference ($p < 0,01$) compared to parental cells in 2% medium. **(B)** Parental cells and AADR clones were cultured in control medium or in 2% medium for 24h. *Asns*, *Atf3*, *Atg12* and *Trb3* mRNA levels were determined and normalized by the level of β -actin mRNA results are expressed relative to the value observed in parental cells in control medium. Graph show means \pm S.E.M. of 5 independent experiments. Differences were assessed by 1-way ANOVA; # indicates a significant difference ($p < 0,001$) compared to parental cells in control medium. * $p < 0,05$ compared to parental cells in 2% medium.

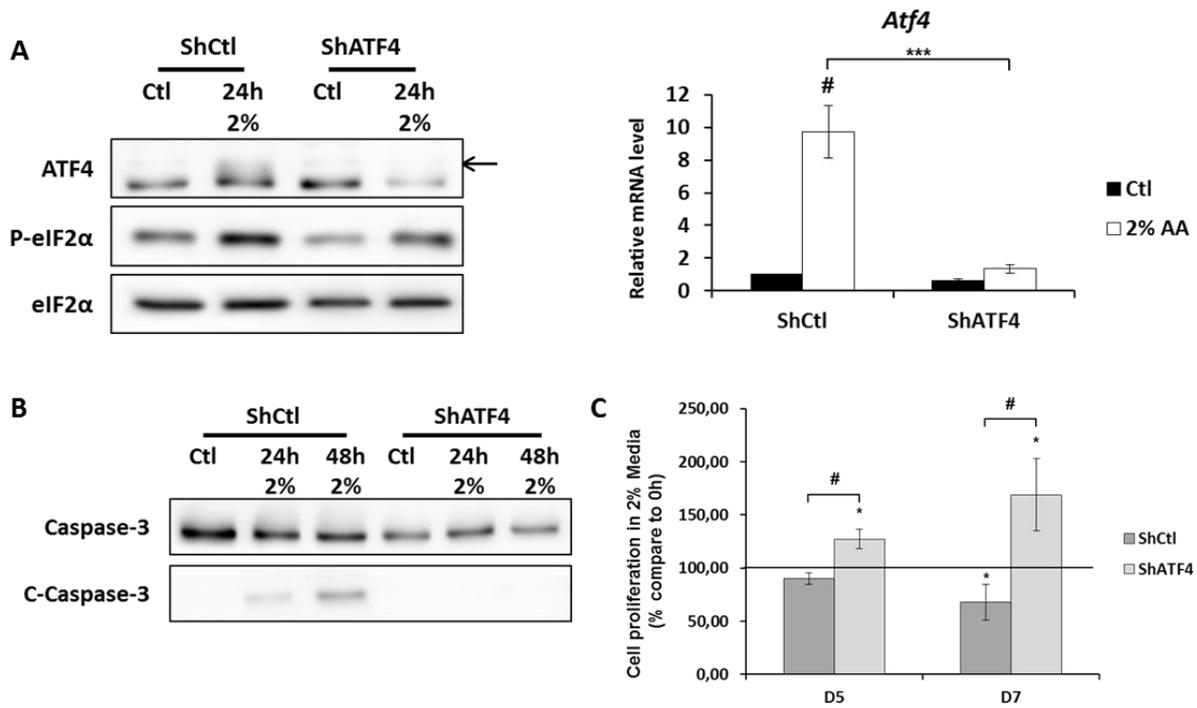


Figure 4: The knock-down of ATF4 expression in MEFs increases cell survival during amino acid deprivation.

MEFs were infected with a lentivirus expressing either a ShRNA control (ShCtl) or a ShRNA targeting ATF4 (ShATF4). (A) ShCtl cells (ShCtl) and ShATF4 cells (ShATF4) were cultured in control medium (Ctl) or in 2% medium (2%) for 24 hours. (Left panel) Immunoblot analyses of ATF4 and eIF2 α were performed. (Right panel) ATF4 mRNA level was determined and normalized by the level of β -actin mRNA, results are expressed relative to the value observed in ShCtl cells in control medium. Graph shows means \pm S.E.M. of 3 independent experiments. Differences were assessed by 1-way ANOVA; # indicates a significant difference ($p < 0,001$) compared to control medium *** indicates a significant difference ($p < 0,001$) compared to ShCtl cells in 2% medium. (B) ShCtl cells and ShATF4 cells were cultured in control medium or in 2% medium for 24 and 48 hours. Immunoblot analyses of caspase 3 cleavage were performed. (C) ShCtl cells and ShATF4 cells were cultured in 2% medium for 5 days (D5) and 7 days (D7). Cell numbers were determined by counting. For each cell type, cell number is expressed relative to the number of cells at 0h (represented by the black line). Graph shows means \pm S.E.M. of 3 independent experiments. Differences were assessed by 1-way ANOVA; # indicates a significant difference ($p < 0,01$) compared to ShCtl cells. ** indicates a significant difference ($p < 0,01$) compared to 0h.

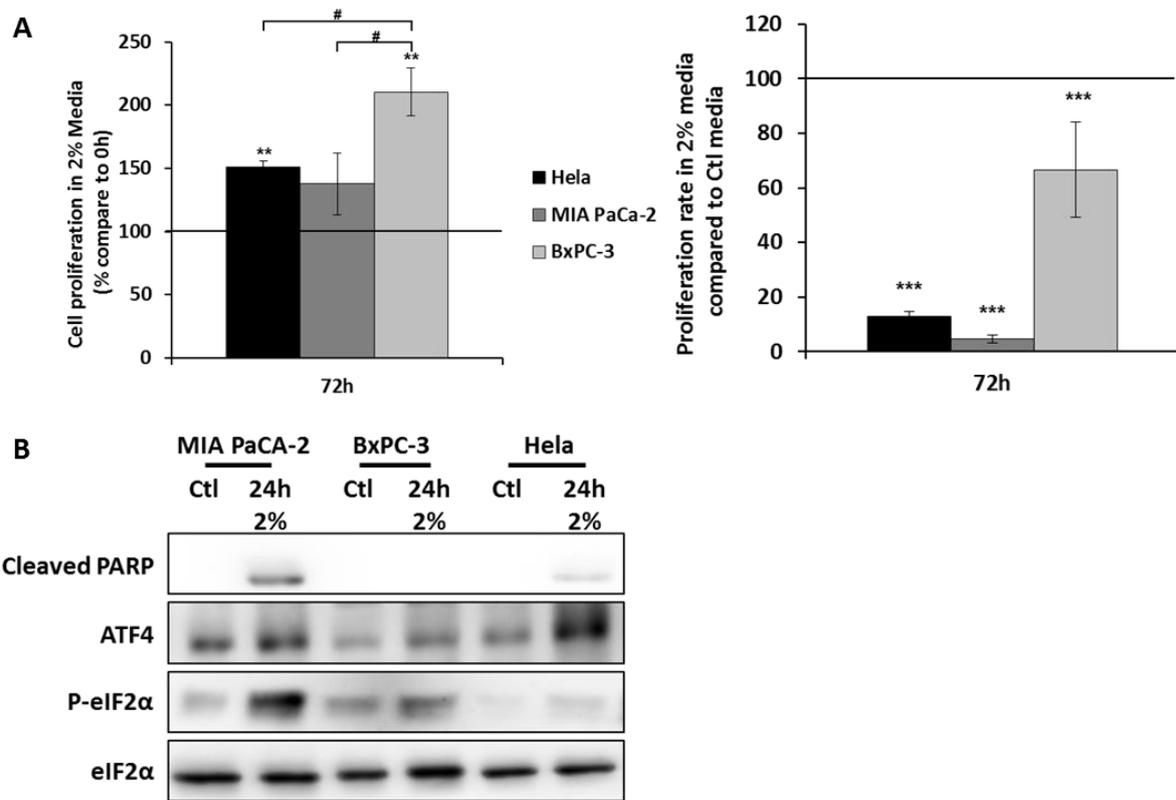


Figure 5: The expression of ATF4 is associated to the resistance to amino acid deprivation in the cancer cell line BxPC-3

(A) (Left panel) HeLa, MIA PaCa-2 and BxPC-3 were cultured in 2% medium (2%) for 72 hours. Cell numbers were determined by counting. For each cell type, cell number is expressed relative to the number of cells at 0h (represented by the black line). Graph shows means \pm S.E.M. of 3 independent experiments. Differences were assessed by 1-way ANOVA; # indicates a significant difference ($p < 0,001$) between cell lines. ** indicates a significant difference ($p < 0,01$) compared to 0h. (Right panel) HeLa, MIA PaCa-2 and BxPC-3 were cultured in control medium (Ctl) or in 2% medium (2%) for 72 hours. Cell numbers were determined by counting. For each cell type, cell number is expressed relative to the number of cells cultured in control medium for 72 hours (represented by the black line). Graph shows means \pm S.E.M. of 3 independent experiments. Differences were assessed by 1-way ANOVA; *** indicates a significant difference ($p < 0,001$) compared to control medium. (B) MIA PaCa2, BxPC-3 and HeLa cells were cultured control medium or 2% medium for 24 hours. Immunoblot analyses of ATF4, eIF2 α and its phosphorylated form and the cleaved form of PARP were performed.

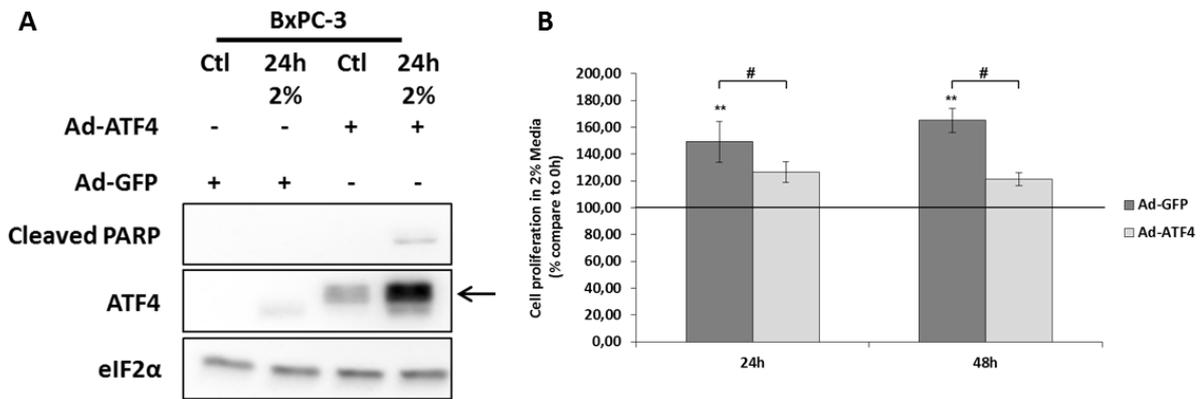


Fig 6: The overexpression of ATF4 in BxPC-3 induces cell death and reduces cell proliferation during amino acid deprivation.

BxPC-3 cells were infected with adenovirus expressing either GFP (Ad-GFP) or mouse form of ATF4 (Ad-ATF4). **(A)** Cells infected with either Ad-GFP or Ad-ATF4 were cultured in control medium (Ctl) or in 2% medium (2%) for 24 hours. Immunoblot analyses of ATF4, eIF2 α and the cleaved form of PARP were performed. The arrow indicates the mouse form of ATF4. **(B)** Cells infected with either Ad-GFP or Ad-ATF4 were cultured in 2% medium for 24 and 48 hours. Cell numbers were determined by counting. For each cell type, cell number is expressed relative to the number of cells at 0h (represented by the black line). Graph shows means \pm S.E.M. of 3 independent experiments. Differences were assessed by 1-way ANOVA; # indicates a significant difference ($p < 0,001$) between cells infected with Ad-GFP and Ad-ATF4, ** indicates a significant difference ($p < 0,01$) compared to 0h.

Materials and Methods

Cell culture and treatment conditions

Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were cultured at 37°C in humidified 5% CO₂ atmosphere in control medium prepared from Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma) containing 10% fetal bovine serum and supplemented with non-essential amino acid mix (Gibco), glutamine, penicillin/streptomycin and gentamycin. HeLa cervical cancer cell line, MIA PaCA-2 and BxPC-3 pancreatic cancer cell lines were cultured in control medium. MIA PaCA-2 and BxPC-3 were kindly given by Dr. S. Pyronnet (CRCT, INSERM, Toulouse, France). Prior to amino acid starvation experiments, cells were washed twice with phosphatebuffered saline (PBS) and refed with the appropriate medium.

To obtain cells resistant to amino acid deprivation, MEFs cells were seeded in several dish plates and exposed to mediums with decreased concentration of amino acids. Those mediums were made by diluting the control medium with DMEM lacking all amino acids and supplemented with 10% of dialyzed fetal bovine serum. The concentration of amino acid was gradually decreased during several weeks causing severe growth arrest and cell death. The last remaining cells were exposed to the medium containing only 2% of the AMINO ACID present in the control medium (medium named 2% medium) again for several weeks. Few cells survived and formed individual clones. Three clones were selected from 3 independent plates and were continuously cultured in the 2% medium. The cells from which clones were derived were thus called parental cells.

Analysis of gene expression using real time RT-PCR

Total RNA was prepared using RNeasy mini kit (Qiagen) and treated with DNase I, Amp Grade (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) prior to cDNA synthesis. RNA integrity was electrophoretically verified by ethidium bromide staining. RNA (1 µg) was reverse transcribed with 100 U of Superscript II plus RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen)

using 100 μ M random hexamer primers (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), according to the manufacturer's instructions. Real-time quantitative PCR was carried out on a Bio-Rad CFX-96 detection system with quantitative qPCR SYBR Green reagents (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and with a primer concentration of 0.5 μ M. For a list of primer sequences, see Supplementary Table S1. PCR conditions were standardized to 39 cycles of:

95°C for 08 s, 59°C for 05 s and 72°C for 10 s. **Antibodies** eIF2 α , P-eIF2 α (Ser51), Total S6K1, P-S6K1 (T389), Cleaved PARP, total and cleaved caspase-3 antibodies were purchased from Cell Signaling Technologies, ATF4 (SC-200) from Santa Cruz and MAP1LC3B antibody from Novus. Antibody Puromycin (clone 12D10) was kindly given by Phillippe Pierre (Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, France).

Immunoblot analysis

Cells were lysed in a lysis buffer containing (50 mM Tris, 25 mM β -glycerophosphate, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5% (v/v) Triton X100, 1 mM DTT, 1 mM benzamidine, protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma). Proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto a Hybond-P PVDF membrane (Amersham Biosciences). Membranes were blocked for 1 h at room temperature with a solution of 5% nonfat milk powder in TN (50mM Tris-HCL, pH 8.0, 150mM NaCl, 0.1% Tween-20). The blots were then incubated with antibody in blocking solution overnight at 4°C. Antibodies were diluted according to the manufacturer's instructions. The blots were washed three times in TN and incubated with horseradish peroxidase conjugated goat antiIgG (1:5000) (Santa Cruz, CA) in blocking buffer for 1 h at room temperature. After three washes, the blots were developed using the LuminataTM Western HRP substrate (Millipore Billerica, MA).

Establishment of stable cell lines expressing ShRNA.

The lentiviral vectors harboring ATF4 and control shRNA sequences were obtained from Sigma-Aldrich (Mission TRC shRNA collections). The lentiviral particles were produced by EVIR (Enveloppes Virales et Ingénierie des Rétrovirus, Unité de Virologie Humaine, Inserm U758, Ecole Normale Supérieure de Lyon, France). MEFs cells were seeded in 6 wells plates and infected the next day with lentivirus expressing either a control ShRNA or the ShRNA targeting ATF4 at a Multiplicity of Infection (MOI) of 25. Twenty four hours after the infection, cells were washed twice and refed with DMEM medium containing the selective agent puromycin. Hoechst 33342 staining assay/Fluorescent microscopy evaluation of cell apoptosis and morphology

Cells were stained with 2 µg/mL of Hoechst 33342 for 5 min at 37°C. Then, cells were washed twice with PBS and refed with amino acids deprived medium. Hoechst 33342 fluorescence was assessed using Zen microscope (Zeiss) with DAPI filter (Excitation 353 nm/ Emission 465 nm). Early apoptotic cells were detected by strong Hoechst staining which represented the condensation of nuclear chromatin and its fragmentation. For each cell types and conditions, several random areas were selected for a total count of approximatively 300 cells. The number of apoptotic cells was normalized to the total number of cells in each area. **Cell proliferation assays**

Cells were plated in 12-wells plates and, the next day, cultured in either control medium or in amino acid-deprived medium. The proliferation rate of each cell types was assessed by counting 3 wells for each time points using Beckman coulter counter Z1. The number of cells was normalized according to the number of cells counted at the beginning of the experiment.

Adenoviral Infection

Cells were plated the day prior infection. The next day, cells were washed twice and refed with control medium without FBS. Infection with adenovirus expressing either GFP or mouse

ATF4 was carried at a multiplicity of infection of 100. After 8h of infection, FBS was added to the medium for a final concentration of 10%. After 24h of infection, the cells were washed twice and refed with either control medium or 2% medium. Adenovirus were kindly given by Guozhi Xiao (Rush University Medical Center, Chicago, USA).

Statistical analysis

All data are expressed as means \pm SEM. Differences between samples were assessed by oneway ANOVA (fisher test).

Acknowledgement: This work was supported by grants from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and from Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer. F. Mesclon was supported by INRA and Auvergne-Rhône-Alpes grant.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood Flow, Oxygen and Nutrient Supply, and Metabolic Microenvironment of Human Tumors: A Review. *Cancer Res.* 1989; 49: 6449–65.
2. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature.* 1996; 379: 88–91.
3. Bristow RG, Hill RP. Hypoxia and metabolism: Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8: 180–92.
4. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature.* 2006; 441: 437–43.
5. Harris AL. Hypoxia — a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2: 38–47.
6. Muñoz-Pinedo C, El Mjiyad N, Ricci J-E. Cancer metabolism: current perspectives and future directions. *Cell Death Dis.* 2012; 3: e248.

7. Geck RC, Toker A. Nonessential amino acid metabolism in breast cancer. *Adv Biol Regul* [Internet]. [cited 2016 May 8]; .
8. Schulze A, Harris AL. How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature*. 2012; 491: 364–73.
9. Parks SK, Cormerais Y, Marchiq I, Pouyssegur J. Hypoxia optimises tumour growth by controlling nutrient import and acidic metabolite export. *Mol Aspects Med*. 2016; 47– 48: 3–14.
10. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11: 85–95.
11. Kim D, Fiske BP, Birsoy K, Freinkman E, Kami K, Possemato RL, Chudnovsky Y, Pacold ME, Chen WW, Cantor JR, Shelton LM, Gui DY, Kwon M, et al. SHMT2 drives glioma cell survival in ischaemia but imposes a dependence on glycine clearance. *Nature*. 2015; 520: 363–7.
12. Lee GY, Haverty PM, Li L, Kljavin NM, Bourgon R, Lee J, Stern H, Modrusan Z, Seshagiri S, Zhang Z, Davis D, Stokoe D, Settleman J, et al. Comparative Oncogenomics Identifies PSMB4 and SHMT2 as Potential Cancer Driver Genes. *Cancer Res*. 2014; 74: 3114–26.
13. B’Chir W, Chaveroux C, Carraro V, Averous J, Maurin AC, Jousse C, Muranishi Y, Parry L, Fafournoux P, Bruhat A. Dual role for CHOP in the crosstalk between autophagy and apoptosis to determine cell fate in response to amino acid deprivation. *Cell Signal*. 2014; 26: 1385–91.
14. Berlanga JJ, Santoyo J, De Haro C. Characterization of a mammalian homolog of the GCN2 eukaryotic initiation factor 2alpha kinase. *Eur J Biochem FEBS*. 1999; 265: 754– 62.
15. Vattem KM, Wek RC. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U A*. 2004; 101: 11269–74.
16. Deval C, Chaveroux C, Maurin AC, Cherasse Y, Parry L, Carraro V, Milenkovic D, Ferrara M, Bruhat A, Jousse C, Fafournoux P. Amino acid limitation regulates the expression of genes involved in several specific biological processes through GCN2dependent and GCN2-independent pathways. *Febs J*. 2009; 276: 707–18.
17. Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA, Snyder SH, Sabatini DM. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 1432–7.
18. Guertin DA, Sabatini DM. An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol Med*. 2005; 11: 353–61.

19. Tsun Z-Y, Possemato R. Amino acid management in cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2015; 43: 22–32.
20. Cormerais Y, Giuliano S, LeFloch R, Front B, Durivault J, Tambutté E, Massard P-A, Ballina LR de la, Endou H, Wempe MF, Palacin M, Parks SK, Pouyssegur J. 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. *Cancer Res.* 2016; : canres.3376.2015.
21. van Geldermalsen M, Wang Q, Nagarajah R, Marshall AD, Thoeng A, Gao D, Ritchie W, Feng Y, Bailey CG, Deng N, Harvey K, Beith JM, Selinger CI, et al. ASCT2/SLC1A5 controls glutamine uptake and tumour growth in triple-negative basallike breast cancer. *Oncogene.* 2016; 35: 3201–8.
22. Wang Y, Ning Y, Alam GN, Jankowski BM, Dong Z, Nör JE, Pulverini PJ. Amino Acid Deprivation Promotes Tumor Angiogenesis through the GCN2/ATF4 Pathway. *Neoplasia N Y NY.* 2013; 15: 989.
23. Ye J, Kumanova M, Hart LS, Sloane K, Zhang H, De Panis DN, Bobrovnikova-Marjon E, Diehl JA, Ron D, Koumenis C. The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *EMBO J.* 2010; 29: 2082– 96.
24. Wei C, Lin M, Jinjun B, Su F, Dan C, Yan C, Jie Y, Jin Z, Zi-Chun H, Wu Y. Involvement of general control nonderepressible kinase 2 in cancer cell apoptosis by posttranslational mechanisms. *Mol Biol Cell.* 2015; 26: 1044–57.
25. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; 13: 89–102.
26. Mazure NM, Pouyssegur J. Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? *Curr Opin Cell Biol.* 2010; 22: 177–80.
27. Sakai W, Swisher EM, Karlan BY, Agarwal MK, Higgins J, Friedman C, Villegas E, Jacquemont C, Farrugia DJ, Couch FJ, Urban N, Taniguchi T. Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature.* 2008; 451: 1116– 20.
28. Daver N, Cortes J, Ravandi F, Patel KP, Burger JA, Konopleva M, Kantarjian H. Secondary mutations as mediators of resistance to targeted therapy in leukemia. *Blood.* 2015; 125: 3236–45.
29. Gibaja V, Shen F, Harari J, Korn J, Ruddy D, Saenz-Vash V, Zhai H, Rejtar T, Paris CG, Yu Z, Lira M, King D, Qi W, et al. Development of secondary mutations in wildtype and mutant EZH2 alleles cooperates to confer resistance to EZH2 inhibitors. *Oncogene.* 2016; 35: 558–66.

30. Sadasivan S, Waghray A, Lerner SF, Jr WAD, Hayes RL, Wang KKW. Amino acid starvation induced autophagic cell death in PC-12 cells: Evidence for activation of caspase-3 but not calpain-1. *Apoptosis*. 2006; 11: 1573–82.
31. Leprivier G, Remke M, Rotblat B, Dubuc A, Mateo A-RF, Kool M, Agnihotri S, ElNaggar A, Yu B, Prakash Somasekharan S, Faubert B, Bridon G, Tognon CE, et al. The eEF2 Kinase Confers Resistance to Nutrient Deprivation by Blocking Translation Elongation. *Cell*. 2013; 153: 1064–79.
32. Blommaart EFC, Luiken JJFP, Blommaart PJE, Woerkom GM van, Meijer AJ. Phosphorylation of Ribosomal Protein S6 Is Inhibitory for Autophagy in Isolated Rat Hepatocytes. *J Biol Chem*. 1995; 270: 2320–6.
33. Talloczy Z, Jiang W, Virgin HW th, Leib DA, Scheuner D, Kaufman RJ, Eskelinen EL, Levine B. Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U A*. 2002; 99: 190–5.
34. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan JL, Oshiro N, Mizushima N. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*. 2009; 20: 1981–91.
35. Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell*. 2009; 20: 1992–2003.
36. B'chir W, Maurin A-C, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, Parry L, Stepien G, Fafournoux P, Bruhat A. The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41: 7683–99.
37. Meijer AJ, Lorin S, Blommaart EF, Codogno P. Regulation of autophagy by amino acids and MTOR-dependent signal transduction. *Amino Acids [Internet]*. 2014; .
38. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, Adachi H, Adams CM, Adams PD, Adeli K, Adihetty PJ, Adler SG, Agam G, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016; 12: 1–222.
39. Rzymiski T, Milani M, Pike L, Buffa F, Mellor HR, Winchester L, Pires I, Hammond E, Ragoussis I, Harris AL. Regulation of autophagy by ATF4 in response to severe hypoxia. *Oncogene*. 2010; 29: 4424–35.
40. Rouschop KM, van den Beucken T, Dubois L, Niessen H, Bussink J, Savelkouls K, Keulers T, Mujcic H, Landuyt W, Voncken JW, Lambin P, van der Kogel AJ, Koritzinsky M,

- et al. The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest.* 2010; 120: 127–41.
41. Averous J, Bruhat A, Jousse C, Carraro V, Thiel G, Fafournoux P. Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *J Biol Chem.* 2004; 279: 5288–97.
 42. Ohoka N, Yoshii S, Hattori T, Onozaki K, Hayashi H. TRB3, a novel ER stressinducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J.* 2005; 24: 1243–55.
 43. Jiang H-Y, Wek SA, McGrath BC, Lu D, Hai T, Harding HP, Wang X, Ron D, Cavener DR, Wek RC. Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response. *Mol Cell Biol.* 2004; 24: 1365–77.
 44. Siu F, Bain PJ, LeBlanc-Chaffin R, Chen H, Kilberg MS. ATF4 Is a Mediator of the Nutrient-sensing Response Pathway That Activates the Human Asparagine Synthetase Gene. *J Biol Chem.* 2002; 277: 24120–7.
 45. Guillaumond F, Leca J, Olivares O, Lavaut M-N, Vidal N, Berthezène P, Dusetti NJ, Loncle C, Calvo E, Turrini O, Iovanna JL, Tomasini R, Vasseur S. Strengthened glycolysis under hypoxia supports tumor symbiosis and hexosamine biosynthesis in pancreatic adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci.* 2013; 110: 3919–24.
 46. Koong AC, Mehta VK, Le QT, Fisher GA, Terris DJ, Brown JM, Bastidas AJ, Vierra M. Pancreatic tumors show high levels of hypoxia. *Int J Radiat Oncol.* 2000; 48: 919–22.
 47. Izuishi K, Kato K, Ogura T, Kinoshita T, Esumi H. Remarkable Tolerance of Tumor Cells to Nutrient Deprivation: Possible New Biochemical Target for Cancer Therapy. *Cancer Res.* 2000; 60: 6201–7.
 48. Benjamin D, Colombi M, Moroni C, Hall MN. Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2011; 10: 868–80.
 49. Lassot I, Ségéral E, Berlioz-Torrent C, Durand H, Groussin L, Hai T, Benarous R, Margottin-Goguet F. ATF4 Degradation Relies on a Phosphorylation-Dependent Interaction with the SCF β TrCP Ubiquitin Ligase. *Mol Cell Biol.* 2001; 21: 2192–202.
 50. Cho H, Wu M, Zhang L, Thompson R, Nath A, Chan C. Signaling dynamics of palmitate-induced ER stress responses mediated by ATF4 in HepG2 cells. *BMC Syst Biol.* 2013; 7: 9.
 51. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D. Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells. *Mol Cell.* 2000; 6: 1099–108.

52. Iurlaro R, Muñoz-Pinedo C. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *FEBS J.* 2015; : n/a-n/a.
53. Wek RC, Jiang H-Y, Anthony TG. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans.* 2006; 34: 7–11.
54. Han J, Back SH, Hur J, Lin Y-H, Gildersleeve R, Shan J, Yuan CL, Krokowski D, Wang S, Hatzoglou M, Kilberg MS, Sartor MA, Kaufman RJ. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol.* 2013; 15: 481–90.
55. Moore CEJ, Wang X, Xie J, Pickford J, Barron J, Regufe da Mota S, Versele M, Proud CG. Elongation factor 2 kinase promotes cell survival by inhibiting protein synthesis without inducing autophagy. *Cell Signal.* 2016; 28: 284–93.
56. Wu H, Yang J-M, Jin S, Zhang H, Hait WN. Elongation Factor-2 Kinase Regulates Autophagy in Human Glioblastoma Cells. *Cancer Res.* 2006; 66: 3015–23.
57. Py BF, Boyce M, Yuan J. A critical role of eEF-2K in mediating autophagy in response to multiple cellular stresses. *Autophagy.* 2009; 5: 393–6.

Supplementary data

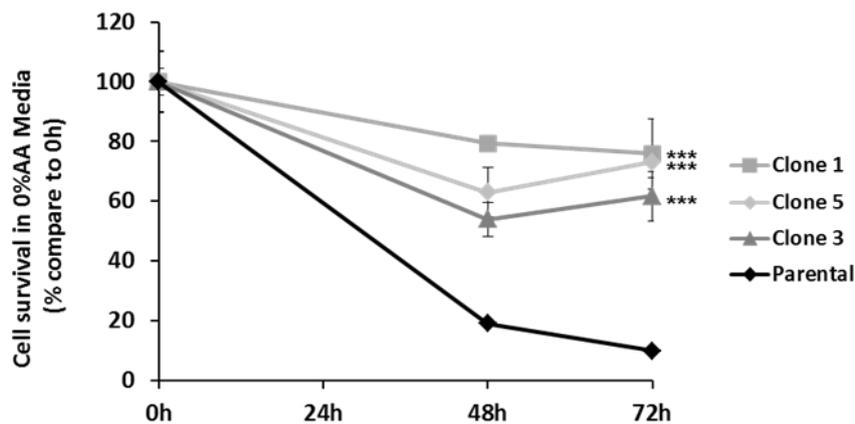


Figure S1 : The AADR Clones are more resistant to total amino acid deprivation than their parental cells. Parental cells (Parental) and AADR clones (Clone 1, 2, 3) were cultured in medium lacking all amino acids for 48 hours and 72 hours. Cell numbers were determined by counting. For each cell type, cell number is expressed relative to the number of cells at 0h. Graph shows means \pm S.E.M. of 3 independent experiments. Differences were assessed by 1-way ANOVA; *** indicates a significant difference ($p < 0,001$) between parental cells and clones.

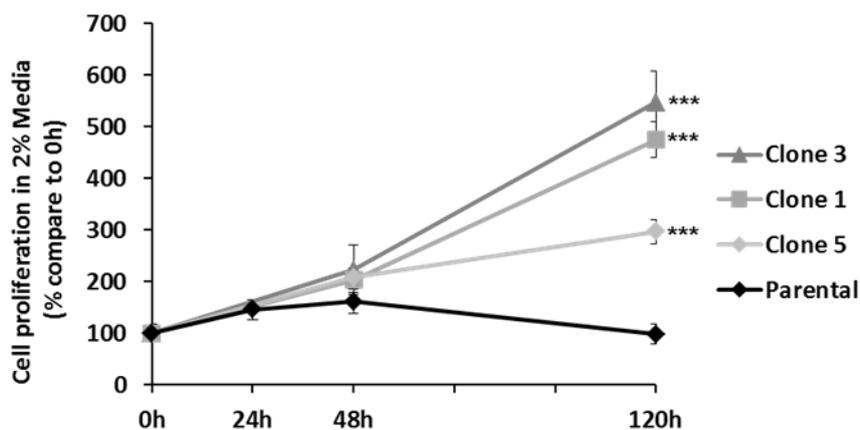


Figure S2 : The capacity of the AADR clones to grow in 2% medium is a stable characteristic.

AADR clones (Clone 1, 3, 5) were cultured for 1 week in control medium. Then, parental cells (Parental) and AADR clones were cultured in 2% medium for 24, 48 and 120 hours. Cell numbers were determined by counting. For each cell type, cell number is expressed relative to the number of cells at 0h. Graph shows means \pm S.E.M. of 3 independent experiments. Differences were assessed by 1-way ANOVA; *** indicates a significant difference ($p < 0,001$) between parental cells and clones.

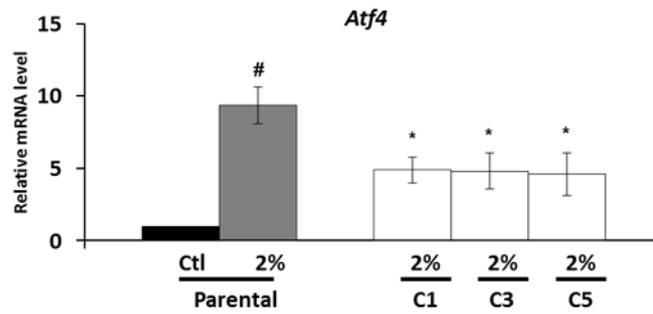


Figure S3 : The expression of ATF4 mRNA is decreased in the AADR clones.

Parental cells (Parental) and AADR clones (C1, C3, C5) were cultured in control medium (Ctl) or in 2% medium (2%) for 24 hours. *Atf4* mRNA level was determined and normalized by the level of β -actin mRNA, results are expressed relative to the value observed in parental cells in control medium. Graph shows means \pm S.E.M. of 5 independent experiments. Differences were assessed by 1-way ANOVA; # indicates a significant difference ($p < 0,001$). * indicates a significant difference ($p < 0,05$) compared to parental cells in 2% medium for 24h.

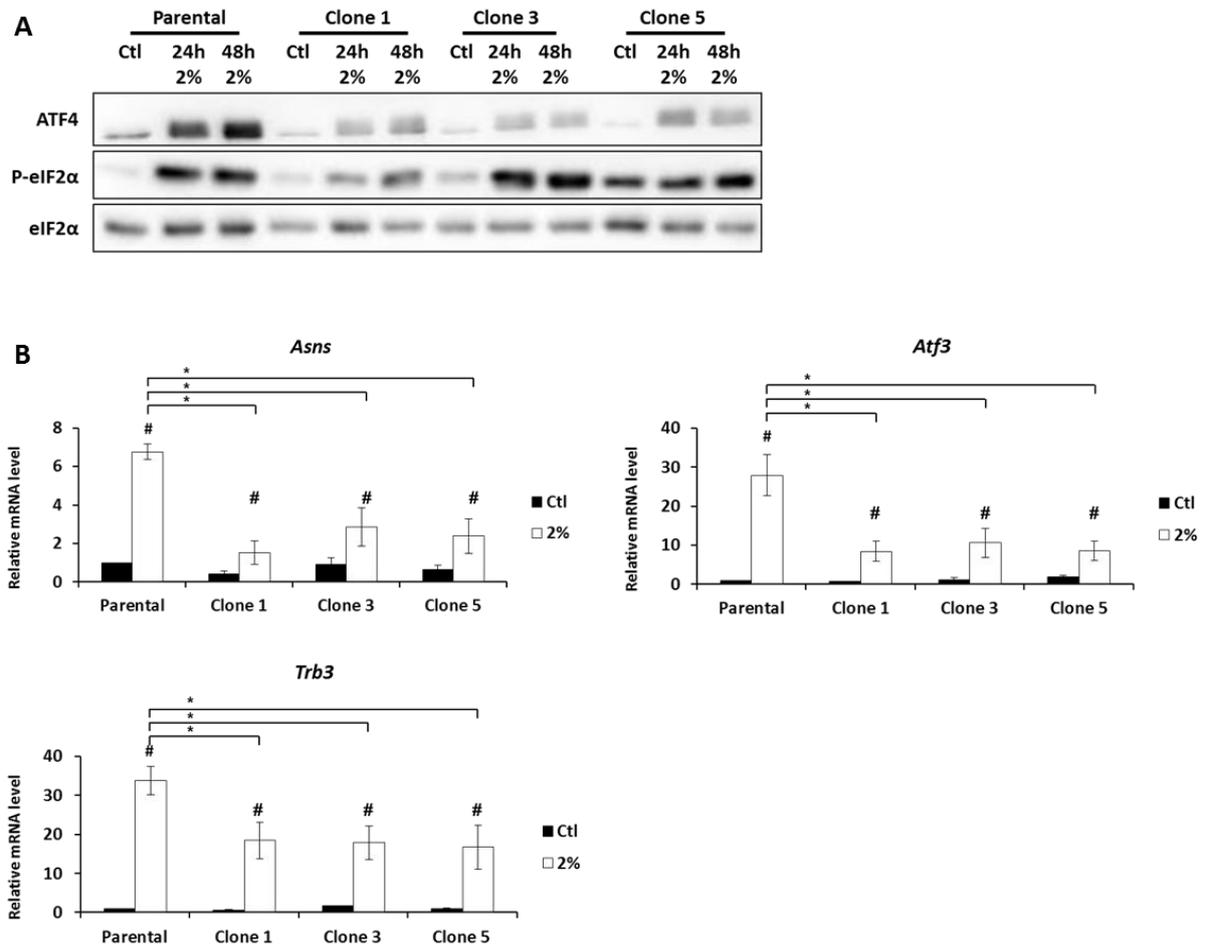


Figure S4 : The decrease of ATF4 protein level is a stable characteristic of the AADR clones.

AA DR clones (Clone 1, 3, 5) were cultured for 2 weeks in control medium prior experiment. **(A)** Parental cells (Parental) and AADR clones (Clone 1, 2, 3) were cultured in control medium (Ctl) or in 2% medium (2%) for 24 hours and 48 hours. Immunoblot analysis of ATF4, eIF2 α and its phosphorylated form were performed. **(B)** Parental cells and AADR clones were cultured in control medium and in 2% medium for 24 hours. *Asns*, *Atf3*, *Atg12* and *Trb3* mRNA levels were determined and normalized by the level of β -actin mRNA, results are expressed relative to the value observed in parental cells in control medium. Graph show means \pm S.E.M. of 5 independent experiments. Differences were assessed by 1-way ANOVA; # indicates a significant difference ($p < 0,01$) compared to control medium. * indicates a significant difference ($p < 0,05$) compared to parental cells in 2% medium.

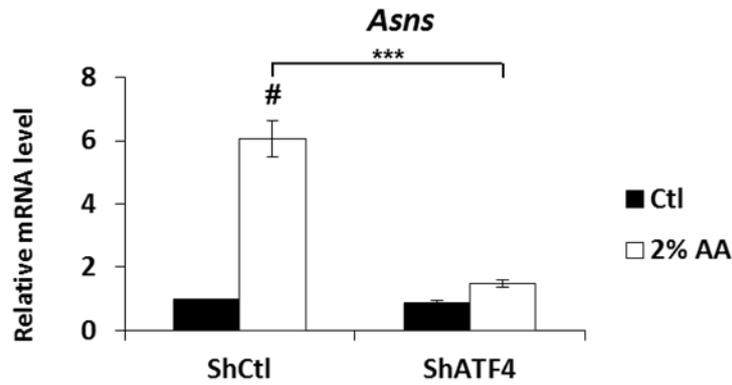


Figure S5 : The expression of *Asns* mRNA is decreased in cells expressing ShATF4.

MEFs were infected with a lentivirus expressing either a ShRNA control (ShCtl) or a ShRNA targeting ATF4 (ShATF4). (A) ShCtl cells (ShCtl) and ShATF4 cells (ShATF4) were cultured in control medium (Ctl) or in 2% medium (2%) for 24 hours. *Asns* mRNA levels were determined and normalized by the level of β -actin mRNA, results are expressed relative to the value observed in parental cells in control medium. Graph shows means \pm S.E.M. of 3 independent experiments. Differences were assessed by 1-way ANOVA; # indicates a significant difference ($p < 0,001$) compared to control medium; *** indicates a significant difference ($p < 0,001$) between ShCtl and ShATF4 cells in 2% medium.

Supplementary Materials table 1.

qPCR primers

Gene	Forward	Reverse
<i>Asns</i>	5'-ACAACCACAAGGCGCTACA-3'	5'-AAGGGCCTGACTCCATAGGT-3'
<i>Atf3</i>	5'-CCAGGTCTCTGCCTCAGAAG-3'	5'-CATCTCCAGGGGTCTGTTGT-3'
<i>Atf4</i>	5'-TCGATGCTCTGTTTCGAATG-3'	5'-AGAATGTAAAGGGGGCAACC-3'
<i>Atg12</i>	5'-GGAGACACTCCTATAATGAAA-3'	5'-ATAAATAAACAACACTGTTCCGA-3'
<i>Map1lc3b</i>	5'-CGTCCTGGACAAGACCAAGT-3'	5'-ACCATGTACAGGAAGCCGTC-3'
<i>Trb3</i>	5'-CCAGAGATACTCAGCTCCCG-3'	5'-GAGGAGACAGCGGATCAGAC-3'
β -actin	5'-TACAGCTTCACCACCACAGC-3'	5'-AAGGAAGGCTGGAAAAGAGC-3'

Projet 2

Florent Mesclon, Sarah Lambert-Langlais, Valérie Carraro, Laurent Parry, Céline Jousse, Anne-Catherine Maurin, Alain Bruhat, Pierre Fafournoux, and Julien Averous

« Adaptation des cellules cancéreuses à des carences prolongées en acides aminés : quelle stratégie les cellules mettent-elles en place afin de subvenir à leurs besoins ? »

I. Introduction

Dans le premier projet, nous avons pu observer que la sous-expression d'ATF4 participerait à la résistance des clones AADR à l'apoptose induite par le milieu carencé en acides aminés. Pour continuer à les caractériser, nous nous sommes intéressés à leur capacité de prolifération en milieu 2%AA. En effet, la quantité d'acides aminés libres et notamment d'acides aminés indispensables dans le milieu 2%AA ne semble pas pouvoir expliquer la quantité de protéines générées par la prolifération des clones sur 72 heures.

La composition du milieu 2%AA par rapport au milieu contrôle ne diffère que par la quantité d'acides aminés. Les autres éléments du milieu sont en concentration identique que ce soit le glucose (4,5 g/L) ou la quantité de SVF dialysé (10%). Comme il a été décrit dans l'introduction bibliographique, il existe des voies de synthèse des acides aminés non indispensables passant notamment par l'utilisation du glucose et le cycle de Krebs. Toutefois, les cellules doivent se fournir en acides aminés indispensables qui ne peuvent être synthétisés.

La seule autre forme d'acides aminés dans le milieu de culture est représentée par les différentes protéines du sérum (facteurs de croissance, albumine...). Tout comme les acides aminés, la membrane plasmique des cellules est imperméable aux protéines. Parmi les mécanismes d'entrée des protéines, la macropinocytose fait partie de ceux qui ont été associés à la capacité de survie de cellules cancéreuses à des carences nutritionnelles (Commisso et al., 2013).

Comme décrit dans l'introduction bibliographique (Chapitre III-V—B-4), la macropinocytose est une forme d'endocytose non sélective permettant à la cellule de capter différents éléments de l'environnement extracellulaire dont les protéines et les acides aminés. Ce mécanisme est particulièrement sensible à des modifications du pH sous-membranaire qui vont pouvoir affecter la polymérisation de l'actine. Des drogues telle que l'amiloride ou un de ses dérivés, l'EIPA, sont connues pour perturber la macropinocytose en agissant sur le pH via l'inhibition des pompes Na^+/H^+ (Meier et al., 2002). Des expériences de xénogreffes de tumeurs sur souris ont déjà montré que cibler ces pompes par l'EIPA réduisait le niveau de macropinocytose des tumeurs mais également leur croissance (Commisso et al., 2013; Yang et al., 2011). Le but de ce projet a été : (1) confirmer l'hypothèse que les clones AADR utilisent les protéines du milieu pour proliférer ; (2) déterminer si la macropinocytose est impliquée dans ce processus d'utilisation des protéines.

Les premières expériences ont consisté à exposer les clones AADR à des milieux carencés en un acide aminé indispensable ou à une restriction en sérum pour confirmer que les clones AADR utilisaient les protéines du milieu pour leur survie. Ensuite, des expériences ont été réalisées pour étudier plus spécifiquement la macropinocytose.

Le projet étant toujours en cours, les travaux présentés ne sont pas tous achevés, certains nécessitent de nouvelles expériences qui seront discutées en parallèle des résultats.

II. Matériels et Méthodes

A. Culture cellulaire et conditions expérimentales

Dans cette étude, nous avons utilisé les clones AADR qui ont été générés lors du premier projet ainsi que leurs cellules parentales, des MEFs. Les cellules parentales ont été entretenues dans un milieu DMEM complété avec 10% de SVF (sérum de veau fœtal), un mix d'acides aminés non essentiels et de glutamine ainsi que des antibiotiques. Ce milieu sera appelé milieu contrôle par la suite. Les clones AADR ont été maintenus dans un milieu 2%AA créé par la dilution du milieu contrôle avec un milieu DMEM sans acides aminés et complété avec du SVF dialysé (Cf. ; Chapitre création du modèle). Pour créer les milieux carencés en un acide aminé indispensable, le milieu contrôle a été remplacé par un milieu DMEM/F12 privé d'un acide aminé (la leucine ou la méthionine). Des expériences ont également été réalisées en absence de SVF et en présence ou non d'albumine de sérum bovin (BSA). Avant toute utilisation, la BSA fut préalablement diluée dans de l'eau miLiQ puis dialysée pendant 24h. La solution de BSA a été ensuite filtrée et dosée afin d'obtenir la concentration voulue pour nos expériences. Pour toutes les expériences de carences effectuées, les cellules ont été préalablement lavées deux fois avec du PBS avant de rajouter le milieu d'étude.

B. Expériences de prolifération cellulaire

Pour les expériences de croissance cellulaire, les cellules ont étéensemencées en plaque 12 puits. Le niveau de prolifération ou de survie a été évalué en comptant 3 puits pour chaque temps et chaque condition. Les cellules ont été collectées après traitement à la trypsine puis comptées avec un compteur de cellules (Beckman coulter counter). Les taux de prolifération ou de survie ont été obtenus en rapportant le nombre de cellules à celui du début de l'expérience.

C. Évaluation de la macropinocytose de l'albumine par l'utilisation de sondes fluorescentes

Deux sondes différentes ont été utilisées afin d'établir l'entrée d'albumine dans les cellules par macropinocytose lors de carence en acides aminés, TMR-Dextran et FITC-BSA. Le dextran est un carbohydrate hydrophile non métabolisable par la cellule. Associé à un fluorochrome comme le TMR (tetramethylrhodamine), il permet de suivre l'entrée de molécules par macropinocytose (Racoosin and Swanson, 1993; Wang et al., 2014a). L'utilisation d'albumine couplée au fluorochrome FITC (fluorescein isothiocyanate) a permis d'étudier l'entrée spécifique d'albumine dans la cellule (Commisso et al., 2013). Si les deux sondes fluorescentes sont colocalisées, cela indiquera que l'albumine est entrée dans la cellule par macropinocytose.

Ces sondes ont été utilisées selon le protocole suivant. Avant la fin des temps de carence, les cellules ont été incubées pendant 4h à 37°C avec le FITC-BSA et le TMR Dextran. Les cellules ont ensuite été lavées 2 fois avec du milieu sans acides aminés et le milieu d'étude a de nouveau été rajouté. Les émissions fluorescentes ont été observées via un microscope Zeiss équipé d'une chambre d'incubation en utilisant le filtre DsRed (Excitation 545 nm, Emission 572 nm) pour le TMR-dextran, et le filtre GFP (Excitation 488 nm, Emission 509 nm) pour la BSA-FITC.

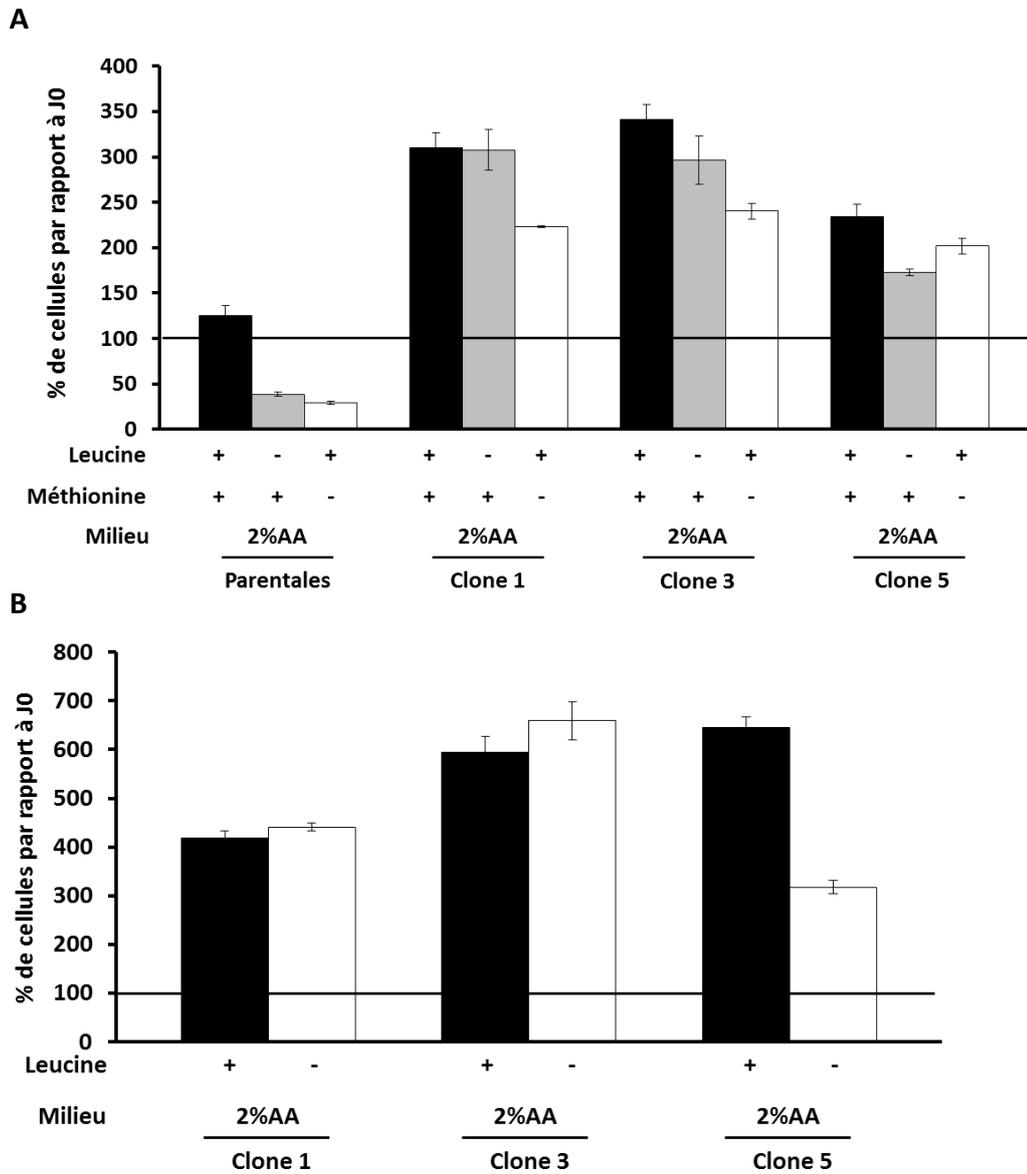


Figure 31 : Effets de l'absence d'un acide aminés dans le milieu 2%AA sur la survie des cellules. (A) Cellules parentales et clones AADR ont été cultivés pendant 72h en milieu 2%AA (■), en milieu 2%AA privé de leucine (■) ou en milieu 2%AA privé de méthionine (□). **(B)** Niveau de prolifération des clones AADR après 6 jours en milieu 2%AA sans leucine. Les résultats sont présentés en pourcentage de cellule par rapport au nombre présent au début de l'expérience (0h représenté par la barre noire). Les graphiques représentent les moyennes \pm S.E.M. de 3 expériences indépendantes.

III. Résultats et Discussion

A. Les clones ont la capacité de proliférer en absence de méthionine ou de leucine

La quantité d'acides aminés libres dans le milieu 2%AA apparaît comme insuffisante pour expliquer les niveaux de prolifération des clones AADR. De ce constat, nous avons émis l'hypothèse que les clones utiliseraient les protéines du milieu comme source d'acides aminés. Pour valider cette hypothèse, les premières expériences ont consisté à retirer du milieu 2%AA un acide aminé indispensable, la leucine ou la méthionine. En effet, si les clones sont capables de proliférer, ceci indiquera qu'ils ont utilisé la méthionine ou la leucine présente dans les protéines du milieu.

Si les cellules parentales présentent une très faible prolifération après 72h en milieu 2%AA, leur nombre chute comme attendu de près de 60% et de 70% respectivement en absence de leucine et de méthionine (FIGURE 31-A). Le retrait de la leucine et de la méthionine du milieu 2%AA des clones AADR n'a pas induit les effets délétères observés chez les cellules parentales. Les clones AADR ont à l'inverse continué à proliférer de manière quasi-équivalente au niveau de prolifération observé dans le milieu 2%AA classique. La résistance à la carence en leucine a été confirmée en maintenant pendant 6 jours les clones AADR dans ce milieu 2%AA carencé en leucine (Figure 31-B). On peut alors conclure que les clones AADR utilisent effectivement une autre source de leucine ou de méthionine, et donc d'acides aminés, présente dans le milieu de culture pour pouvoir proliférer.

B. Les clones AADR sont capables d'utiliser l'albumine du milieu pour soutenir leur niveau de prolifération.

La supplémentation des milieux de culture avec le sérum de veau fœtal permet d'apporter aux cellules facteurs de croissance, acides aminés, ions ou encore vitamines nécessaires à la survie des cellules *in vitro*. Dans nos expériences de carence en acides aminés, le sérum est dialysé afin d'éliminer les acides aminés libres pour faciliter le contrôle de leur concentration. Dès lors, les protéines représentent la seule source d'acides aminés du sérum pour les cellules. Représentant 10% du volume final, le sérum apporte alors environ 3,2g/L à 7,2g/L de protéines au milieu de culture. Parmi ces protéines, nous nous sommes concentrés sur l'albumine, la protéine la plus représentée dans le sérum (40 à 50 g/L dans le sérum humain). De plus, des auteurs ont montré que les cellules cancéreuses pouvaient utiliser cette source d'acides aminés pour leur métabolisme (Stehle et al., 1997).

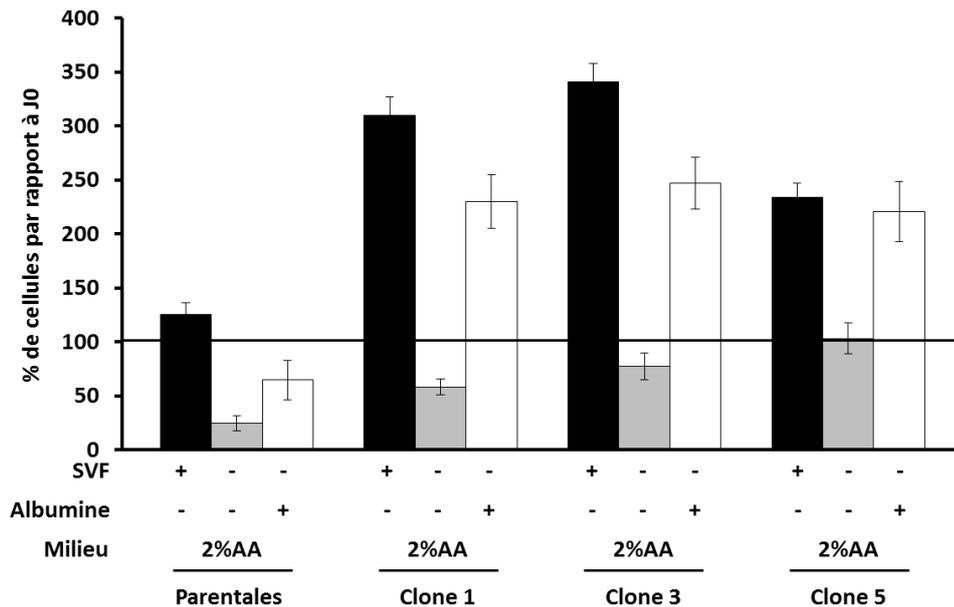


Figure 32 : Les clones sont capables d'utiliser l'albumine pour proliférer en milieu 2%AA. Cellules parentales et clones AADR ont été cultivés pendant 72h en milieu 2%AA (■), en milieu 2%AA sans sérum de veau fœtal (SVF) (■) ou en milieu 2%AA sans SVF mais avec 5 g/L d'albumine (□). Les résultats sont présentés en pourcentage de cellule par rapport au nombre présent au début de l'expérience (0h représenté par la barre noire). Les graphiques représentent les moyennes \pm S.E.M. de 3 expériences indépendantes.

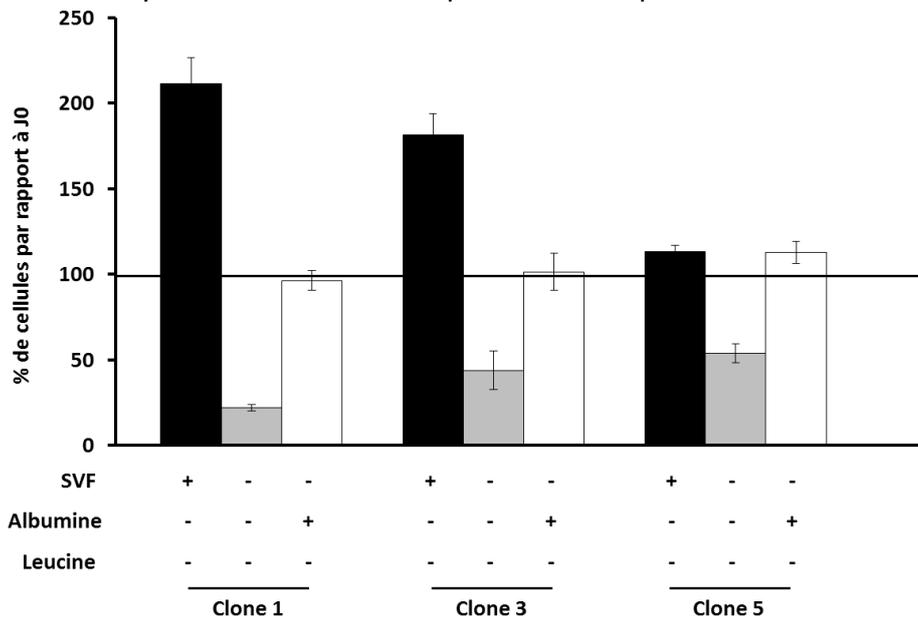


Figure 33 : L'albumine ne serait pas la principale source de leucine. Les clones AADR ont été cultivés pendant 48h en milieu 2%AA privé de leucine (■), en milieu 2%AA privé de leucine et sans sérum de veau fœtal (SVF) (■) ou en milieu 2%AA privé de leucine, sans SVF mais avec 5 g/L d'albumine (□). Les résultats sont présentés en pourcentage de cellule par rapport au nombre présent au début de l'expérience (0h représenté par la barre noire). Les graphiques représentent les moyennes \pm S.E.M. de 3 expériences indépendantes.

Pour étudier l'utilisation de l'albumine par les clones AADR lors de carences en acides aminés, nous avons mesuré les niveaux de prolifération des cellules en absence de sérum puis en ajoutant de l'albumine de sérum bovin (BSA). La concentration finale d'albumine des milieux de culture supplémentés a été fixée à 5g/L, soit à peu près la concentration moyenne de protéine totale retrouvée dans le sérum. Retirer le sérum du milieu 2%AA conduit à une perte de près de 75% du nombre de cellules parentales en 48h (Figure 32). Le sérum étant riche en facteurs de croissance, en vitamines ou en divers ions, il est difficile à ce stade de conclure quel élément manquant a induit la mort des cellules parentales. Si l'ajout de BSA augmente la survie des cellules parentales, elle ne leur permet pas pour autant de proliférer. Pour les clones AADR, si le retrait du sérum a réduit de 40 et 25% le nombre de cellules des clones 1 et 3, l'ajout de BSA leur a permis de proliférer à nouveau. L'absence du sérum dans le clone 5 n'a pas réduit son nombre de cellules tandis que l'ajout de BSA lui a permis de récupérer le même niveau de prolifération qu'en milieu 2%AA avec sérum. Combiner aux résultats précédents, cette expérience indique que les clones AADR pourraient utiliser l'albumine comme source d'acides aminés pour soutenir leur prolifération mais le mécanisme d'entrée de l'albumine pourrait différer entre les clones. De plus, la croissance des clones AADR en milieu 2%AA avec ajout de BSA mais sans les facteurs de croissance du sérum indiquerait qu'ils pourraient être devenus indépendants des facteurs de croissance exogènes pour proliférer. Bien que l'absence de facteurs de croissance induise l'apoptose de fibroblastes (Altman et al., 2009), cette résistance rapproche notre modèle de cellules tumorales qui prolifèrent indépendamment de facteurs de croissance exogènes (Barr et al., 2015; Sporn and Roberts, 1985; Tiong et al., 2016; Wei et al., 2015). Il est toutefois difficile de conclure de ces expériences si les clones expriment leur propre facteur de croissance pour une action autocrine ou si les voies de signalisations associées à leurs récepteurs sont constitutivement actives (Lemmon and Schlessinger, 2010).

C. L'albumine ne serait pas la principale source de leucine pour les cellules en milieu 2%AA

La BSA contenant 10% de leucine, nous avons voulu voir si elle pouvait suffire comme seule source de leucine pour les clones AADR. Nous avons donc carencé les cellules avec un milieu 2%AA privé à la fois de sérum et de leucine et complémenté ou non avec de la BSA. Après 48h dans ce milieu, le retrait de leucine a augmenté la chute du nombre de cellules causée par la seule absence de sérum. À nouveau, nous avons observé des différences entre les clones : le clone 1 étant le plus sensible perdant 75% de cellules tandis que les clones

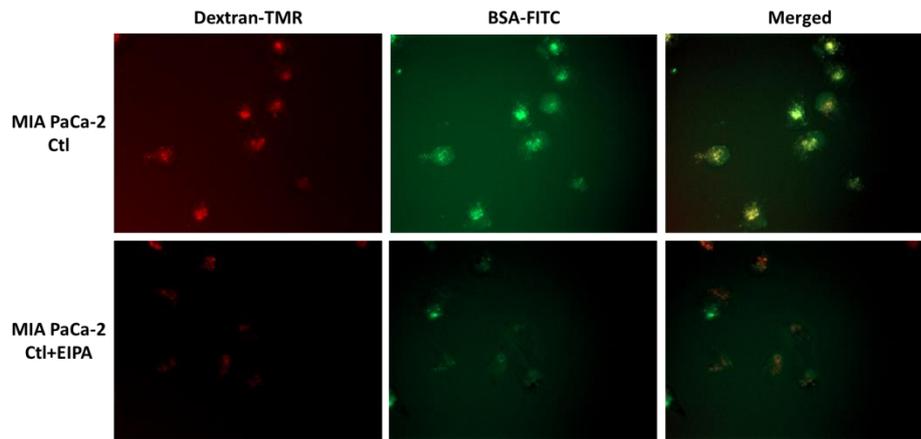


Figure 34 : Entrée de l'albumine par macropinocytose. Les MIA-PaCa-2 ont été cultivées pendant 24h en milieu contrôle (Ctl) ou en milieu contrôle complété avec un inhibiteur de macropinocytose, l'EIPA, à une concentration de 10 μ M. Le Dextran-TMR est utilisé comme marqueur de macropinocytose. La sonde BSA-FITC permet de visualiser l'entrée d'albumine dans la cellule. Si les deux sondes colocalisent, cela indique que l'albumine est entrée par macropinocytose. Le traitement à l'EIPA réduit fortement la détection de ces deux sondes indiquant que les observations précédentes sont dues à la macropinocytose.

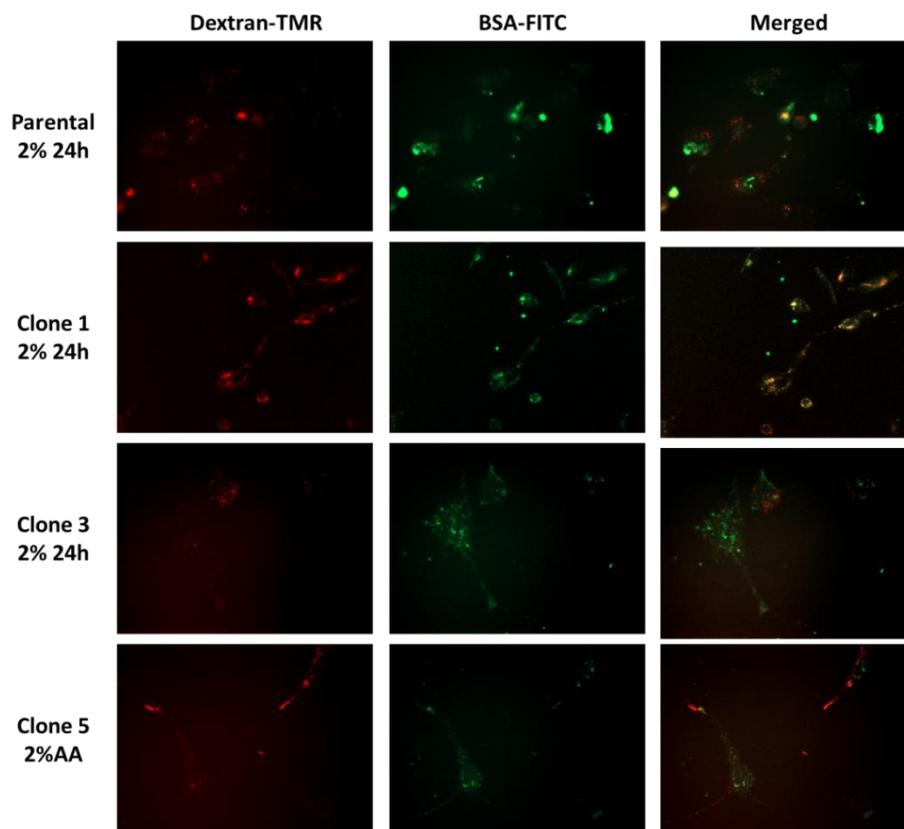


Figure 35 : Le clone 1 est le seul clone faisant entrer l'albumine par macropinocytose en milieu 2%AA. Clones et cellules parentales ont été cultivés pendant 24h en milieu 2%AA et la colocalisation de la BSA-FITC avec le marqueur de macropinocytose Dextran-TMR a été étudiée.

3 et 5 n'ont vu leur nombre chuter respectivement que de 60 et 50%. L'ajout de BSA n'a pas permis de rétablir les taux de prolifération mais à néanmoins permis de maintenir le nombre de cellules (Figure 33). Si des expériences devront être répétées (notamment celles des carences en leucine et sérum), nos résultats suggèrent que la BSA ne serait pas la principale source de leucine pour les cellules.

Si l'albumine représente près de 2/3 des protéines du milieu, ces expériences suggèrent que les autres protéines du milieu (ex. les facteurs de croissance) seraient également utilisées par les clones AADR comme source de leucine. Toutefois, il reste compliquer d'expliquer que l'ajout de la BSA ne permette pas de restaurer la prolifération des cellules malgré la forte proportion de leucine dans cette protéine. On peut émettre l'hypothèse que l'hydrolyse de la BSA ne serait alors pas suffisante pour permettre à la cellule de combler ses besoins en leucine. On peut également supposer que combinée à la carence en leucine, l'absence d'autres éléments du sérum pourrait être particulièrement délétère. Comme mentionné précédemment, nous avons seulement compensé l'absence de sérum par de l'albumine or le sérum contient de nombreux facteurs importants pour l'homéostasie des cellules et notamment les facteurs de croissance.

D. La macropinocytose serait un des mécanismes utilisés par les clones pour permettre l'entrée des protéines dans la cellule.

La barrière que forme la membrane plasmique entre le cytoplasme et l'environnement extracellulaire oblige les cellules à utiliser différents mécanismes afin de permettre l'entrée de protéines dans la cellule. Plusieurs études ont mis en évidence l'importance de la macropinocytose dans les cellules tumorales afin de leur permettre d'utiliser des protéines et notamment l'albumine du milieu pour leur survie (Commisso et al., 2013).

Pour étudier l'entrée d'albumine par macropinocytose, nous avons utilisé deux molécules couplées à des fluorochromes : le TMR-Dextran et le FITC-BSA. Le TMR-Dextran rentrant spécifiquement par macropinocytose (Racoosin and Swanson, 1993; Wang et al., 2014a), l'étude de la colocalisation du FITC-BSA avec cette molécule permettra de déterminer si l'albumine entre dans les clones AADR par macropinocytose. Comme on peut le voir dans la lignée de cancer du pancréas MIA PaCa-2 bien caractérisée pour faire de la macropinocytose (Commisso et al., 2013), les deux marqueurs colocalisent en milieu contrôle (FIGURE 34). L'ajout d'EIPA (5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amyloride), un inhibiteur de macropinocytose fait diminuer l'entrée de chaque molécule ainsi que leur colocalisation

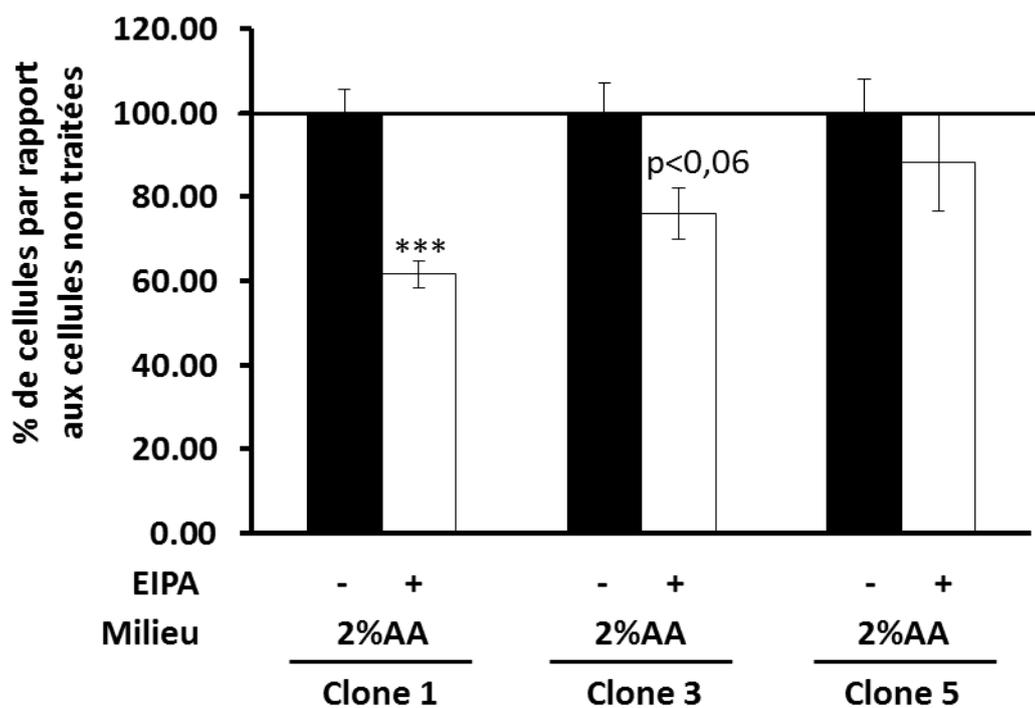


Figure 36 : Effet de l'EIPA sur la prolifération des clones AADR en milieu 2%AA. Les clones ont été cultivés en milieu 2%AA complété ou non avec 10 μ M d'EIPA pendant 72h. Les résultats sont présentés en pourcentage du nombre de cellules dans les milieux non traités (Représenté par la barre noire). Le graphique représente les moyennes et les écarts-types d'au moins 3 expériences indépendantes.

confirmant que le signal observé est bien de la macropinocytose.

La première observation que nous avons pu faire est qu'en milieu 2%AA, les cellules parentales n'incorporent que très peu de TMR- Dextran et que celui-ci ne colocalisent pas avec le BSA-FITC (Figure 35). En ce qui concerne les clones AADR, seul le clone 1 présentait une forte colocalisation des deux marqueurs en milieu 2%AA. Le niveau de colocalisation dans les deux autres clones était très faible à l'opposé. Nous avons tout de même observé l'entrée de BSA-FITC dans les 3 clones ce qui est cohérent avec les résultats précédents. Ces résultats suggèrent que le clone 1 utiliserait la macropinocytose pour capter l'albumine du milieu.

E. L'inhibition de la macropinocytose par l'EIPA réduit la prolifération du clone 1.

Pour étudier l'importance de la macropinocytose sur la croissance des clones et en particulier celle du clone 1, nous les avons traités avec l'EIPA, un inhibiteur de macropinocytose. Il est à noter que l'EIPA n'affecte pas les autres mécanismes d'endocytose (Koivusalo et al., 2010). Comme l'albumine peut entrer dans les cellules par endocytose à clathrine (Yumoto et al., 2006), des variations des effets de l'EIPA sur les clones pourraient être observées.

Effectivement, le clone 5 qui présente la plus faible incorporation des deux sondes n'a pas vu son niveau de prolifération réduire avec l'ajout d'EIPA (Figure 36). À l'opposé, la croissance du clone 1 en milieu 2%AA était diminuée de près de 40% avec l'ajout d'EIPA. Le clone 3 a, quant à lui, vu sa prolifération réduite de 25%. Compte tenu que l'inhibition des pompes Na^+/H^+ par l'EIPA peut impacter d'autres mécanismes, il serait important de réitérer ces expériences avec un autre inhibiteur de la macropinocytose. Toutefois, ces résultats suivent la tendance qui se dégageait des expériences de privation en sérum, le clone 1 étant plus sensible que le clone 5. Ces résultats renforcent l'hypothèse que la macropinocytose est une voie utilisée par le clone 1 lui permettant d'utiliser les protéines pour proliférer mais ce mécanisme ne serait pas impliqué chez le clone 5.

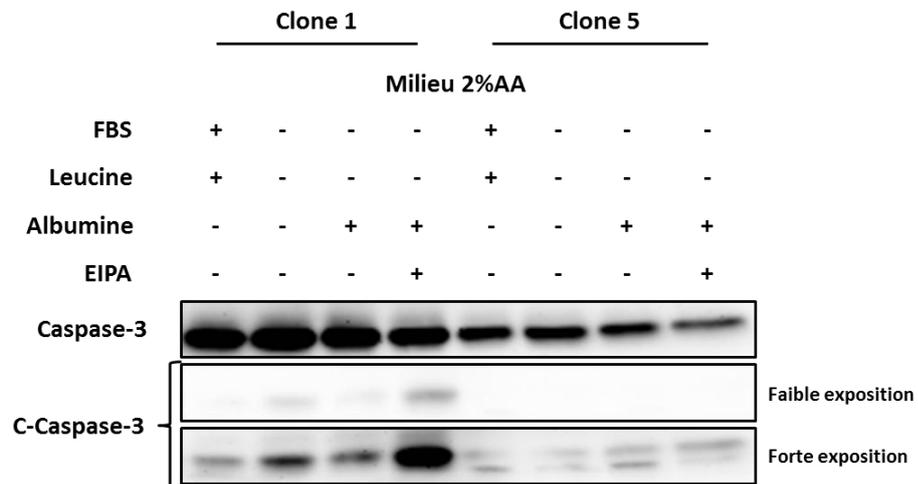


Figure 37 : Effet de l'EIPA sur le clivage de la caspase 3. Le clone 1 et le clone 5 ont été cultivés pendant 24h dans un milieu 2%AA classique (colonnes 1 et 5), dans un milieu 2%AA privé de leucine et de sérum (FBS) (colonnes 2 et 6), dans un milieu 2%AA privé de sérum et de leucine et complété avec 5g/L d'albumine (colonnes 3 et 7) et dans un milieu 2%AA privé de sérum et de leucine et complété avec 5g/L d'albumine et 10 μ M d'EIPA (colonnes 4 et 8).

F. Le traitement à l'EIPA sensibilise le clone 1 aux effets apoptotiques de la carence en sérum.

Les clones 1 et 5 étant les cellules les plus différentes concernant les effets de l'EIPA, nous avons réalisé une expérience préliminaire pour voir l'impact de cette molécule sur le clivage de la caspase 3 en milieu 2% AA carencé en leucine et en sérum et complémenté ou non avec de la BSA.

Nous avons pu observer dans un premier temps que la carence en leucine et en sérum induisait un fort clivage de la caspase 3 chez le clone 1 (colonne 2) (Figure 37). La réduction du clivage de caspase 3 en présence de BSA confirme son effet en faveur de la survie du clone 1 (colonne 3). L'ajout d'EIPA a inhibé les effets bénéfiques de la BSA et a conduit à une augmentation de la forme clivée de la caspase 3 (colonne 4) Ce résultat suggère que l'entrée de BSA par macropinocytose contribue à diminuer les effets apoptotiques de la carence en sérum et en leucine. Toutefois, le niveau de caspase 3 clivée en présence d'EIPA est supérieur à celui observé dans la condition sans leucine et sans sérum (colonne 2). Ce clivage plus important pourrait indiquer des effets secondaires de l'EIPA en dehors de la macropinocytose. Concernant le clone 5, on peut seulement observer que le niveau de clivage de la caspase 3 serait moins important que chez le clone 1. L'analyse du clivage de la caspase 3 n'a été réalisée qu'une seule fois dans ces conditions. En reproduisant cette expérience et en incluant d'autres conditions (2% AA avec sérum et EIPA ou d'autres inhibiteurs de macropinocytose), nous pourrions alors confirmer si la macropinocytose est effectivement importante pour la survie du clone 1 en milieu 2% AA.

IV. Conclusions perspectives

L'ensemble des résultats ont permis de confirmer que les clones utilisent les protéines du milieu de culture pour soutenir leur prolifération en milieu 2% AA sans pour autant utiliser les mêmes mécanismes d'entrée des protéines. En effet, la macropinocytose serait le mécanisme préférentiel utilisé par le clone 1 pour permettre l'entrée de protéines dont l'albumine pour pouvoir proliférer. Le clone 5 serait moins dépendant de ce mécanisme pour pouvoir utiliser les protéines suggérant des différences entre ces deux lignées de clones AADR.

En comparant ces clones entre eux mais également, à leurs cellules parentales, nous pourrions alors identifier des mécanismes, autre que la macropinocytose, utilisés pour la survie de cellules lors de carences nutritionnelles.

DISCUSSION PERSPECTIVES

Discussion & perspectives

Il est bien caractérisé que des tumeurs arrivent à se développer malgré de fortes carences nutritionnelles. Les résistances à la carence en glucose ou à hypoxie ont été bien étudiées dans la littérature. Cependant, les cellules tumorales font également face à des carences en acides aminés. Entre les acides aminés indispensables et l'importance de nombreux acides aminés dans le métabolisme de la cellule, il est important que leur concentration soit finement régulée. L'originalité de ce travail a reposé sur l'utilisation d'un modèle de MEFs résistantes à la carence en acides aminés (clones AADR) pour identifier les mécanismes susceptibles d'expliquer la résistance de certaines cellules cancéreuses aux mêmes conditions.

Grâce à ce modèle, nous avons montré que la sous-expression d'ATF4 contribuait à une meilleure survie des cellules lors de carences en acides aminés. Ce mécanisme de résistance a également été observé dans une lignée humaine de cancer du pancréas, la lignée BxPC-3 connue pour ses capacités de survie en carence en nutriments. En effet, la surexpression d'ATF4 dans cette lignée résistante a permis de resensibiliser ces cellules résistantes aux effets apoptotiques de la carence en acides aminés confirmant ainsi un rôle proapoptotique d'ATF4. Nous avons également pu démontrer que les clones utilisaient les protéines du milieu pour pouvoir proliférer en milieu carencé en acides aminés. Pour une des lignées, cette utilisation des protéines, et notamment de l'albumine, serait favorisée par la macropinocytose, un mécanisme de plus en plus étudié dans les études sur le cancer.

Dans ce chapitre, l'ensemble des résultats sera discuté et des expériences complémentaires seront proposées pour mieux caractériser ces mécanismes et les clones AADR.

I. Rôle des voies de signalisation sensibles à la disponibilité en acides aminés dans la survie des clones AADR

L'un des premiers objectifs de ce projet était de déterminer si les principales voies de signalisation régulées par les acides aminés avaient été modifiées dans les clones AADR et, le cas échéant, si ces modifications contribuaient à leur survie.

A. La voie mTORC1

La voie mTORC1 est l'une des principales voies régulant la croissance cellulaire. Elle est également caractérisée pour être inhibée lors de carences en acides aminés. Au vu de la croissance des clones AADR par rapport aux cellules parentales en milieu 2%AA, nous avons émis l'hypothèse que la voie mTOR pourrait être activée de manière constitutive dans les clones AADR afin de pouvoir soutenir la croissance cellulaire. L'absence de phosphorylation de S6K1 semble indiquer que l'activité de mTORC1 est inhibée de la même manière entre les clones AADR et les cellules parentales en milieu 2%AA. Nous avons par ailleurs étudié la phosphorylation d'une autre cible de mTOR, la protéine 4E-BP1. Aucune différence significative entre clones et cellules parentales n'a été observée confirmant les résultats précédents. Ces données sont cohérentes avec les faibles niveaux de synthèse protéique observés dans les clones AADR

La kinase mTOR est capable de phosphoryler d'autres protéines impliquées dans la régulation de la synthèse protéique telle que la kinase du facteur d'élongation eEF2 (eEF2K). La phosphorylation du facteur eEF2 par cette kinase entraîne l'inhibition de l'élongation et la phosphorylation d'eEF2K par mTORC1 a pour effet d'inhiber cette activité. L'inhibition de l'étape d'élongation fortement énergivore a été associée à une meilleure survie lors de carence en nutriments (Leprivier et al., 2013). Dès lors, on peut imaginer qu'eEF2K doit toujours être active dans les clones AADR et participerait à leur survie en maintenant inhibée la synthèse protéique. Ainsi l'inhibition de mTORC1 contribuerait également à la survie des clones AADR.

Toutefois il faut également prendre en compte que de nombreuses autres cibles de mTORC1 ne sont pas impliquées dans la régulation de la synthèse protéique. Il pourrait être envisagé que la sélection ait pu entraîner un maintien de la phosphorylation de ces cibles par mTORC1. Ceci est d'autant plus envisageable que les mécanismes précis impliqués dans la phosphorylation des différentes cibles de mTORC1 peuvent différer. Il serait plus

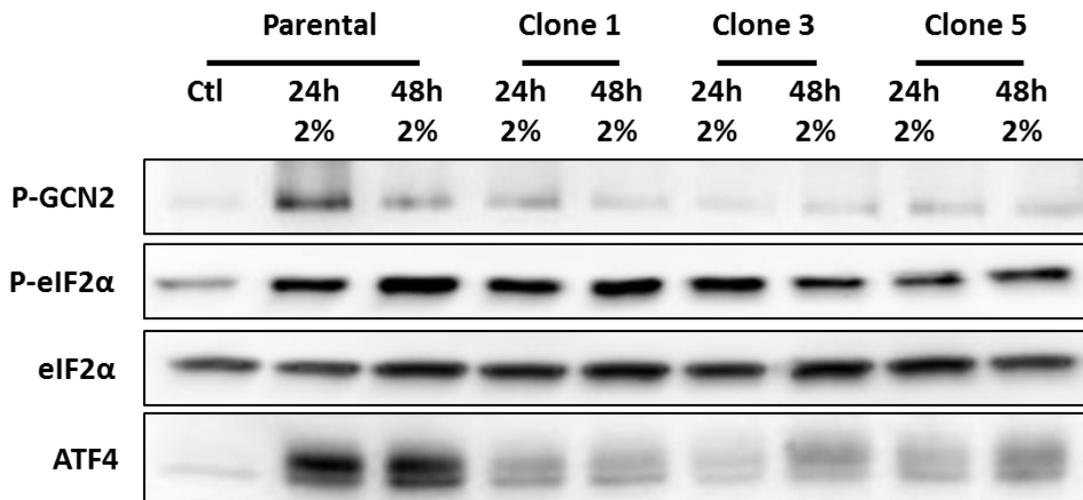


Figure 38 : Régulation des acteurs de la voie GCN2 dans les clones. Cellules parentales et clones ont été cultivés en milieu contrôlé (Ctl) ou en milieu 2%AA (2%) pendant 24 et 48 heures avant d'analyser par western blot les différents acteurs de la voie : la phosphorylation de GCN2, la phosphorylation d'eIF2 α ou non ainsi que le niveau d'expression d'ATF4.

particulièrement intéressant de tester cette hypothèse dans le contexte de la régulation de l'autophagie. Une des caractéristiques des clones est qu'ils semblent présenter un faible flux autophagique. Or, l'inhibition de mTORC1 en carence en acides aminés devrait lever son activité inhibitrice sur deux protéines, ULK-1 et ATG13 et induire l'autophagie. Observant l'inverse, ces deux protéines pourraient être toujours phosphorylées par mTOR et participer à l'inhibition de l'autophagie.

B. La voie GCN2

La voie GCN2 est une des voies majeures d'adaptation des cellules lors de carences en acides aminés. De ce fait, elle faisait partie, tout comme la voie mTORC1, des candidats pouvant être modifiés et favoriser la survie des clones AADR. De plus, l'intérêt d'étudier la voie GCN2 avait été confirmé par une analyse transcriptomique qui avait mis en évidence une sous-expression de gènes dépendants d'ATF4 dans les clones AADR. Toutefois, cette analyse transcriptomique a été réalisée sur un faible nombre d'échantillons dans des conditions expérimentales différentes de celles détaillées dans ce manuscrit. Nous avons donc vérifié si les clones présentaient également une altération de la voie GCN2- eIF2 α -ATF4 dans nos conditions expérimentales.

La phosphorylation de GCN2 est inférieure dans les clones AADR par rapport aux cellules parentales en milieu 2% AA (Figure 38). Cependant, nous avons pu observer le même niveau de phosphorylation d'eIF2 α . On pourrait émettre l'hypothèse que le niveau de phosphorylation de GCN2 serait suffisant pour induire de manière significative la phosphorylation d'eIF2 α . On peut également supposer qu'il y ait un défaut au niveau de GADD34, la sous-unité de la phosphatase PP1 qui permet de cibler eIF2 α . En effet, la transcription de Gadd34 est régulée par ATF4 et nous avons observé une diminution de son ARNm dans les clones AADR en milieu 2% AA par rapport aux cellules parentales (Figure 38). Si la sous-expression de GADD34 est confirmée au niveau protéique, ce mécanisme participerait alors au maintien de la phosphorylation d'eIF2 α et de l'inhibition de la synthèse protéique qui ont été observés dans les clones AADR. Par ailleurs, ces deux caractéristiques seraient également importantes pour la survie des clones lors de la carence en acides aminés. En effet, Han et al. ont montré que la reprise de la traduction en période de stress, comme la carence en acides aminés, pourrait induire la mort des cellules (Han et al., 2013).

❖ **Sous-expression d'ATF4 et survie en milieu 2%AA**

Bien que les conditions soient favorables à son expression, le niveau d'expression d'ATF4 dans les clones AADR en milieu 2%AA est inférieur à celui des cellules parentales à la fois au niveau de son ARNm et de sa protéine. Ces résultats indiquent que les clones présentent des mutations touchant l'expression d'ATF4. Cette sous-expression d'ATF4 peut être importante pour la survie des clones AADR si on prend seulement en compte qu'ATF4 régule de nombreux gènes proapoptotiques tels que NOXA et PUMA (Galehdar et al., 2010; Wang et al., 2009b). Toutefois, l'expression d'ATF4 n'a pas été invalidée mais seulement réduite chez les clones AADR. Ceci est cohérent car l'invalidation d'ATF4 est létale chez des souris (Masuoka and Townes, 2002). De plus, l'expression de nombreux gènes essentiels à la survie des cellules est régulée par ATF4 comme ceux du statut rédox (Lange et al., 2008). Harding H. *et al.* ont notamment montré que la survie de MEFs ATF4^{-/-} *in vitro* nécessitait l'ajout d'un agent réducteur au milieu de culture (Harding et al., 2003). Dès lors, la sous-expression d'ATF4 en milieu 2%AA permettrait aux clones AADR de réduire l'expression de gènes proapoptotiques ce que nous avons observé pour les gènes Chac1, Atf3 et Trb3. D'autre part, il serait intéressant de déterminer si cette sous-expression est nécessaire à la survie des clones AADR en maintenant l'expression de certains gènes comme ceux impliqués dans la régulation du statut rédox.

II. Quels mécanismes régulés par ATF4 favorisent la survie des clones AADR ?

Si tous les clones présentent une sous-expression d'ATF4, le grand nombre de gènes régulés par ce facteur donne autant de cibles possibles qui pourraient participer à la survie des clones AADR. Toutefois, il serait nécessaire de déterminer dans quelle mesure cette sous-expression d'ATF4 affecte les fonctions auxquels il est associé. Nous avons déjà pu observer que l'apoptose et l'autophagie sont deux mécanismes qui ont été modifiés dans les clones AADR.

❖ **Quel gène(s) cible(s) d'ATF4 est(sont) responsable(s) de la survie des clones AADR ?**

L'expression d'ATF4 lors de carences en acides aminés va favoriser l'expression de gènes en faveur de la survie telle qu'Asns ou Lat1 (Ye et al., 2010, Cormerais et al., 2016;) mais également de gènes proapoptotiques telle Chac1 ou Atf3 (Crawford et al., 2015). Toutefois, les clones AADR présentent une diminution de l'expression d'Asns mais aussi de

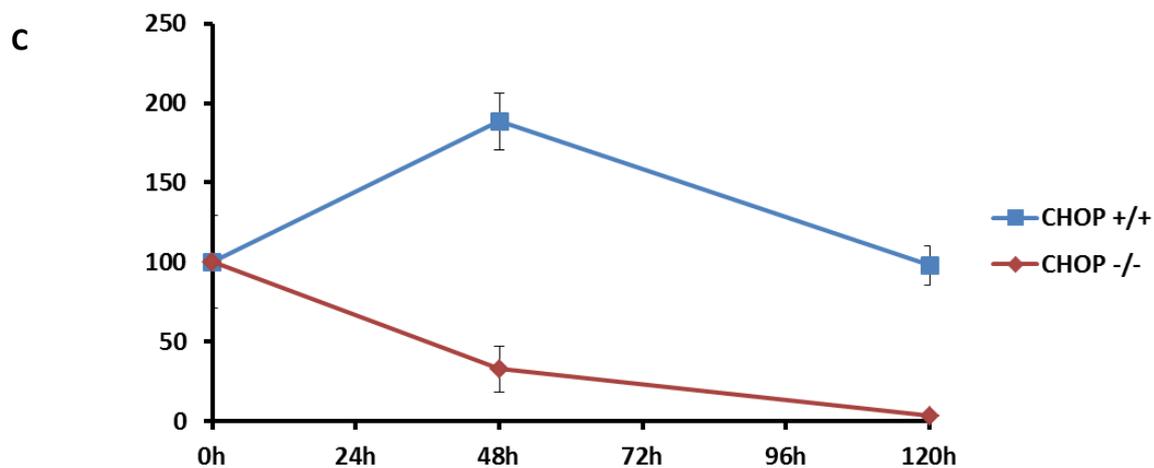
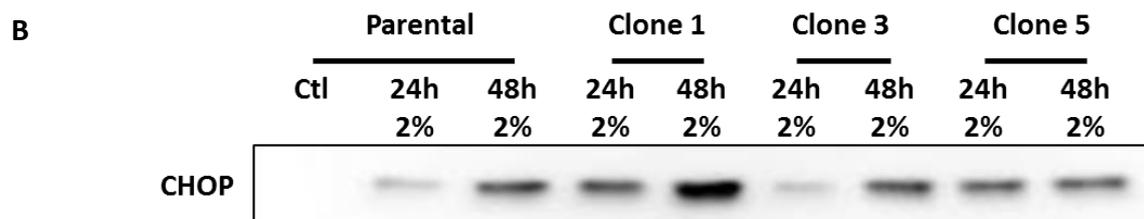
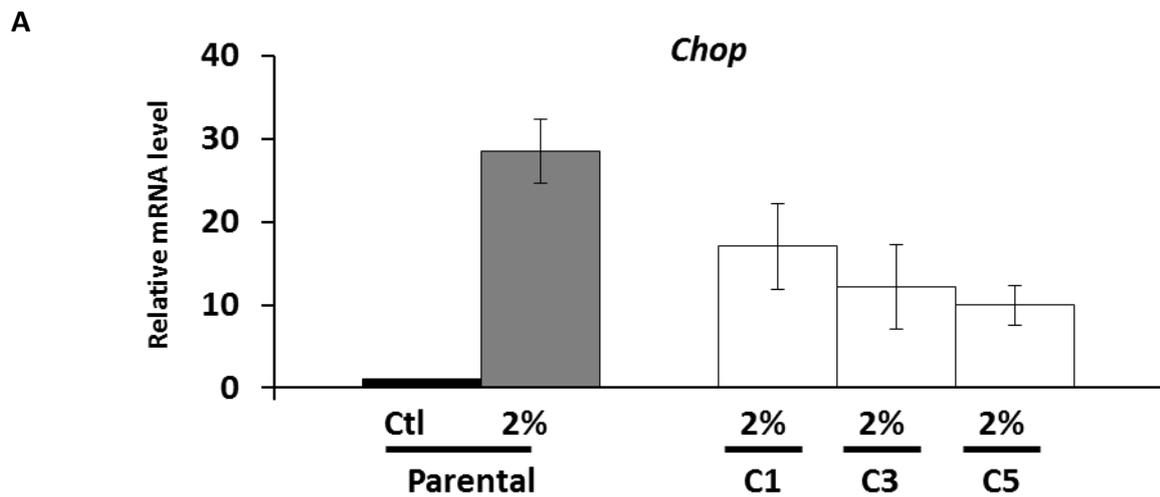


Figure 39 : L'expression de CHOP dans les clones AADR serait importante pour leur survie en milieu 2%AA. (A) Niveau d'expression de l'ARNm de Chop dans les cellules parentales et les clones AADR après 24h en milieu contrôle (Ctl) et en milieu 2%AA (2%). Les niveaux d'ARNm normalisés par le niveau d'ARNm de la β -actine ont été comparés au niveau d'ARNm des cellules parentales en milieu contrôle. Le graphique représente les moyennes et SEM d'au moins 5 expériences. **(B)** Analyse du niveau protéique de CHOP dans les cellules parentales et les clones AADR en milieu contrôle (Ctl) et en milieu 2%AA (2%) après 24 et 48 heures. **(C)** Prolifération de cellules CHOP +/+ (Bleu) par rapport à celle de cellules CHOP -/- (rouge) en milieu 2%AA pendant 48h et 120h. Le graphique représente les moyennes et écart-types de plusieurs expériences.

Chac1 et d'Atf3. Il est difficile d'identifier un gène spécifique favorisant la survie des clones AADR d'autant que certains d'entre eux ont plusieurs rôles.

C'est notamment le cas du facteur de transcription CHOP. Cette protéine est majoritairement associée aux mécanismes d'apoptose de la cellule (Altman et al., 2009; Cai et al., 2016; Teske et al., 2013) mais participe également à la régulation des gènes de l'autophagie (B'chir et al., 2014). L'analyse du niveau de son ARNm montrait que les clones présentaient une diminution de son niveau d'expression en milieu 2%AA par rapport aux cellules parentales (Figure 39-A). Ces résultats d'ARNm auraient pu indiquer que l'inhibition de Chop favoriserait la survie des clones en milieu 2%AA. Cependant, nous avons pu observer que le niveau d'expression de sa protéine était toujours élevé voire équivalent au niveau observé dans les cellules parentales en milieu 2%AA (Figure 42-B). Ces résultats suggèrent que CHOP n'aurait pas un rôle proapoptotique en milieu 2%AA, contrairement à ce qui est décrit dans le contexte de la carence en leucine (B'chir et al., 2013). Cette hypothèse est appuyée par une expérience de prolifération de MEFs CHOP^{-/-} en milieu 2%AA. En effet, ces cellules KO ne prolifèrent pas dans ce milieu 2%AA et le nombre de cellules diminue plus rapidement que des cellules CHOP^{+/+} (Figure 42-C). Ces résultats suggèrent que CHOP pourrait même contribuer à la survie des cellules en milieu 2%AA. CHOP représenterait alors une cible intéressante à inhiber dans le contexte de la carence en acides aminés. Ces résultats illustrent que si une analyse transcriptomique permet d'obtenir des pistes d'études intéressantes, elle n'est pas suffisante pour conclure sur le rôle d'un gène dans la survie ou la mort des cellules.

❖ **Régulation de l'autophagie**

L'autophagie est un des mécanismes régulièrement associés à la survie de cellules cancéreuses (Milani et al., 2009; Rzymiski et al., 2009). Elle doit être finement régulée pour ne pas induire des mécanismes de mort cellulaire (Altman et al., 2009; Sadasivan et al., 2006). Dans les clones AADR, nous avons pu observer une faible expression de nombreux gènes de l'autophagie (Map11c3b, p62, Atg3, Atg12) ainsi qu'une faible expression de la protéine LC3 suggérant un faible flux d'autophagie en milieu 2%AA. Une telle diminution des flux d'autophagie reste à être confirmée par d'autres techniques (Klionsky et al., 2016). Néanmoins, elle serait cohérente avec l'inhibition de la synthèse protéique afin de maintenir la balance protéolyse/protéosynthèse et l'homéostasie de la cellule. La régulation des gènes de l'autophagie par ATF4, démontrée par B'Chir et al (B'chir et al., 2013), apparaîtrait comme prépondérante pour le maintien du flux autophagique lors de carences en acides aminés. Il

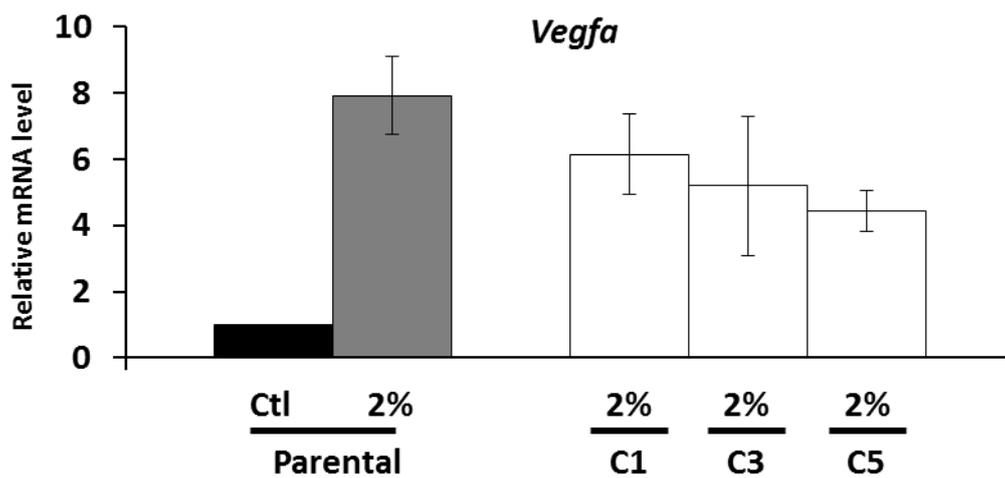


Figure 40 : L'expression de Vegfa n'est pas significativement diminuée dans les clones. Le niveau d'ARNm de Vegfa dans les cellules parentales et les clones AADR a été mesuré après 24h en milieu contrôle (Ctl) et en milieu 2%AA (2%). Les niveaux d'ARNm normalisés par le niveau d'ARNm de la β -actine ont été comparés au niveau d'ARNm des cellules parentales en milieu contrôle. Le graphique représente les moyennes et SEM d'au moins 3 expériences.

serait également important de déterminer si l'initiation de l'autophagie est altérée dans les clones. Comme cité précédemment, l'étude des cibles de mTORC1 (ULK-1, ATG13) impliquées dans l'induction de l'autophagie apparaît d'autant plus nécessaire.

❖ **Régulation de l'apoptose**

En étudiant le clivage de la caspase 3 et la compaction de l'ADN, nous avons pu déterminer que les clones AADR étaient résistants à l'apoptose induite par la carence en acides aminés. De plus, nous avons pu observer que plusieurs gènes apoptotiques régulés par ATF4 étaient sous-exprimés dans les clones AADR (Atf3, Chac1, Trb3) ce qui pourrait participer à la résistance des clones. Comme décrit dans l'introduction bibliographique, il existe plusieurs voies apoptotiques et de nombreux facteurs régulent ces différentes voies. En étudiant le clivage des caspases initiatrices (les caspases 8 et 10 pour la voie extrinsèque, et la caspase 9 pour la voie intrinsèque) dans les clones AADR et les cellules parentales, on pourrait alors déterminer quelle voie d'apoptose est inhibée dans les clones. Ce faisant, nous pourrions alors étudier plus précisément les acteurs de cette voie et ainsi déterminer à quel niveau se situe la résistance des clones. Toutefois, il n'est pas exclu que d'autres acteurs de l'apoptose, régulés indépendamment d'ATF4, soient également impliqués dans la résistance des clones. En particulier, les clones AADR présentent une sous-expression de l'ARNm codant pour la protéine p53, un acteur majeur de la régulation de l'apoptose fréquemment muté dans les cellules cancéreuses.

❖ **Certains gènes dépendants d'ATF4 sont toujours exprimés dans les clones AADR**

Si la transcription de la majorité des gènes dépendants d'ATF4 est diminuée, l'analyse transcriptomique a mis en évidence que certains gènes seraient toujours exprimés dans les clones AADR. Pour deux d'entre eux, Vegfa et Lcn2, ces résultats ont été confirmés par qPCR.

➤ **Vegfa**

Vegfa est un facteur pro-survie participant à l'induction de l'angiogenèse en se liant aux récepteurs du VEGF (VEGFR) présents sur les cellules endothéliales. Plusieurs études ont montré que la transcription de Vegfa était induite par le facteur ATF4 (Roybal et al., 2004). Dans les clones 1 et 3, l'expression de Vegfa est égale à celle des cellules parentales en milieu 2%AA et seul le clone 5 présente une sous-expression de ce facteur (Figure 40). Vegfa est connu pour être régulé par d'autres facteurs de transcription qui permettrait de transcrire

Vegfa mais pas les autres gènes qui dépendent d'ATF4. Si VEGFA est principalement caractérisé pour induire l'angiogenèse, plusieurs études ont montré qu'il pourrait également agir de manière autocrine pour favoriser la croissance tumorale (Cao et al., 2012; Grun et al., 2016; Sun et al., 2015). Pour émettre l'hypothèse d'une régulation autocrine de VEGFA dans les clones, il serait important d'étudier dans un premier temps son niveau protéique. Si ces résultats sont confirmés, l'analyse plus approfondie des clones notamment lors d'expérience de sous-expression de Vegfa pourrait alors mettre en évidence le rôle de VEGFA indépendant de l'angiogenèse.

➤ **Lcn2**

Dans l'analyse transcriptomique, le niveau d'ARNm de Lcn2 (lipocalin2) a été identifié comme étant l'ARNm le plus exprimé dans les clones AADR par rapport aux cellules parentales. En effet, ces résultats confirmés par qPCR indiquaient un niveau d'expression d'ARNm près de 20 fois supérieur dans les clones AADR par rapport aux cellules parentales au milieu 2%AA (Résultats non montrés). LCN2 fut d'abord identifié sous le nom de neutrophil gelatinase-associated lipocalin ou NGAL pour sa capacité à lier les gélatinases, des métalloprotéinase retrouvées dans les granulocytes neutrophiles comme MMP-9 (Hibbs and Bainton, 1989; Kjeldsen et al., 1993). LCN2 a ensuite été caractérisée pour son rôle dans le transport sanguin du fer et l'immunité inné (Flo et al., 2004; Yang et al., 2002). La concentration urinaire de LCN2 est également utilisée comme biomarqueurs d'insuffisance rénale aigüe (Mishra et al., 2005). C'est dans ce contexte d'insuffisance rénale qu'a été récemment identifié ATF4 comme un régulateur de la transcription de Lcn2 (El Karoui et al., 2016). Toutefois, la détection de cette protéine au niveau sanguin serait également un biomarqueur de certains types de cancers (Smith et al., 2008; Yang et al., 2009) et notamment des tumeurs possédant des régions hypoxiques (Nakamura et al., 2014). Le rôle d'oncogène de LCN2 serait associé à la régulation de l'angiogenèse et au développement de métastase (Ören et al., 2016; Tung et al., 2013; Yang et al., 2013). Il pourrait être dû également à l'association de LCN2 à MMP-9. Cette association stabilise cette métalloprotéinase et permet d'augmenter son activité protéolytique et ainsi, la survie de certaines tumeurs (Lin et al., 2012; Srdelić Mihalj et al., 2015; Sung et al., 2012). De par la surexpression de LCN2 dans les clones, un tel mécanisme pourrait alors être retrouvé et ainsi favoriser la dégradation des protéines extracellulaires et leur utilisation comme source d'acides aminés.

III. Les mécanismes impliqués dans la sous-expression d'ATF4 ?

Que ce soit dans les clones AADR ou dans les cellules BxPC-3, nous avons observé une sous-expression d'ATF4 en milieu carencé en acides aminés. Si ce mécanisme de sous-expression est important pour la résistance à l'apoptose induite par le milieu carencé en acides aminés, les causes de la sous-expression d'ATF4 peuvent diverger entre les différentes lignées. L'identification des mécanismes conduisant à cette sous-expression pourrait être intéressante pour le développement de nouveaux traitements pharmacologiques ciblant le niveau d'ATF4 dans les cellules cancéreuses présentant également cette sous-expression.

❖ Régulation transcriptionnelle d'ATF4

Il est connu que le niveau d'ARNm d'Atf4 est augmenté suite à différents stress comme la carence en acides aminés, ce que l'on a observé notamment dans les cellules parentales. Dans les clones, le niveau d'ARNm d'Atf4 est inférieur à celui des cellules parentales en milieu 2%AA. On peut émettre l'hypothèse que la régulation de la transcription d'ATF4 est altérée dans les clones. Ce n'est que très récemment qu'un facteur a été identifié comme participant à sa régulation lors d'une carence en nutriments (carence en sérum et en acides aminés). En effet, José A. Martina *et al* en 2016 ont démontré que le facteur TFE3 (Transcription Factor Binding To IGHM Enhancer 3) pouvait se fixer sur le promoteur d'Atf4 et induire sa transcription lors de carence en nutriments (Martina et al., 2016). Cette induction ferait également intervenir le facteur TFEB (Transcription Factor EB). Plusieurs autres protéines ont été associées à l'expression d'Atf4 comme NRF2 lors de stress oxydant (DeNicola et al., 2015) ou comme PDX1 lors de stress du réticulum endoplasmique dans les îlots β du pancréas (Sachdeva et al., 2009). D'autres acteurs participeraient à sa répression comme le facteur C/EBP- β lors de rayonnement UV (Dey et al., 2012). Malgré la connaissance de ces facteurs, la régulation de la transcription d'ATF4 lors de carence en acides aminés n'est pas caractérisée. Il serait important d'identifier les acteurs de cette régulation avant de pouvoir déterminer si la régulation de la transcription d'ATF4 est altérée dans les clones.

La régulation transcriptionnelle d'ATF4 ne semble pas être la principale composante de la régulation de son expression. En effet, une augmentation du niveau de son ARNm n'assure pas pour autant un fort niveau protéique. Il a été caractérisé dans les cellules en hypoxie que le niveau d'ARNm d'Atf4 n'est pas augmenté par rapport aux conditions normoxiques. (Ameri et al., 2004). Néanmoins, le niveau de la protéine ATF4 est augmenté en hypoxie via la phosphorylation d'eIF2 α par la kinase PERK. Ce résultat souligne l'importance de la régulation de la traduction dans le contrôle de l'expression d'ATF4.

❖ **Régulation traductionnelle d'ATF4**

La régulation de l'expression d'ATF4 dépend principalement de la phosphorylation d'eIF2 α et de l'inhibition de la synthèse protéique afin de permettre la traduction de son ARNm grâce à la présence des uORFs dans sa séquence 5'-UTR. Ces deux paramètres étant observés de manière équivalente entre clones AADR et cellules parentales en milieu 2% AA, il ne semble pas concourir aux différences observées. Toutefois, ces résultats n'excluent pas que la traduction d'ATF4 soit affectée dans les clones AADR. En effet, des mutations dans la séquence 5' non traduite de l'ARNm d'ATF4 notamment au niveau des uORFs pourraient participer à la faible traduction de son ARNm comme cela a été montré (Vattem and Wek, 2004; Young and Wek, 2016). La technique du SUnSET permet d'avoir une idée globale du niveau de synthèse protéique mais pas de la vitesse de chaque étape. La vitesse d'initiation de la traduction est particulièrement importante car elle va décider de la traduction de l'uORF2 ou d'ATF4. Comme expliqué dans l'introduction bibliographique, en absence de stress, le complexe d'initiation se reforme rapidement après la traduction de l'uORF1 pour traduire l'uORF2. Lors de carence en acides aminés, cette formation est plus lente et permet au complexe de se former après l'uORF2 pour traduire ATF4. Dans les clones AADR, on pourrait supposer que la vitesse d'initiation en milieu 2% AA soit équivalente à celle de cellule en absence de stress et entraînerait une expression réduite d'ATF4. Dans ce cas-là, cela signifierait que l'inhibition de l'élongation serait responsable du faible niveau de synthèse protéique. Une étude du profil de gradient de polysome ainsi que de la position de l'ARNm d'ATF4 dans ce gradient permettrait de caractériser ce mécanisme.

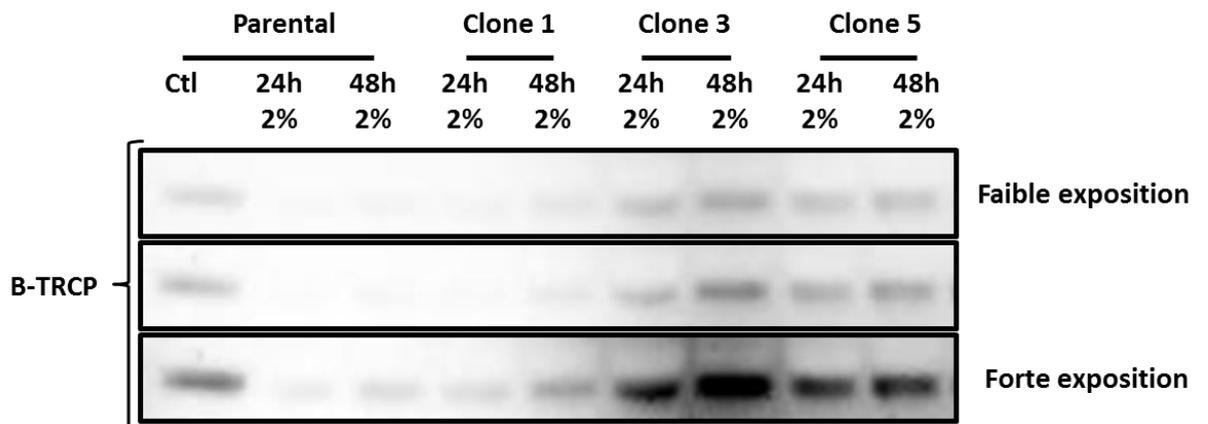


Figure 41 : Expression de β -TRCP dans les clones en milieu 2%AA. Analyse du niveau protéique de β -TRCP dans les cellules parentales et les clones AADR en milieu contrôle (Ctl) et en milieu 2%AA (2%) après 24 et 48 heures par western blot. Plusieurs niveaux d'exposition du même gel sont présentés.

❖ Stabilité protéique d'ATF4

Le dernier niveau de régulation d'ATF4 concerne la stabilité de la protéine. ATF4 est une protéine instable rapidement dégradée en condition basale par le protéasome en étant ciblée par le complexe E3-ligase SCF^{β-TRCP} (Lassot et al., 2001). Nous avons commencé à étudier le niveau d'une des protéines de ce complexe, la protéine F-Box β-TRCP. Dans les cellules parentales, nous avons pu tout d'abord observer une diminution de son niveau lors de carence en acides aminés par rapport au milieu contrôle (Figure 41). Le clone 1 présente le même faible niveau d'expression de β-TRCP que les cellules parentales en milieu 2%AA. En revanche, les clones 3 et 5 présentent un niveau équivalent voire supérieur à celui observé dans les cellules parentales cultivées en milieu contrôle. Ces résultats indiqueraient que des mécanismes différents entre les clones joueraient sur la stabilité d'ATF4. Pour confirmer le rôle du protéasome dans la dégradation d'ATF4 dans les clones 3 et 5, des études du niveau d'ubiquitination d'ATF4 devront être effectuées en présence d'inhibiteur du protéasome (MG132) ou de β-TRCP (PDTC) (Hayakawa et al., 2003; Sharma et al., 2015)

IV. ATF4 : un acteur majeur de la résistance des tumeurs à la carence en acides aminés ?

❖ Étude *in vitro*

Ayant identifié le rôle de la sous-expression d'ATF4 dans la survie des clones AADR en milieu 2%AA, nous avons voulu observer si cette association pouvait également être faite dans des lignées du cancer du pancréas. Nous avons ainsi opposé deux lignées, la lignée MIA-PaCA-2 et la lignée BxPC-3 connues pour leur capacité de survie différente en milieu carencé en nutriments (Izuishi et al., 2000). Nous avons ainsi pu observer une sous-expression d'ATF4 dans la lignée résistante BxPC-3 et une plus forte expression dans la lignée sensible MIA-PaCA-2. De plus, la surexpression d'ATF4 dans la lignée BxPC-3 la sensibilisait aux effets apoptotiques de la carence en acides aminés.

D'autres lignées cancéreuses ont été également étudiées au cours de ce projet. Nous nous sommes intéressés à une autre lignée de cancer du pancréas, la lignée Panc1 décrite comme résistante à la carence en acides aminés (Izuishi et al., 2000). Nous avons également testé plusieurs lignées de glioblastomes que nous avons à disposition. Nous avons étudié la prolifération de ces lignées en milieu 2%AA, leur niveau d'ATF4 et un marqueur d'apoptose (PARP clivée) (Figure 42). Les trois lignées de glioblastomes présentent une faible expression

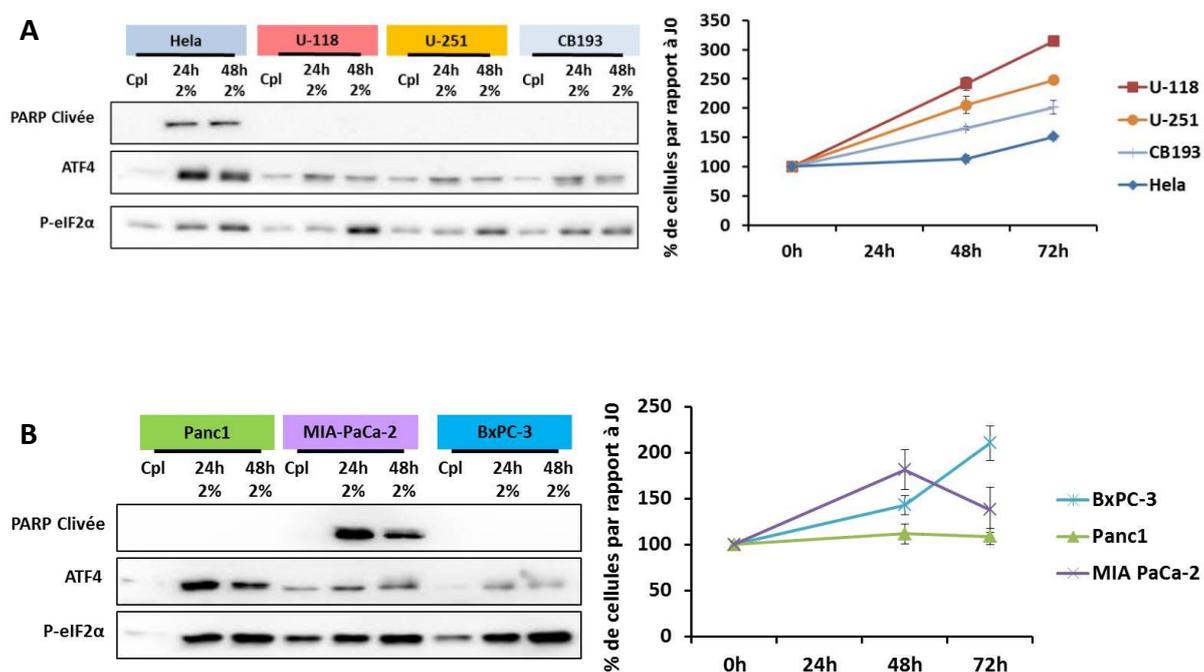


Figure 42 : Prolifération et niveau d'expression d'ATF4 dans plusieurs lignées cancéreuses.

Trois lignées de glioblastomes (U-118, U-251, CB193) trois lignées de cancer du pancréas (Panc1, MIA-PaCa-2, BxPC-3) et la lignée HeLa (métastase du cancer du col de l'utérus) ont été utilisées. **(Gauche)** Analyse par western blot du marqueur apoptotique PARP clivée, du niveau d'expression d'ATF4 et de la phosphorylation d'eIF2 α dans les différentes lignées en milieu contrôle (Cpl) et milieu 2%AA (2%) après 24 et 48 heures. **(Droite)** Prolifération de ces lignées cancéreuses en milieu 2%AA après 48h et 72h.

d'ATF4 et une forte prolifération en milieu 2%AA par rapport à la lignée Hela sensible à l'apoptose induite par le milieu 2%AA (Figure 42-A). On peut observer que le niveau d'expression d'ATF4 semble corrélérer avec le niveau de prolifération et de survie des cellules en milieu 2%AA. Cette corrélation est moins évidente dans la lignée Panc-1 qui ne présenterait pas d'induction de l'apoptose mais uniquement un arrêt de la prolifération (Figure 42-B). Il serait nécessaire d'effectuer ces analyses sur un plus grand nombre de lignées cancéreuses pour confirmer la corrélation entre l'expression d'ATF4 et la croissance des cellules voire leur survie lors de carences en acides aminés.

❖ **Étude in vivo**

Dans ce projet, nous avons envisagé d'étudier le niveau d'expression d'ATF4 au sein de tumeurs. Nous voulions déterminer si les régions hypoxiées de la tumeur présentaient une sous expression d'ATF4 et pourraient être les cibles d'une stratégie de surexpression. Toutefois, un problème est rapidement apparu quant à la détection d'ATF4 par immunohistochimie sur les coupes de tumeurs. En effet, après différents tests d'immunofluorescence sur des cellules en culture, il est apparu qu'aucun des anticorps testés n'était assez spécifique pour détecter ATF4. Des produits non spécifiques ont été observés dans des MEFs invalidés pour ATF4 et dans des lignées humaines traitées avec des siRNA-ATF4 rendant difficile l'analyse du niveau d'expression d'ATF4. Le niveau d'ATF4 pourrait être observé indirectement en observant le niveau d'ARNm d'une de ses cibles par hybridation *in situ*. Le choix de la cible devra être bien défini car comme dans les clones AADR, il ne faut pas exclure que certains gènes dépendants d'ATF4 soit toujours transcrits dans les tumeurs.

❖ **Surexprimer ATF4 ? Si oui dans quel contexte ?**

La surexpression d'ATF4 dans les cellules BxPC-3 a permis d'induire l'apoptose de ces cellules lors d'une carence en acides aminés. Ce résultat illustre que la surexpression d'ATF4 serait efficace pour traiter des cellules tumorales exposées à des carences en acides aminés. Cette stratégie pourrait s'avérer particulièrement efficace sur des cellules présentant un faible niveau d'ATF4. Comme mentionné précédemment, l'identification de telles cellules apparaît compliquée. La compréhension des mécanismes impliqués dans la sous-expression d'ATF4 pourrait participer à l'identification de ces cellules. Le ciblage de ces mécanismes pourrait également permettre de définir des stratégies pour optimiser la surexpression d'ATF4. Il ne faut pas exclure que la surexpression d'ATF4 puisse également induire l'expression de facteurs pro-survie tels qu'Asns et Vegfa. Il pourrait paraître opportun de

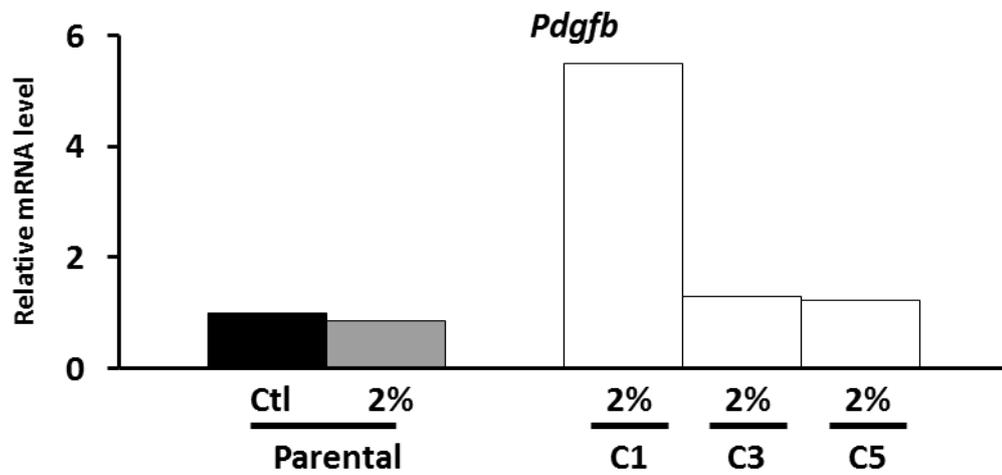


Figure 43 : Niveau d'expression de l'ARNm codant pour PDGFB. Le graphique représente le niveau d'ARNm de *Pdgfb* de l'analyse transcriptomique dans les clones et les cellules parentales après 6h en milieu contrôle (Ctl) et en milieu 2%AA. Les niveaux d'ARNm ont été comparés au niveau d'ARNm des cellules parentales en milieu contrôle.

traiter les cellules avec des inhibiteurs de ces facteurs tels que la L-asparaginase ou les anticorps monoclonaux ciblant le VEGF (Avastin) afin de prévenir ces effets pro-survie d'ATF4.

V. Macropinocytose et survie lors de carences en acides aminés ?

Dans le second projet, nous nous étions intéressés aux mécanismes d'apport en acides aminés et en protéines des clones pour subvenir à leur besoin. En effet, le premier projet a mis en évidence des mécanismes permettant la survie des clones. Toutefois, ces mécanismes n'ont pas été associés à la capacité de prolifération des clones en milieu 2%AA. Par rapport aux clones 3 et 5, le clone 1 présente un haut niveau de macropinocytose qui pourrait contribuer à expliquer sa résistance à la carence en acides aminés. Pour compléter ce travail, il serait intéressant d'étudier les régulateurs de la macropinocytose comme Ras, Src ou encore PI3K (Lim and Gleeson, 2011) afin de déterminer pourquoi ce mécanisme diverge entre les clones. Une piste intéressante à étudier concerne le facteur de croissance PDGF-B (platelet derived growth factor subunit B). En effet, en plus de son rôle dans le développement embryonnaire et l'angiogenèse (Hellström et al., 1999; Van den Akker et al., 2008), PDGF-B participe également à la stimulation de la macropinocytose (Dharmawardhane et al., 2000; Wang et al., 2006) comme d'autres facteurs de croissance (Bar-Sagi and Feramisco, 1986; Bonni et al., 1999; Nakase et al., 2015) (Cf. chapitre III-E-2). Dans l'analyse transcriptomique, les résultats révèlent que le niveau d'ARNm de *Pdgfb* est surexprimé dans le clone 1 par rapport aux cellules parentales et par rapport aux autres clones (Figure 43). Il serait nécessaire de confirmer ces résultats par qPCR. Cette différence d'expression de *Pdgfb* pourrait alors expliquer les différences de niveau de macropinocytose dans les clones. PDGFB pourrait alors représenter une cible pharmacologique intéressante afin de traiter les certains types de cancers.

❖ Dégradation des protéines captées ?

Avant d'être utilisées par la cellule, les protéines doivent être dégradées pour pouvoir fournir des acides aminés libres. La voie de dégradation du contenu des macropinosomes et des vésicules d'endocytose est l'autophagie (cf. chapitre autophagie). Dans notre premier projet, nous nous sommes intéressés au niveau des différentes formes lipidées de la protéine LC3 pour étudier l'autophagie. D'une part le faible niveau de LC3 en milieu 2%AA, et d'autre part, la faible augmentation de la lipodation de LC3 lors d'un traitement à la chloroquine indiquerait que les clones présentent un faible flux d'autophagie. Ce dernier pourrait être

nécessaire pour permettre au clone d'utiliser les protéines extracellulaires comme source d'acides aminés.

VI. Le modèle des clones AADR : quelles perspectives ?

Comme on a pu le voir dans l'ensemble de ce manuscrit, notre processus de sélection a généré des clones résistants à la carence en acides aminés avec des caractéristiques proches de des cellules tumorales. Ces données illustrent la pertinence de notre modèle dans l'identification de mécanismes de résistance à la carence en acides aminés dans les cellules tumorales. La poursuite de l'étude des clones AADR pourrait permettre d'identifier d'autres mécanismes de résistance à la carence en acides aminés. La régulation du statut rédox serait particulièrement intéressante à étudier si l'on considère qu'ATF4 est indispensable à cette régulation (Harding et al., 2003; Lange et al., 2008). Il serait également pertinent d'étudier d'autres mécanismes qu'ils soient ou non régulés par ATF4.

❖ Cycle cellulaire

De par la prolifération des clones en milieu carencé en acides aminés, il paraît probable que les mécanismes de régulation du cycle cellulaire aient été altérés. En effet, il est bien établi que la carence en acides aminés induit une inhibition du cycle cellulaire par différents mécanismes. Il a notamment été démontré que l'expression d'ATF4 pouvait entraîner un arrêt du cycle cellulaire via l'expression d'inhibiteurs du cycle cellulaire tel que p21^{Waf1} (Bagheri-Yarmand et al., 2003). L'expression d'ATF4 étant augmentée en période de stress, cette action sur le cycle cellulaire pourrait être importante afin d'inhiber ce mécanisme jusqu'à la résolution du stress. Étudier la régulation du cycle cellulaire dans les clones AADR pourrait permettre de comprendre plus précisément le rôle d'ATF4 dans la régulation de ce mécanisme lors de carence en acides aminés.

❖ Métabolisme des clones AADR

Il serait pertinent d'étudier plus profondément le métabolisme des clones, d'autant que de nombreuses voies anaboliques dépendent des acides aminés telles que la synthèse des nucléotides et des lipides. Comme présenté dans l'introduction, plusieurs études ont démontré que des altérations du métabolisme d'acides aminés non indispensables sont impliquées dans la tumorigenèse. Ces données représentent des pistes d'investigations pour les clones AADR. Cependant, le contexte dans lequel ces altérations ont été observées est différent de celui de la carence prolongée en acides aminés étudiée dans ce manuscrit. On peut alors supposer que les

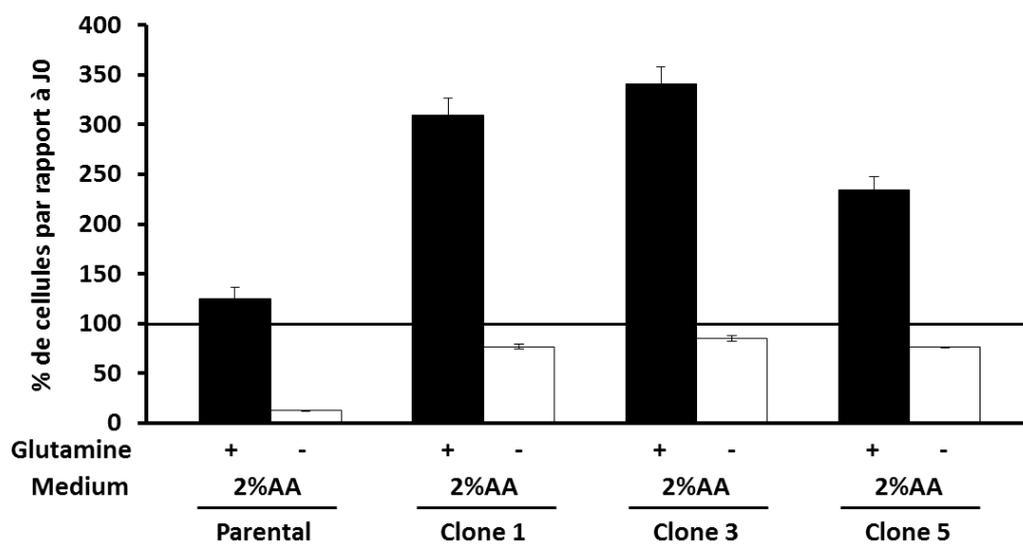


Figure 44 : Effets de l'absence d'un acide aminés dans le milieu 2%AA sur la survie des cellules. (A) (C) Cellules parentales et clones AADR ont été cultivés pendant 72h en milieu 2%AA (■) ou en milieu 2%AA privé de glutamine (□). Les résultats représentent les moyennes et les SEM d'au moins 3 expériences.

clones puissent présenter des altérations différentes de ces voies métaboliques afin de permettre leur survie en milieu carencé en acides aminés.

Des travaux préliminaires ont été réalisés afin de déterminer si les clones AADR pourraient présenter une dépendance à la glutamine. En effet, de nombreuses tumeurs sont dépendantes de la glutamine comme substrat énergétique ou comme substrat de voies anaboliques (Tardito et al., 2015; Wise and Thompson, 2010). Contrairement à l'absence de leucine, l'absence de glutamine a conduit à l'inhibition de la croissance des clones en milieu 2%AA (Figure 44). Néanmoins, la survie des clones AADR dans ces conditions est beaucoup plus importante que celle des cellules parentales. Il est en effet établi que les MEFs sont dépendants de la glutamine et que son absence est une condition apoptotique (250,303–305). Les clones survivant mieux, il est possible qu'ils aient développé des mécanismes pour résister à la carence en glutamine. L'identification de ces mécanismes pourraient alors permettre de les cibler et d'inhiber la résistance de certains cancers à la carence en glutamine comme dans certaines lignées de glioblastomes (Tardito et al., 2015).

❖ **Les clones AADR sont-ils résistants à d'autres stress ?**

Un mécanisme de résistance à un stress nutritionnel peut également permettre aux cellules de survivre à des traitements anticancéreux. En effet, il est déjà connu dans certaines tumeurs que les mécanismes de résistance à l'hypoxie peuvent également conférer une meilleure résistance à certains traitements anticancéreux (Yasuda, 2008). On peut dès lors supposer que les mécanismes de résistance aux carences en acides aminés pourraient également être responsables de la survie de cellules cancéreuses à certains traitements anticancéreux. Le premier mécanisme de résistance des clones AADR identifié fut la sous-expression d'ATF4. Il est établi que de nombreux traitements anticancéreux induisent la mort des cellules via l'induction de l'ISR et l'expression d'ATF4 (Cf. Introduction) (Bortezomib, ONC201) (Ishizawa et al., 2016). Il serait alors intéressant d'étudier si les clones AADR sont résistants à ces traitements. Dans ce cas-là, cibler le mécanisme de sous-expression d'ATF4 pourrait alors inhiber la résistance de ces cellules au traitement anticancéreux et potentialiser ses effets apoptotiques. L'identification d'autres mécanismes de résistance à la carence en acides aminés avec notre modèle pourrait alors mettre en évidence des mécanismes qui permettent à des lignées cancéreuses de survivre à certains traitements anticancéreux.

Conclusion

Générale

Conclusion générale

Notre approche originale d'étude de l'adaptation des cellules à la carence en acides aminés via l'obtention des clones AADR a permis de mettre en évidence un des mécanismes de résistance à ce stress passant par la sous-expression d'ATF4. L'importance d'ATF4 dans cette résistance a de plus été confirmée par les expériences de surexpression dans les clones AADR et dans une lignée de cancer du pancréas résistante à la carence en acide aminés. Plus généralement, nous avons pu démontrer qu'ATF4 a un rôle proapoptotique lors de carence prolongée en acides aminés. Par ailleurs, nous avons pu observer que les clones AADR utilisaient les protéines du milieu 2% AA pour leur survie par la macropinocytose comme certaines cellules cancéreuses mais pas exclusivement.

L'ensemble de ce travail a permis de définir le rôle d'ATF4 dans la survie en milieu carencé en acides aminés et l'implication d'autres mécanismes afin de favoriser la prolifération (Figures).

Bien que nous n'ayons pas directement travaillé sur des cellules cancéreuses, notre approche a permis d'identifier et de reproduire certains mécanismes participant à la survie de cellules cancéreuses à une carence en acides aminés. Cette approche d'identification des mécanismes de résistance de cellules cancéreuses pourrait être appliquée à d'autre stress que la carence en acides aminés que ce soit la carence en glucose, l'hypoxie ou des traitements anticancéreux. L'identification de ces mécanismes pourrait permettre de cibler certaines voies/protéines spécifiques de la cellule afin d'augmenter l'efficacité des traitements anti-tumoraux.

Références

- Abcouwer, S.F., Marjon, P.L., Loper, R.K., and Jagt, D.L.V. (2002). Response of VEGF Expression to Amino Acid Deprivation and Inducers of Endoplasmic Reticulum Stress. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *43*, 2791–2798.
- Adamski, J., Price, A., Dive, C., and Makin, G. (2013). Hypoxia-Induced Cytotoxic Drug Resistance in Osteosarcoma Is Independent of HIF-1Alpha. *PLOS ONE* *8*, e65304.
- Adibi, S.A. (1997). The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function. *Gastroenterology* *113*, 332–340.
- Akakura, N., Kobayashi, M., Horiuchi, I., Suzuki, A., Wang, J., Chen, J., Niizeki, H., Kawamura Ki, null, Hosokawa, M., and Asaka, M. (2001). Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1alpha renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation. *Cancer Res.* *61*, 6548–6554.
- Aktas, H., Cai, H., and Cooper, G.M. (1997). Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 3850–3857.
- Alba-Roth, J., Müller, O.A., Schopohl, J., and von Werder, K. (1988). Arginine stimulates growth hormone secretion by suppressing endogenous somatostatin secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *67*, 1186–1189.
- Altman, B.J., Wofford, J.A., Zhao, Y., Coloff, J.L., Ferguson, E.C., Wieman, H.L., Day, A.E., Ilkayeva, O., and Rathmell, J.C. (2009). Autophagy Provides Nutrients but Can Lead to Chop-dependent Induction of Bim to Sensitize Growth Factor-deprived Cells to Apoptosis. *Mol. Biol. Cell* *20*, 1180–1191.
- Ameri, K., Lewis, C.E., Raida, M., Sowter, H., Hai, T., and Harris, A.L. (2004). Anoxic induction of ATF-4 through HIF-1-independent pathways of protein stabilization in human cancer cells. *Blood* *103*, 1876–1882.
- Anderson, D.D., and Stover, P.J. (2009). SHMT1 and SHMT2 are functionally redundant in nuclear de novo thymidylate biosynthesis. *PloS One* *4*, e5839.
- Andreev, D.E., O'Connor, P.B., Zhdanov, A.V., Dmitriev, R.I., Shatsky, I.N., Papkovsky, D.B., and Baranov, P.V. (2015). Oxygen and glucose deprivation induces widespread alterations in mRNA translation within 20 minutes. *Genome Biol.* *16*, 90.
- Anne-Claude Gingras, Brian Raught, and Sonenberg, and N. (1999). eIF4 Initiation Factors: Effectors of mRNA Recruitment to Ribosomes and Regulators of Translation. *Annu. Rev. Biochem.* *68*, 913–963.
- Araki, N., Egami, Y., Watanabe, Y., and Hatae, T. (2007). Phosphoinositide metabolism during membrane ruffling and macropinosome formation in EGF-stimulated A431 cells. *Exp. Cell Res.* *313*, 1496–1507.
- Averous, J., Lambert-Langlais, S., Carraro, V., Gourbeyre, O., Parry, L., B'Chir, W., Muranishi, Y., Jousse, C., Bruhat, A., Maurin, A.-C., et al. (2014). Requirement for lysosomal localization of mTOR for its activation differs between leucine and other amino acids. *Cell. Signal.* *26*, 1918–1927.

Averous, J., Lambert-Langlais, S., Mesclon, F., Carraro, V., Parry, L., Jousse, C., Bruhat, A., Maurin, A.-C., Pierre, P., Proud, C.G., et al. (2016). GCN2 contributes to mTORC1 inhibition by leucine deprivation through an ATF4 independent mechanism. *Sci. Rep.* 6, 27698.

Baba, H. (2012). Cystine/glutamic acid transporter is a novel marker for predicting poor survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol. Rep.*

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

Bagheri-Yarmand, R., Vadlamudi, R.K., and Kumar, R. (2003). Activating transcription factor 4 overexpression inhibits proliferation and differentiation of mammary epithelium resulting in impaired lactation and accelerated involution. *J. Biol. Chem.* 278, 17421–17429.

Bar-Peled, L., and Sabatini, D.M. (2014). Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends Cell Biol.* 24, 400–406.

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

Barr, M.P., Gray, S.G., Gately, K., Hams, E., Fallon, P.G., Davies, A.M., Richard, D.J., Pidgeon, G.P., and O'Byrne, K.J. (2015). Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor, signaling through neuropilin-1 in non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer* 14, 45.

Bar-Sagi, D., and Feramisco, J.R. (1986). Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by ras proteins. *Science* 233, 1061–1068.

Bastide, A., Karaa, Z., Bornes, S., Hieblot, C., Lacazette, E., Prats, H., and Touriol, C. (2008). An upstream open reading frame within an IRES controls expression of a specific VEGF-A isoform. *Nucleic Acids Res.* 36, 2434–2445.

B'chir, W., Maurin, A.-C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Stepien, G., Fafournoux, P., and Bruhat, A. (2013). The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* 41, 7683–7699.

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

Beck, H., and Plate, K.H. (2009). Angiogenesis after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 117, 481–496.

Beloribi-Djefafia, S., Vasseur, S., and Guillaumond, F. (2016). Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis* 5, e189.

Bental, M., and Deutsch, C. (1993). Metabolic changes in activated T cells: An NMR study of human peripheral blood lymphocytes. *Magn. Reson. Med.* 29, 317–326.

- Bergström, J., Fürst, P., Norée, L.O., and Vinnars, E. (1974). Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. *J. Appl. Physiol.* *36*, 693–697.
- Bernitt, E., Koh, C.G., Gov, N., and Döbereiner, H.-G. (2015). Dynamics of Actin Waves on Patterned Substrates: A Quantitative Analysis of Circular Dorsal Ruffles. *PLoS ONE* *10*.
- Berry, W.L., and Janknecht, R. (2013). KDM4/JMJD2 histone demethylases: epigenetic regulators in cancer cells. *Cancer Res.* *73*, 2936–2942.
- Betin, V.M.S., and Lane, J.D. (2009). Atg4D at the interface between autophagy and apoptosis. *Autophagy* *5*, 1057–1059.
- Bi, M., Naczki, C., Koritzinsky, M., Fels, D., Blais, J., Hu, N., Harding, H., Novoa, I., Varia, M., Raleigh, J., et al. (2005). ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *EMBO J.* *24*, 3470–3481.
- Boado, R.J., and Pardridge, W.M. (2002). Glucose deprivation and hypoxia increase the expression of the GLUT1 glucose transporter via a specific mRNA cis-acting regulatory element. *J. Neurochem.* *80*, 552–554.
- Bonni, A., Brunet, A., West, A.E., Datta, S.R., Takasu, M.A., and Greenberg, M.E. (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* *286*, 1358–1362.
- Bos, J.L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* *49*, 4682–4689.
- Bröer, A., Rahimi, F., and Bröer, S. (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.* *291*, 13194–13205.
- Bruhat, A., Jousse, C., Wang, X.-Z., Ron, D., Ferrara, M., and Fafournoux, P. (1997). Amino Acid Limitation Induces Expression of CHOP, a CCAAT/Enhancer Binding Protein-related Gene, at Both Transcriptional and Post-transcriptional Levels. *J. Biol. Chem.* *272*, 17588–17593.
- Bruhat, A., Averous, J., Carraro, V., Zhong, C., Reimold, A.M., Kilberg, M.S., and Fafournoux, P. (2002). Differences in the molecular mechanisms involved in the transcriptional activation of the CHOP and asparagine synthetase genes in response to amino acid deprivation or activation of the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* *277*, 48107–48114.
- Bruhat, A., Chérasse, Y., Chaveroux, C., Maurin, A.-C., Jousse, C., and Fafournoux, P. (2009). Amino acids as regulators of gene expression in mammals: molecular mechanisms. *BioFactors Oxf. Engl.* *35*, 249–257.
- Buerger, C., DeVries, B., and Stambolic, V. (2006). Localization of Rheb to the endomembrane is critical for its signaling function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *344*, 869–880.
- Cadena, S.G. de la, Hernández-Fonseca, K., Camacho-Arroyo, I., and Massieu, L. (2013). Glucose deprivation induces reticulum stress by the PERK pathway and caspase-7- and calpain-mediated caspase-12 activation. *Apoptosis* *19*, 414–427.

- Cai, D., Huang, E., Luo, B., Yang, Y., Zhang, F., Liu, C., Lin, Z., Xie, W.-B., and Wang, H. (2016). Nupr1/Chop signal axis is involved in mitochondrion-related endothelial cell apoptosis induced by methamphetamine. *Cell Death Dis.* 7, e2161.
- Cano, N., Barnoud, D., Schneider, S., Vasson, M.-P., Hasselmann, M., and Leverve, X. (2007). *Traité de nutrition artificielle de l'adulte.*
- Cao, Y., E, G., Wang, E., Pal, K., Dutta, S.K., Bar-Sagi, D., and Mukhopadhyay, D. (2012). VEGF exerts an angiogenesis-independent function in cancer cells to promote their malignant progression. *Cancer Res.* 72, 3912–3918.
- Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.-M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., et al. (1998). Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394, 485–490.
- Carracedo, A., Gironella, M., Lorente, M., Garcia, S., Guzmán, M., Velasco, G., and Iovanna, J.L. (2006). Cannabinoids induce apoptosis of pancreatic tumor cells via endoplasmic reticulum stress-related genes. *Cancer Res.* 66, 6748–6755.
- Carraro, V., Maurin, A.-C., Lambert-Langlais, S., Averous, J., Chaveroux, C., Parry, L., Jousse, C., Ord, D., Ord, T., Fafournoux, P., et al. (2010). Amino acid availability controls TRB3 transcription in liver through the GCN2/eIF2 α /ATF4 pathway. *PloS One* 5, e15716.
- Casanovas, O., Hicklin, D.J., Bergers, G., and Hanahan, D. (2005). Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 8, 299–309.
- Chantranupong, L., Wolfson, R.L., Orozco, J.M., Saxton, R.A., Scaria, S.M., Bar-Peled, L., Spooner, E., Isasa, M., Gygi, S.P., and Sabatini, D.M. (2014). The Sestrins interact with GATOR2 to negatively regulate the amino acid sensing pathway upstream of mTORC1. *Cell Rep.* 9, 1–8.
- Chantranupong, L., Scaria, S.M., Saxton, R.A., Gygi, M.P., Shen, K., Wyant, G.A., Wang, T., Harper, J.W., Gygi, S.P., and Sabatini, D.M. (2016). The CASTOR Proteins Are Arginine Sensors for the mTORC1 Pathway. *Cell* 165, 153–164.
- Chaveroux, C., Lambert-Langlais, S., Cherasse, Y., Averous, J., Parry, L., Carraro, V., Jousse, C., Maurin, A.-C., Bruhat, A., and Fafournoux, P. (2010). Molecular mechanisms involved in the adaptation to amino acid limitation in mammals. *Biochimie* 92, 736–745.
- Chen, L., and Cui, H. (2015). Targeting Glutamine Induces Apoptosis: A Cancer Therapy Approach. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 22830–22855.
- Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F., and Maity, A. (2001). Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J. Biol. Chem.* 276, 9519–9525.
- Chen, D., Li, M., Luo, J., and Gu, W. (2003). Direct Interactions between HIF-1 α and Mdm2 Modulate p53 Function. *J. Biol. Chem.* 278, 13595–13598.

- Chen, L., Shi, Y., Yuan, J., Han, Y., Qin, R., Wu, Q., Jia, B., Wei, B., Wei, L., Dai, G., et al. (2014). HIF-1 Alpha Overexpression Correlates with Poor Overall Survival and Disease-Free Survival in Gastric Cancer Patients Post-Gastrectomy. *PLOS ONE* 9, e90678.
- Chen, P.E., Geballe, M.T., Stansfeld, P.J., Johnston, A.R., Yuan, H., Jacob, A.L., Snyder, J.P., Traynelis, S.F., and Wyllie, D.J.A. (2005). Structural Features of the Glutamate Binding Site in Recombinant NR1/NR2A N-Methyl-d-aspartate Receptors Determined by Site-Directed Mutagenesis and Molecular Modeling. *Mol. Pharmacol.* 67, 1470–1484.
- Chiche, J., Ilc, K., Laferrière, J., Trottier, E., Dayan, F., Mazure, N.M., Brahimi-Horn, M.C., and Pouyssegur, J. (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.
- Chubb, J.R., Wilkins, A., Thomas, G.M., and Insall, R.H. (2000). The Dictyostelium RasS protein is required for macropinocytosis, phagocytosis and the control of cell movement. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 4), 709–719.
- Clem, R.J., Cheng, E.H., Karp, C.L., Kirsch, D.G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M.B., Griffin, D.E., Earnshaw, W.C., Veluona, M.A., et al. (1998). Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 554–559.
- Collins, C.L., Wasa, M., Souba, W.W., and Abcouwer, S.F. (1998). Determinants of glutamine dependence and utilization by normal and tumor-derived breast cell lines. *J. Cell. Physiol.* 176, 166–178.
- Commisso, C., Davidson, S.M., Soydaner-Azeloglu, R.G., Parker, S.J., Kamphorst, J.J., Hackett, S., Grabocka, E., Nofal, M., Drebin, J.A., Thompson, C.B., et al. (2013). Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature* 497, 633–637.
- Conrad, M., and Sato, H. (2011). The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, system xc⁻: cystine supplier and beyond. *Amino Acids* 42, 231–246.
- Cormerais, Y., Giuliano, S., LeFloch, R., Front, B., Durivault, J., Tambutté, E., Massard, P.-A., Ballina, L.R. de la, Endou, H., Wempe, M.F., et al. (2016). 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. *Cancer Res.* 76, 4481–4492.
- Crawford, R.R., Prescott, E.T., Sylvester, C.F., Higdon, A.N., Shan, J., Kilberg, M.S., and Mungrue, I.N. (2015). Human CHAC1 Protein Degrades Glutathione and mRNA Induction is Regulated by the Transcription Factors ATF4 and ATF3 and a Bipartite ATF/CRE Element. *J. Biol. Chem.*
- Crespo, P., and León, J. (2000). Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 57, 1613–1636.
- Cui, H., Darmanin, S., Natsuisaka, M., Kondo, T., Asaka, M., Shindoh, M., Higashino, F., Hamuro, J., Okada, F., Kobayashi, M., et al. (2007). Enhanced Expression of Asparagine Synthetase under Glucose-Deprived Conditions Protects Pancreatic Cancer Cells from Apoptosis Induced by Glucose Deprivation and Cisplatin. *Cancer Res.* 67, 3345–3355.

- Dar, A.C., Dever, T.E., and Sicheri, F. (2005). Higher-Order Substrate Recognition of eIF2 α by the RNA-Dependent Protein Kinase PKR. *Cell* 122, 887–900.
- De Angelis, R., Iezzi, S., Bruno, T., Corbi, N., Di Padova, M., Floridi, A., Fanciulli, M., and Passananti, C. (2003). Functional interaction of the subunit 3 of RNA polymerase II (RPB3) with transcription factor-4 (ATF4). *FEBS Lett.* 547, 15–19.
- Deng, J., Harding, H.P., Raught, B., Gingras, A.-C., Berlanga, J.J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Ron, D., and Sonenberg, N. (2002). Activation of GCN2 in UV-irradiated cells inhibits translation. *Curr. Biol. CB* 12, 1279–1286.
- DeNicola, G.M., Chen, P.-H., Mullarky, E., Sudderth, J.A., Hu, Z., Wu, D., Tang, H., Xie, Y., Asara, J.M., Huffman, K.E., et al. (2015). NRF2 regulates serine biosynthesis in non-small cell lung cancer. *Nat. Genet.*
- Dey, S., Savant, S., Teske, B.F., Hatzoglou, M., Calkhoven, C.F., and Wek, R.C. (2012). Transcriptional repression of ATF4 gene by CCAAT/enhancer-binding protein β (C/EBP β) differentially regulates integrated stress response. *J. Biol. Chem.* 287, 21936–21949.
- Dharmawardhane, S., Schürmann, A., Sells, M.A., Chernoff, J., Schmid, S.L., and Bokoch, G.M. (2000). Regulation of Macropinocytosis by p21-activated Kinase-1. *Mol. Biol. Cell* 11, 3341–3352.
- Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E., Patel, D.N., Bauer, A.J., Cantley, A.M., Yang, W.S., et al. (2012). Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Non-Apoptotic Cell Death. *Cell* 149, 1060–1072.
- Do Van, B., Gouel, F., Jonneaux, A., Timmerman, K., Gelé, P., Pétrault, M., Bastide, M., Laloux, C., Moreau, C., Bordet, R., et al. (2016). Ferroptosis, a newly characterized form of cell death in Parkinson’s disease that is regulated by PKC. *Neurobiol. Dis.* 94, 169–178.
- Doherty, J.R., and Cleveland, J.L. (2013). Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *J. Clin. Invest.* 123, 3685–3692.
- Doktorova, H., Hrabeta, J., Khalil, M.A., and Eckschlager, T. (2015). Hypoxia-induced chemoresistance in cancer cells: The role of not only HIF-1. *Biomed. Pap.*
- Dong, J., Qiu, H., Garcia-Barrio, M., Anderson, J., and Hinnebusch, A.G. (2000). Uncharged tRNA Activates GCN2 by Displacing the Protein Kinase Moiety from a Bipartite tRNA-Binding Domain. *Mol. Cell* 6, 269–279.
- Donnelly, N., Gorman, A.M., Gupta, S., and Samali, A. (2013). The eIF2 α kinases: their structures and functions. *Cell. Mol. Life Sci.*
- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 3, 11–22.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition. *Cell* 102, 33–42.

- Dubois, L., Peeters, S., Lieuwes, N.G., Geusens, N., Thiry, A., Wigfield, S., Carta, F., McIntyre, A., Scozzafava, A., Dogné, J.-M., et al. (2011). Specific inhibition of carbonic anhydrase IX activity enhances the in vivo therapeutic effect of tumor irradiation. *Radiother. Oncol.* 99, 424–431.
- Durán, R.V., MacKenzie, E.D., Boulahbel, H., Frezza, C., Heiserich, L., Tardito, S., Bussolati, O., Rocha, S., Hall, M.N., and Gottlieb, E. (2013). HIF-independent role of prolyl hydroxylases in the cellular response to amino acids. *Oncogene* 32, 4549–4556.
- Ebert, B.L., Firth, J.D., and 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.
- Ecker, N., Mor, A., Journo, D., and Abeliovich, H. (2010). Induction of autophagic flux by amino acid deprivation is distinct from nitrogen starvation-induced macroautophagy. *Autophagy* 6, 879–890.
- Eckhart, L., Ballaun, C., Hermann, M., VandeBerg, J.L., Sipos, W., Uthman, A., Fischer, H., and Tschachler, E. (2008). Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire. *Mol. Biol. Evol.* 25, 831–841.
- El Karoui, K., Viau, A., Dellis, O., Bagattin, A., Nguyen, C., Baron, W., Burtin, M., Broueilh, M., Heidet, L., Mollet, G., et al. (2016). Endoplasmic reticulum stress drives proteinuria-induced kidney lesions via Lipocalin 2. *Nat. Commun.* 7, 10330.
- Ertel, I.J., Nesbit, M.E., Hammond, D., Weiner, J., and Sather, H. (1979). Effective dose of L-asparaginase for induction of remission in previously treated children with acute lymphocytic leukemia: a report from Childrens Cancer Study Group. *Cancer Res.* 39, 3893–3896.
- Fels, D.R., and Koumenis, C. (2006). The PERK/eIF2 α /ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth. *Cancer Biol. Ther.* 5, 723–728.
- Fernandez, J., Lopez, A.B., Wang, C., Mishra, R., Zhou, L., Yaman, I., Snider, M.D., and Hatzoligou, M. (2003). Transcriptional Control of the Arginine/Lysine Transporter, Cat-1, by Physiological Stress. *J. Biol. Chem.* 278, 50000–50009.
- Flo, T.H., Smith, K.D., Sato, S., Rodriguez, D.J., Holmes, M.A., Strong, R.K., Akira, S., and Aderem, A. (2004). Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 432, 917–921.
- Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., and Semenza, G.L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4604–4613.
- Fougeray, S., Mami, I., Bertho, G., Beaune, P., Thervet, E., and Pallet, N. (2012). Tryptophan depletion and the kinase GCN2 mediate IFN- γ -induced autophagy. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 189, 2954–2964.
- Frias, M.A., Thoreen, C.C., Jaffe, J.D., Schroder, W., Sculley, T., Carr, S.A., and Sabatini, D.M. (2006). mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr. Biol. CB* 16, 1865–1870.

- Fuchs, B.C., and Bode, B.P. (2005). Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: Partners in crime? *Semin. Cancer Biol.* *15*, 254–266.
- Galehdar, Z., Swan, P., Fuerth, B., Callaghan, S.M., Park, D.S., and Cregan, S.P. (2010). Neuronal Apoptosis Induced by Endoplasmic Reticulum Stress Is Regulated by ATF4–CHOP-Mediated Induction of the Bcl-2 Homology 3-Only Member PUMA. *J. Neurosci.* *30*, 16938–16948.
- Ganley, I.G., Lam, D.H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., and Jiang, X. (2009). ULK1·ATG13·FIP200 Complex Mediates mTOR Signaling and Is Essential for Autophagy. *J. Biol. Chem.* *284*, 12297–12305.
- Garcia-Barrio, M., Dong, J., Ufano, S., and Hinnebusch, A.G. (2000). Association of GCN1–GCN20 regulatory complex with the N-terminus of eIF2 α kinase GCN2 is required for GCN2 activation. *EMBO J.* *19*, 1887–1899.
- Garrow, T.A., Brenner, A.A., Whitehead, V.M., Chen, X.N., Duncan, R.G., Korenberg, J.R., and Shane, B. (1993). Cloning of human cDNAs encoding mitochondrial and cytosolic serine hydroxymethyltransferases and chromosomal localization. *J. Biol. Chem.* *268*, 11910–11916.
- van Geldermalsen, M., Wang, Q., Nagarajah, R., Marshall, A.D., Thoeng, A., Gao, D., Ritchie, W., Feng, Y., Bailey, C.G., Deng, N., et al. (2016). ASCT2/SLC1A5 controls glutamine uptake and tumour growth in triple-negative basal-like breast cancer. *Oncogene* *35*, 3201–3208.
- Generali, D., Berruti, A., Brizzi, M.P., Campo, L., Bonardi, S., Wigfield, S., Bersiga, A., Allevi, G., Milani, M., Aguggini, S., et al. (2006). Hypoxia-inducible factor-1 α expression predicts a poor response to primary chemoendocrine therapy and disease-free survival in primary human breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *12*, 4562–4568.
- Giatromanolaki, A., and Harris, A.L. (2001). Tumour hypoxia, hypoxia signaling pathways and hypoxia inducible factor expression in human cancer. *Anticancer Res.* *21*, 4317–4324.
- Gingras, A.C., Gygi, S.P., Raught, B., Polakiewicz, R.D., Abraham, R.T., Hoekstra, M.F., Aebersold, R., and Sonenberg, N. (1999). Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev.* *13*, 1422–1437.
- Gjymishka, A., Pali, S.S., Shan, J., and Kilberg, M.S. (2008). Despite increased ATF4 binding at the C/EBP-ATF composite site following activation of the unfolded protein response, system A transporter 2 (SNAT2) transcription activity is repressed in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* *283*, 27736–27747.
- Goberdhan, D.C.I., Wilson, C., and Harris, A.L. (2016). Amino Acid Sensing by mTORC1: Intracellular Transporters Mark the Spot. *Cell Metab.* *23*, 580–589.
- Gonzalez, D.E., Covitz, K.M., Sadée, W., and Mrsny, R.J. (1998). An oligopeptide transporter is expressed at high levels in the pancreatic carcinoma cell lines AsPc-1 and Capan-2. *Cancer Res.* *58*, 519–525.

- Graham, N.A., Tahmasian, M., Kohli, B., Komisopoulou, E., Zhu, M., Vivanco, I., Teitell, M.A., Wu, H., Ribas, A., Lo, R.S., et al. (2012). Glucose deprivation activates a metabolic and signaling amplification loop leading to cell death. *Mol. Syst. Biol.* 8, 589.
- Grun, D., Adhikary, G., and Eckert, R.L. (2016). VEGF-A acts via neuropilin-1 to enhance epidermal cancer stem cell survival and formation of aggressive and highly vascularized tumors. *Oncogene* 35, 4379–4387.
- Guest, C.B., Chakour, K.S., and Freund, G.G. (2008). Macropinocytosis is decreased in diabetic mouse macrophages and is regulated by AMPK. *BMC Immunol.* 9, 42.
- Hai, T., and Hartman, M.G. (2001). The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* 273, 1–11.
- Han, J., Back, S.H., Hur, J., Lin, Y.-H., Gildersleeve, R., Shan, J., Yuan, C.L., Krokowski, D., Wang, S., Hatzoglou, M., et al. (2013). ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat. Cell Biol.* 15, 481–490.
- Han, J.M., Jeong, S.J., Park, M.C., Kim, G., Kwon, N.H., Kim, H.K., Ha, S.H., Ryu, S.H., and Kim, S. (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., Kozlowski, M.T., Belham, C., and 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.
- Harding, H.P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397, 271–274.
- Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. (2000). Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells. *Mol. Cell* 6, 1099–1108.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., et al. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* 11, 619–633.
- Hayakawa, M., Miyashita, H., Sakamoto, I., Kitagawa, M., Tanaka, H., Yasuda, H., Karin, M., and Kikugawa, K. (2003). Evidence that reactive oxygen species do not mediate NF- κ B activation. *EMBO J.* 22, 3356–3366.
- Hayashi, K., Jutabha, P., Endou, H., and Anzai, N. (2012). c-Myc is crucial for the expression of LAT1 in MIA Paca-2 human pancreatic cancer cells. *Oncol. Rep.* 28, 862–866.
- He, B., Gross, M., and Roizman, B. (1997). The γ 134.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1 α to dephosphorylate the α subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 843–848.

- He, H., Singh, I., Wek, S.A., Dey, S., Baird, T.D., Wek, R.C., and Georgiadis, M.M. (2014). Crystal Structures of GCN2 Protein Kinase C-terminal Domains Suggest Regulatory Differences in Yeast and Mammals. *J. Biol. Chem.* 289, 15023–15034.
- Heitman, J., Movva, N.R., and Hall, M.N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253, 905–909.
- Hellström, M., Kalén, M., Lindahl, P., Abramsson, A., and Betsholtz, C. (1999). Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Dev. Camb. Engl.* 126, 3047–3055.
- Heublein, S., Kazi, S., Ogmundsdóttir, M.H., Attwood, E.V., Kala, S., Boyd, C. a. R., Wilson, C., and Goberdhan, D.C.I. (2010). Proton-assisted amino-acid transporters are conserved regulators of proliferation and amino-acid-dependent mTORC1 activation. *Oncogene* 29, 4068–4079.
- Hibbs, M.S., and Bainton, D.F. (1989). Human neutrophil gelatinase is a component of specific granules. *J. Clin. Invest.* 84, 1395–1402.
- Holmes, D.I., and Zachary, I. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biol.* 6, 209.
- Horvitz, H.R. (1999). Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.* 59, 1701s–1706s.
- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S. -i., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., et al. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1-Atg13-FIP200 Complex Required for Autophagy. *Mol. Biol. Cell* 20, 1981–1991.
- Huang, K., and Fingar, D.C. (2014). Growing knowledge of the mTOR signaling network. *Semin. Cell Dev. Biol.* 0, 79–90.
- Huang, Y., Dai, Z., Barbacioru, C., and Sadée, W. (2005). Cystine-glutamate transporter SLC7A11 in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res.* 65, 7446–7454.
- Hunger, R.E., Brand, C.U., Streit, M., Eriksen, J.A., Gjertsen, M.K., Saeterdal, I., Braathen, L.R., and Gaudernack, G. (2001). Successful induction of immune responses against mutant ras in melanoma patients using intradermal injection of peptides and GM-CSF as adjuvant. *Exp. Dermatol.* 10, 161–167.
- Hyatt, S.L., Aulak, K.S., Malandro, M., Kilberg, M.S., and Hatzoglou, M. (1997). Adaptive Regulation of the Cationic Amino Acid Transporter-1 (Cat-1) in Fao Cells. *J. Biol. Chem.* 272, 19951–19957.
- Hyde, R., Cwiklinski, E.L., MacAulay, K., Taylor, P.M., and Hundal, H.S. (2007). Distinct Sensor Pathways in the Hierarchical Control of SNAT2, a Putative Amino Acid Transporter, by Amino Acid Availability. *J. Biol. Chem.* 282, 19788–19798.
- Inoue, M., Terada, T., Okuda, M., and Inui, K.-I. (2005). Regulation of human peptide transporter 1 (PEPT1) in gastric cancer cells by anticancer drugs. *Cancer Lett.* 230, 72–80.

- Ishizawa, J., Kojima, K., Chachad, D., Ruvolo, P., Ruvolo, V., Jacamo, R.O., Borthakur, G., Mu, H., Zeng, Z., Tabe, Y., et al. (2016). ATF4 induction through an atypical integrated stress response to ONC201 triggers p53-independent apoptosis in hematological malignancies. *Sci. Signal.* *9*, ra17.
- Izuishi, K., Kato, K., Ogura, T., Kinoshita, T., and Esumi, H. (2000). Remarkable Tolerance of Tumor Cells to Nutrient Deprivation: Possible New Biochemical Target for Cancer Therapy. *Cancer Res.* *60*, 6201–6207.
- Jefferies, H.B., Fumagalli, S., Dennis, P.B., Reinhard, C., Pearson, R.B., and Thomas, G. (1997). Rapamycin suppresses 5' TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J.* *16*, 3693–3704.
- Jewell, J.L., and Guan, K.-L. (2013). Nutrient Signaling to mTOR and Cell Growth. *Trends Biochem. Sci.* *38*, 233–242.
- Jia, X., Zhang, S., Zhu, H., Wang, W., Zhu, J., Wang, X., and Qiang, J. (2016). Increased Expression of PHGDH and Prognostic Significance in Colorectal Cancer. *Transl. Oncol.* *9*, 191–196.
- Jin, H.-O., Seo, S.-K., Woo, S.-H., Kim, E.-S., Lee, H.-C., Yoo, D.-H., Choe, T.-B., Hong, S.-I., Kim, J.-I., and Park, I.-C. (2009). SP600125 negatively regulates the mammalian target of rapamycin via ATF4-induced Redd1 expression. *FEBS Lett.* *583*, 123–127.
- Jousse, C., Bruhat, A., Carraro, V., Urano, F., Ferrara, M., Ron, D., and Fafournoux, P. (2001). Inhibition of CHOP translation by a peptide encoded by an open reading frame localized in the chop 5'UTR. *Nucleic Acids Res.* *29*, 4341–4351.
- Jousse, C., Oyadomari, S., Novoa, I., Lu, P., Zhang, Y., Harding, H.P., and Ron, D. (2003). Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2 α phosphatase, CReP, promotes survival of stressed cells. *J. Cell Biol.* *163*, 767–775.
- Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., et al. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* *410*, 549–554.
- Juel, C., and Halestrap, A.P. (1999). Lactate transport in skeletal muscle — role and regulation of the monocarboxylate transporter. *J. Physiol.* *517*, 633–642.
- Kaira, K., Oriuchi, N., Imai, H., Shimizu, K., Yanagitani, N., Sunaga, N., Hisada, T., Tanaka, S., Ishizuka, T., Kanai, Y., et al. (2008). l-type amino acid transporter 1 and CD98 expression in primary and metastatic sites of human neoplasms. *Cancer Sci.* *99*, 2380–2386.
- Kamphorst, J.J., Nofal, M., Commisso, C., Hackett, S.R., Lu, W., Grabocka, E., Heiden, M.G.V., Miller, G., Drebin, J.A., Bar-Sagi, D., et al. (2015). Human Pancreatic Cancer Tumors Are Nutrient Poor and Tumor Cells Actively Scavenge Extracellular Protein. *Cancer Res.* *75*, 544–553.
- Kanai, Y., Segawa, H., Miyamoto, K., Uchino, H., Takeda, E., and 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.

- Katz, C., Zaltsman-Amir, Y., Mostizky, Y., Kollet, N., Gross, A., and Friedler, A. (2012). Molecular basis of the interaction between proapoptotic truncated BID (tBID) protein and mitochondrial carrier homologue 2 (MTCH2) protein: key players in mitochondrial death pathway. *J. Biol. Chem.* *287*, 15016–15023.
- Keck, P.J., Hauser, S.D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J., and Connolly, D.T. (1989). Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* *246*, 1309–1312.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* *26*, 239–257.
- Kilberg, M.S., Shan, J., and Su, N. (2009). ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends Endocrinol. Metab.* *20*, 436–443.
- Kim, Y.C., and Guan, K.-L. (2015). mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J. Clin. Invest.* *125*, 25–32.
- Kim, D., Fiske, B.P., Birsoy, K., Freinkman, E., Kami, K., Possemato, R., Chudnovsky, Y., Pacold, M.E., Chen, W.W., Cantor, J.R., et al. (2015a). SHMT2 drives glioma cell survival in the tumor microenvironment but imposes a dependence on glycine clearance. *Nature* *520*, 363–367.
- Kim, D.-H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* *110*, 163–175.
- Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T.P., and Guan, K.-L. (2008). Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat. Cell Biol.* *10*, 935–945.
- Kim, H., Tu, H.-C., Ren, D., Takeuchi, O., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J.-D., and Cheng, E.H.-Y. (2009). Stepwise Activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA Initiates Mitochondrial Apoptosis. *Mol. Cell* *36*, 487–499.
- Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* *3*, 177–185.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* *13*, 132–141.
- Kim, S.E., Park, H.-J., Jeong, H.K., Kim, M.-J., Kim, M., Bae, O.-N., and Baek, S.-H. (2015b). Autophagy sustains the survival of human pancreatic cancer PANC-1 cells under extreme nutrient deprivation conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *463*, 205–210.
- Kirsch, D.G., Doseff, A., Chau, B.N., Lim, D.-S., Souza-Pinto, N.C. de, Hansford, R., Kastan, M.B., Lazebnik, Y.A., and Hardwick, J.M. (1999). Caspase-3-dependent Cleavage of Bcl-2 Promotes Release of Cytochrome c. *J. Biol. Chem.* *274*, 21155–21161.
- Kjeldsen, L., Johnsen, A.H., Sengeløv, H., and Borregaard, N. (1993). Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J. Biol. Chem.* *268*, 10425–10432.

- Klann, E., and Dever, T.E. (2004). Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 931–942.
- Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., Adachi, H., Adams, C.M., Adams, P.D., Adeli, K., et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12, 1–222.
- Koivusalo, M., Welch, C., Hayashi, H., Scott, C.C., Kim, M., Alexander, T., Touret, N., Hahn, K.M., and Grinstein, S. (2010). Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *J. Cell Biol.* 188, 547–563.
- Korc, M. (2003). Pathways for aberrant angiogenesis in pancreatic cancer. *Mol. Cancer* 2, 8.
- Koukourakis, M.I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Bougioukas, G., Didilis, V., Gatter, K.C., and Harris, A.L. (2003). Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *Br. J. Cancer* 89, 877–885.
- Koukourakis, M.I., Bentzen, S.M., Giatromanolaki, A., Wilson, G.D., Daley, F.M., Saunders, M.I., Dische, S., Sivridis, E., and Harris, A.L. (2006). Endogenous markers of two separate hypoxia response pathways (hypoxia inducible factor 2 alpha and carbonic anhydrase 9) are associated with radiotherapy failure in head and neck cancer patients recruited in the CHART randomized trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24, 727–735.
- Krishnamoorthy, T., Pavitt, G.D., Zhang, F., Dever, T.E., and Hinnebusch, A.G. (2001). Tight binding of the phosphorylated alpha subunit of initiation factor 2 (eIF2alpha) to the regulatory subunits of guanine nucleotide exchange factor eIF2B is required for inhibition of translation initiation. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5018–5030.
- Kumar, S. (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 14, 32–43.
- Kung, C., Hixon, J., Choe, S., Marks, K., Gross, S., Murphy, E., DeLaBarre, B., Cianchetta, G., Sethumadhavan, S., Wang, X., et al. (2012). Small Molecule Activation of PKM2 in Cancer Cells Induces Serine Auxotrophy. *Chem. Biol.* 19, 1187–1198.
- Kwon, N.H., Kang, T., Lee, J.Y., Kim, H.H., Kim, H.R., Hong, J., Oh, Y.S., Han, J.M., Ku, M.J., Lee, S.Y., et al. (2011). Dual role of methionyl-tRNA synthetase in the regulation of translation and tumor suppressor activity of aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multifunctional protein-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 19635–19640.
- Lacey, J.M., and Wilmore, D.W. (1990). Is Glutamine a Conditionally Essential Amino Acid? *Nutr. Rev.* 48, 297–309.
- Lakhani, S.A., Masud, A., Kuida, K., Porter, G.A., Booth, C.J., Mehal, W.Z., Inayat, I., and Flavell, R.A. (2006). Caspases 3 and 7: Key Mediators of Mitochondrial Events of Apoptosis. *Science* 311, 847–851.
- Lange, P.S., Chavez, J.C., Pinto, J.T., Coppola, G., Sun, C.-W., Townes, T.M., Geschwind, D.H., and Ratan, R.R. (2008). ATF4 is an oxidative stress-inducible, prodeath transcription factor in neurons in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 205, 1227–1242.

- LaPensee, C.R., Mann, J.E., Rainey, W.E., Crudo, V., Hunt, S.W., and Hammer, G.D. (2016). ATR-101, a Selective and Potent Inhibitor of Acyl-CoA Acyltransferase 1, Induces Apoptosis in H295R Adrenocortical Cells and in the Adrenal Cortex of Dogs. *Endocrinology* *157*, 1775–1788.
- Lassot, I., Ségéral, E., Berlioz-Torrent, C., Durand, H., Groussin, L., Hai, T., Benarous, R., and Margottin-Goguet, F. (2001). ATF4 Degradation Relies on a Phosphorylation-Dependent Interaction with the SCF β TrCP Ubiquitin Ligase. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 2192–2202.
- Lassot, I., Estrabaud, E., Emiliani, S., Benkirane, M., Benarous, R., and Margottin-Goguet, F. (2005). p300 modulates ATF4 stability and transcriptional activity independently of its acetyltransferase domain. *J. Biol. Chem.* *280*, 41537–41545.
- Lee, E., and Knecht, D.A. (2002). Visualization of Actin Dynamics During Macropinocytosis and Exocytosis. *Traffic* *3*, 186–192.
- Lee, Y.-Y., Cevallos, R.C., and Jan, E. (2009). An Upstream Open Reading Frame Regulates Translation of GADD34 during Cellular Stresses That Induce eIF2 Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *284*, 6661–6673.
- Leguina-Ruzzi, A. (2015). Therapeutic targets of glutamine in parenteral nutrition: a medical science review. *Int. J. Prev. Treat.* *4*, 34–39.
- Leibach, F.H., and Ganapathy, V. (1996). Peptide Transporters in the Intestine and the Kidney. *Annu. Rev. Nutr.* *16*, 99–119.
- Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor-tyrosine kinases. *Cell* *141*, 1117–1134.
- León-Annicchiarico, C.L., Ramírez-Peinado, S., Domínguez-Villanueva, D., Gonsberg, A., Lampidis, T.J., and Muñoz-Pinedo, C. (2015). ATF4 mediates necrosis induced by glucose deprivation and apoptosis induced by 2-deoxyglucose in the same cells. *FEBS J.* *282*, 3647–3658.
- Leprievier, G., Remke, M., Rotblat, B., Dubuc, A., Mateo, A.-R.F., Kool, M., Agnihotri, S., El-Naggar, A., Yu, B., Prakash Somasekharan, S., et al. (2013). The eEF2 Kinase Confers Resistance to Nutrient Deprivation by Blocking Translation Elongation. *Cell* *153*, 1064–1079.
- Levintow, L. (1957). Evidence that glutamine is a precursor of asparagine in a human cell in tissue culture. *Science* *126*, 611–612.
- Levy, A.P., Levy, N.S., Wegner, S., and Goldberg, M.A. (1995). Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J. Biol. Chem.* *270*, 13333–13340.
- Lewerenz, J., Sato, H., Albrecht, P., Henke, N., Noack, R., Methner, A., and Maher, P. (2012). Mutation of ATF4 mediates resistance of neuronal cell lines against oxidative stress by inducing xCT expression. *Cell Death Differ.* *19*, 847–858.
- Lewerenz, J., Hewett, S.J., Huang, Y., Lambros, M., Gout, P.W., Kalivas, P.W., Massie, A., Smolders, I., Methner, A., Pergande, M., et al. (2013). The cystine/glutamate antiporter system x(c)(-) in health and disease: from molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* *18*, 522–555.

- Li, Z., and Zhang, H. (2015). Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression. *Cell. Mol. Life Sci.* *73*, 377–392.
- Li, B.S., Gu, L.J., Luo, C.Y., Li, W.S., Jiang, L.M., Shen, S.H., Jiang, H., Shen, S.H., Zhang, B., Chen, J., et al. (2006). The downregulation of asparagine synthetase expression can increase the sensitivity of cells resistant to L-asparaginase. *Leukemia* *20*, 2199–2201.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell* *94*, 491–501.
- Li, L.Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* *412*, 95–99.
- Li, X., Xun, Z., and Yang, Y. (2016). Inhibition of phosphoserine phosphatase enhances the anticancer efficacy of 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
- Lim, J.P., and Gleeson, P.A. (2011). Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol. Cell Biol.* *89*, 836–843.
- Limon, J.J., and Fruman, D.A. (2012). Akt and mTOR in B Cell Activation and Differentiation. *Front. Immunol.* *3*, 228.
- Lin, C.W., Tseng, S.W., Yang, S.F., Ko, C.P., Lin, C.H., Wei, L.H., Chien, M.H., and Hsieh, Y.S. (2012). Role of lipocalin 2 and its complex with matrix metalloproteinase-9 in oral cancer. *Oral Dis.* *18*, 734–740.
- Liu, Y., Cox, S.R., Morita, T., and Kourembanas, S. (1995). Hypoxia Regulates Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression in Endothelial Cells Identification of a 5' Enhancer. *Circ. Res.* *77*, 638–643.
- Locasale, J.W. (2013). Serine, glycine and the one-carbon cycle: cancer metabolism in full circle. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 572–583.
- Locasale, J.W., Grassian, A.R., Melman, T., Lyssiotis, C.A., Mattaini, K.R., Bass, A.J., Heffron, G., Metallo, C.M., Muranen, T., Sharfi, H., et al. (2011). Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat. Genet.* *43*, 869–874.
- Luo, S., Baumeister, P., Yang, S., Abcouwer, S.F., and Lee, A.S. (2003). Induction of Grp78/BiP by Translational Block ACTIVATION OF THE Grp78 PROMOTER BY ATF4 THROUGH AN UPSTREAM ATF/CRE SITE INDEPENDENT OF THE ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS ELEMENTS. *J. Biol. Chem.* *278*, 37375–37385.
- Lynch, J.W. (2004). Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol. Rev.* *84*, 1051–1095.
- Ma, Y., and Hendershot, L.M. (2003). Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* *278*, 34864–34873.
- Maiuri, M.C., Criollo, A., Tasdemir, E., Vicencio, J.M., Tajeddine, N., Hickman, J.A., Geneste, O., and Kroemer, G. (2007). BH3-only proteins and BH3 mimetics induce

autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *Autophagy* 3, 374–376.

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

Martina, J.A., Diab, H.I., Brady, O.A., and Puertollano, R. (2016). TFE3 and TFE3 are novel components of the integrated stress response. *EMBO J.* 35, 479–495.

Martinet, W., Meyer, G.R.Y.D., Herman, A.G., and Kockx, M.M. Amino Acid Deprivation Induces Both Apoptosis and Autophagy in Murine C2C12 Muscle Cells. *Biotechnol. Lett.* 27, 1157–1163.

Masereel, B., Pochet, L., and Laeckmann, D. (2003). An overview of inhibitors of Na(+)/H(+) exchanger. *Eur. J. Med. Chem.* 38, 547–554.

Masuoka, H.C., and Townes, T.M. (2002). Targeted disruption of the activating transcription factor 4 gene results in severe fetal anemia in mice. *Blood* 99, 736–745.

Matsumura, K., Sakai, C., Kawakami, S., Yamashita, F., and Hashida, M. (2014). Inhibition of Cancer Cell Growth by GRP78 siRNA Lipoplex *via* Activation of Unfolded Protein Response. *Biol. Pharm. Bull.* 37, 648–653.

Mayor, S., and Pagano, R.E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 603–612.

McCurrach, M.E., Connor, T.M.F., Knudson, C.M., Korsmeyer, S.J., and Lowe, S.W. (1997). bax-deficiency promotes drug resistance and oncogenic transformation by attenuating p53-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 2345–2349.

Meier, O., Boucke, K., Hammer, S.V., Keller, S., Stidwill, R.P., Hemmi, S., and Greber, U.F. (2002). Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J. Cell Biol.* 158, 1119–1131.

Méndez-Lucas, A., Hyroššová, P., Novellademunt, L., Viñals, F., and Perales, J.C. (2014). Mitochondrial PEPCK is a Pro-Survival, ER-Stress Response Gene Involved in Tumor Cell Adaptation to Nutrient Availability. *J. Biol. Chem.*

Meurs, E., Chong, K., Galabru, J., Thomas, N.S., Kerr, I.M., Williams, B.R., and Hovanessian, A.G. (1990). Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* 62, 379–390.

Meyuhas, O. (2008). Chapter 1 Physiological Roles of Ribosomal Protein S6: One of Its Kind. *B.-I.R. of C. and M. Biology*, ed. (Academic Press), pp. 1–37.

Milani, M., Rzymiski, T., Mellor, H.R., Pike, L., Bottini, A., Generali, D., and Harris, A.L. (2009). The role of ATF4 stabilization and autophagy in resistance of breast cancer cells treated with Bortezomib. *Cancer Res.* 69, 4415–4423.

- Milkereit, R., Persaud, A., Vanoaica, L., Guetg, A., Verrey, F., and Rotin, D. (2015). LAPT4b recruits the LAT1-4F2hc Leu transporter to lysosomes and promotes mTORC1 activation. *Nat. Commun.* *6*, 7250.
- Mishra, J., Dent, C., Tarabishi, R., Mitsnefes, M.M., Ma, Q., Kelly, C., Ruff, S.M., Zahedi, K., Shao, M., Bean, J., et al. (2005). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet Lond. Engl.* *365*, 1231–1238.
- Mole, D.R., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (2001). Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau Tumour Suppressor: Implications for Cellular Oxygen Sensing. *IUBMB Life* *52*, 43–47.
- Morioka, N., Abdin, J.M., Morita, K., Kitayama, T., Nakata, Y., and Dohi, T. (2008). The regulation of glycine transporter GLYT1 is mainly mediated by protein kinase Calpha in C6 glioma cells. *Neurochem. Int.* *53*, 248–254.
- Mousavi, S.A., Kjekens, R., Berg, T.O., Seglen, P.O., Berg, T., and Brech, A. (2001). Effects of inhibitors of the vacuolar proton pump on hepatic heterophagy and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* *1510*, 243–257.
- Muaddi, H., Majumder, M., Peidis, P., Papadakis, A.I., Holcik, M., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Hatzoglou, M., and Koromilas, A.E. (2010). Phosphorylation of eIF2 α at Serine 51 Is an Important Determinant of Cell Survival and Adaptation to Glucose Deficiency. *Mol. Biol. Cell* *21*, 3220–3231.
- Mueckler, M., and Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) Family of Membrane Transporters. *Mol. Aspects Med.* *34*, 121–138.
- Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S.A., Panico, M., Blench, I., Morris, H.R., Allard, W.J., Lienhard, G.E., and Lodish, H.F. (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* *229*, 941–945.
- Mullarky, E., Mattaini, K.R., Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Locasale, J.W. (2011). PHGDH amplification and altered glucose metabolism in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* *24*, 1112–1115.
- Mullarky, E., Lucki, N.C., Zavareh, R.B., Anglin, J.L., Gomes, A.P., Nicolay, B.N., Wong, J.C.Y., Christen, S., Takahashi, H., Singh, P.K., et al. (2016). Identification of a small molecule inhibitor of 3-phosphoglycerate dehydrogenase to target serine biosynthesis in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, 1778–1783.
- Mungrue, I.N., Pagnon, J., Kohannim, O., Gargalovic, P.S., and Lusa, A.J. (2009). CHAC1/MGC4504 is a novel proapoptotic component of the unfolded protein response, downstream of the ATF4-ATF3-CHOP cascade. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *182*, 466–476.
- Mustafa, A.K., Kim, P.M., and Snyder, S.H. (2004). D-Serine as a putative glial neurotransmitter. *Neuron Glia Biol.* *1*, 275–281.
- Nakamura, I., Hama, S., Itakura, S., Takasaki, I., Nishi, T., Tabuchi, Y., and Kogure, K. (2014). Lipocalin2 as a plasma marker for tumors with hypoxic regions. *Sci. Rep.* *4*, 7235.

- Nakanishi, T., Tamai, I., Sai, Y., Sasaki, T., and Tsuji, A. (1997). Carrier-mediated transport of oligopeptides in the human fibrosarcoma cell line HT1080. *Cancer Res.* 57, 4118–4122.
- Nakase, I., Kobayashi, N.B., Takatani-Nakase, T., and Yoshida, T. (2015). Active macropinocytosis induction by stimulation of epidermal growth factor receptor and oncogenic Ras expression potentiates cellular uptake efficacy of exosomes. *Sci. Rep.* 5, 10300.
- Napolitano, L., Scalise, M., Galluccio, M., Pochini, L., Albanese, L.M., and Indiveri, C. (2015). LAT1 is the transport competent unit of the LAT1/CD98 heterodimeric amino acid transporter. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 67, 25–33.
- Narasimhan, J., Staschke, K.A., and Wek, R.C. (2004). Dimerization Is Required for Activation of eIF2 Kinase Gcn2 in Response to Diverse Environmental Stress Conditions. *J. Biol. Chem.* 279, 22820–22832.
- Nielsen, K.H., Behrens, M.A., He, Y., Oliveira, C.L.P., Sottrup Jensen, L., Hoffmann, S.V., Pedersen, J.S., and Andersen, G.R. (2011). Synergistic activation of eIF4A by eIF4B and eIF4G. *Nucleic Acids Res.* 39, 2678–2689.
- Nikiforov, M.A., Chandriani, S., O’Connell, B., Petrenko, O., Kotenko, I., Beavis, A., Sedivy, J.M., and Cole, M.D. (2002). A functional screen for Myc-responsive genes reveals serine hydroxymethyltransferase, a major source of the one-carbon unit for cell metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5793–5800.
- Nikoletopoulou, V., Papandreou, M.-E., and Tavernarakis, N. (2015). Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system. *Cell Death Differ.* 22, 398–407.
- Nishimoto, A., Kugimiya, N., Hosoyama, T., Enoki, T., Li, T.-S., and Hamano, K. (2014). HIF-1 α activation under glucose deprivation plays a central role in the acquisition of anti-apoptosis in human colon cancer cells. *Int. J. Oncol.* 44, 2077–2084.
- Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Jungreis, R., Harding, H.P., and Ron, D. (2003). Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *EMBO J.* 22, 1180–1187.
- Núñez, N.P., Liu, H., and Meadows, G.G. (2006). PPAR- γ ligands and amino acid deprivation promote apoptosis of melanoma, prostate, and breast cancer cells. *Cancer Lett.* 236, 133–141.
- Ohoka, N., Yoshii, S., Hattori, T., Onozaki, K., and Hayashi, H. (2005). TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J.* 24, 1243–1255.
- Ohshima, Y., Kaira, K., Yamaguchi, A., Oriuchi, N., Tominaga, H., Nagamori, S., Kanai, Y., Yokobori, T., Miyazaki, T., Asao, T., et al. (2016). Efficacy of LAT1 inhibition as a therapeutic target in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.*
- Ohsumi, Y. (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 211–216.
- Okuno, S., Sato, H., Kuriyama-Matsumura, K., Tamba, M., Wang, H., Sohda, S., Hamada, H., Yoshikawa, H., Kondo, T., and Bannai, S. (2003). Role of cystine transport in intracellular

glutathione level and cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines. *Br. J. Cancer* 88, 951–956.

Onnis, B., Rapisarda, A., and Melillo, G. (2009). Development of HIF-1 inhibitors for cancer therapy. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 2780–2786.

Ören, B., Urosevic, J., Mertens, C., Mora, J., Guiu, M., Gomis, R.R., Weigert, A., Schmid, T., Grein, S., Brüne, B., et al. (2016). Tumour stroma-derived lipocalin-2 promotes breast cancer metastasis. *J. Pathol.* 239, 274–285.

O'Rourke, J.F., Pugh, C.W., Bartlett, S.M., and Ratcliffe, P.J. (1996). Identification of hypoxically inducible mRNAs in HeLa cells using differential-display PCR. Role of hypoxia-inducible factor-1. *Eur. J. Biochem. FEBS* 241, 403–410.

Osthus, R.C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., Xu, Y., Wonsey, D., Lee, L.A., and Dang, C.V. (2000). Deregulation of Glucose Transporter 1 and Glycolytic Gene Expression by c-Myc. *J. Biol. Chem.* 275, 21797–21800.

Otto, A.M., Hintermair, J., and Janzon, C. (2015). NADH-Linked Metabolic Plasticity of MCF-7 Breast Cancer Cells Surviving in a Nutrient-Deprived Microenvironment. *J. Cell. Biochem.* 116, 822–835.

Ou, Y., Wang, S.-J., Jiang, L., Zheng, B., and Gu, W. (2014). p53-mediated Regulation of Phosphoglycerate Dehydrogenase (PHGDH) is crucial for the Apoptotic Response Upon Serine Starvation. *J. Biol. Chem.* jbc.M114.616359.

Pacold, M.E., Brimacombe, K.R., Chan, S.H., Rohde, J.M., Lewis, C.A., Swier, L.J.Y.M., Possemato, R., Chen, W.W., Sullivan, L.B., Fiske, B.P., et al. (2016). A PHGDH inhibitor reveals coordination of serine synthesis and one-carbon unit fate. *Nat. Chem. Biol.* 12, 452–458.

Palii, S.S., Chen, H., and Kilberg, M.S. (2004). Transcriptional Control of the Human Sodium-coupled Neutral Amino Acid Transporter System A Gene by Amino Acid Availability Is Mediated by an Intronic Element. *J. Biol. Chem.* 279, 3463–3471.

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

Pan, Y.-X., Chen, H., Thiaville, M.M., and Kilberg, M.S. (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, 299–307.

Paone, A., Marani, M., Fiascarelli, A., Rinaldo, S., Giardina, G., Contestabile, R., Paiardini, A., and Cutruzzolà, F. (2014). SHMT1 knockdown induces apoptosis in lung cancer cells by causing uracil misincorporation. *Cell Death Dis.* 5, e1525.

Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., De Milito, A., Coscia, C., Iessi, E., Logozzi, M., Molinari, A., et al. (2009). Microenvironmental pH Is a Key Factor for Exosome Traffic in Tumor Cells. *J. Biol. Chem.* 284, 34211–34222.

- Peña-Llopis, S., Vega-Rubin-de-Celis, S., Schwartz, J.C., Wolff, N.C., Tran, T.A.T., Zou, L., Xie, X.-J., Corey, D.R., and Brugarolas, J. (2011). Regulation of TFEB and V-ATPases by mTORC1: Regulation of TFEB and V-ATPases by mTORC1. *EMBO J.* *30*, 3242–3258.
- Peng, M., Yin, N., and Li, M.O. (2014). Sestrins function as guanine nucleotide dissociation inhibitors for Rag GTPases to control mTORC1 signaling. *Cell* *159*, 122–133.
- Pietrocola, F., Izzo, V., Niso-Santano, M., Vacchelli, E., Galluzzi, L., Maiuri, M.C., and Kroemer, G. (2013). Regulation of autophagy by stress-responsive transcription factors. *Semin. Cancer Biol.* *23*, 310–322.
- Pike, L.R.G., Phadwal, K., Simon, A.K., and Harris, A.L. (2012). ATF4 orchestrates a program of BH3-only protein expression in severe hypoxia. *Mol. Biol. Rep.* *39*, 10811–10822.
- Pinheiro, C., Sousa, B., Albergaria, A., Paredes, J., Dufloth, R., Vieira, D., Schmitt, F., and Baltazar, F. (2011). GLUT1 and CAIX expression profiles in breast cancer correlate with adverse prognostic factors and MCT1 overexpression. *Histol. Histopathol.* *26*, 1279–1286.
- Pinilla, J., Aledo, J.C., Cwiklinski, E., Hyde, R., Taylor, P.M., and Hundal, H.S. (2011). SNAT2 transceptor signalling via mTOR: A role in cell growth and proliferation? *Front. Biosci.* *3*, 1289–1299.
- Potente, M., Gerhardt, H., and Carmeliet, P. (2011). Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. *Cell* *146*, 873–887.
- Puente, C., Hendrickson, R.C., and Jiang, X. (2016). Nutrient-regulated Phosphorylation of ATG13 Inhibits Starvation-induced Autophagy. *J. Biol. Chem.* *291*, 6026–6035.
- Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P.N., Huntington, N.D., Hughes, P.D., Michalak, E.M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., et al. (2007). ER Stress Triggers Apoptosis by Activating BH3-Only Protein Bim. *Cell* *129*, 1337–1349.
- Qing, G., Li, B., Vu, A., Skuli, N., Walton, Z.E., Liu, X., Mayes, P.A., Wise, D.R., Thompson, C.B., Maris, J.M., et al. (2012). ATF4 regulates MYC-mediated neuroblastoma cell death upon glutamine deprivation. *Cancer Cell* *22*, 631–644.
- Qiu, H., Dong, J., Hu, C., Francklyn, C.S., and Hinnebusch, A.G. (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*, 1425–1438.
- Racoosin, E.L., and Swanson, J.A. (1992). M-CSF-induced macropinocytosis increases solute endocytosis but not receptor-mediated endocytosis in mouse macrophages. *J. Cell Sci.* *102* (Pt 4), 867–880.
- Racoosin, E.L., and Swanson, J.A. (1993). Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. *J. Cell Biol.* *121*, 1011–1020.
- Raught, B., Peiretti, F., Gingras, A.-C., Livingstone, M., Shahbazian, D., Mayeur, G.L., Polakiewicz, R.D., Sonenberg, N., and Hershey, J.W. (2004). Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *EMBO J.* *23*, 1761–1769.

- Rebsamen, M., Pochini, L., Stasyk, T., de Araújo, M.E.G., Galluccio, M., Kandasamy, R.K., Snijder, B., Fauster, A., Rudashevskaya, E.L., Bruckner, M., et al. (2015). SLC38A9 is a component of the lysosomal amino acid sensing machinery that controls mTORC1. *Nature* 519, 477–481.
- Reed, J.C. (1997). Cytochrome c: Can't Live with It—Can't Live without It. *Cell* 91, 559–562.
- Ren, P., Yue, M., Xiao, D., Xiu, R., Gan, L., Liu, H., and Qing, G. (2015). ATF4 and N-Myc coordinate glutamine metabolism in MYCN-amplified neuroblastoma cells through ASCT2 activation. *J. Pathol.* 235, 90–100.
- Ribe, E.M., Serrano-Saiz, E., Akpan, N., and Troy, C.M. (2008). Mechanisms of neuronal death in disease: defining the models and the players. *Biochem. J.* 415, 165–182.
- Roczniak-Ferguson, A., Petit, C.S., Froehlich, F., Qian, S., Ky, J., Angarola, B., Walther, T.C., and Ferguson, S.M. (2012). The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. *Sci. Signal.* 5, ra42.
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P.H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M.J., Waterfield, M.D., and Downward, J. (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370, 527–532.
- Ronchi, V.P., Giudici, A.M., Mendieta, J.R., Caballero, V.J., Chisari, A.N., Sanllorenti, P.M., and Conde, R.D. (2010). Oxidative stress in mouse liver caused by dietary amino acid deprivation: protective effect of methionine. *J. Physiol. Biochem.* 66, 93–103.
- Rose, E.M., Koo, J.C.P., Antflick, J.E., Ahmed, S.M., Angers, S., and Hampson, D.R. (2009). Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 8143–8155.
- Roybal, C.N., Yang, S., Sun, C.-W., Hurtado, D., Vander Jagt, D.L., Townes, T.M., and Abcouwer, S.F. (2004). Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4. *J. Biol. Chem.* 279, 14844–14852.
- Roybal, C.N., Hunsaker, L.A., Barbash, O., Jagt, D.L.V., and Abcouwer, S.F. (2005). The Oxidative Stressor Arsenite Activates Vascular Endothelial Growth Factor mRNA Transcription by an ATF4-dependent Mechanism. *J. Biol. Chem.* 280, 20331–20339.
- Rubinstein, A.D., Eisenstein, M., Ber, Y., Bialik, S., and Kimchi, A. (2011). The autophagy protein Atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell* 44, 698–709.
- Russell, R.C., Yuan, H.-X., and Guan, K.-L. (2014). Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Res.* 24, 42–57.
- Rzymiski, T., Milani, M., Singleton, D.C., and Harris, A.L. (2009). Role of ATF4 in regulation of autophagy and resistance to drugs and hypoxia. *Cell Cycle* 8, 3838–3847.

- Rzymiski, T., Milani, M., Pike, L., Buffa, F., Mellor, H.R., Winchester, L., Pires, I., Hammond, E., Ragoussis, I., and Harris, A.L. (2010). Regulation of autophagy by ATF4 in response to severe hypoxia. *Oncogene* 29, 4424–4435.
- Sabatini, D.M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., and Snyder, S.H. (1994). RAFT1: A mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 78, 35–43.
- Sachdeva, M.M., Claiborn, K.C., Khoo, C., Yang, J., Groff, D.N., Mirmira, R.G., and Stoffers, D.A. (2009). Pdx1 (MODY4) regulates pancreatic beta cell susceptibility to ER stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 19090–19095.
- Sadasivan, S., Waghray, A., Lerner, S.F., Jr, W.A.D., Hayes, R.L., and Wang, K.K.W. (2006). Amino acid starvation induced autophagic cell death in PC-12 cells: Evidence for activation of caspase-3 but not calpain-1. *Apoptosis* 11, 1573–1582.
- Saigusa, S., Toiyama, Y., Tanaka, K., Okugawa, Y., Fujikawa, H., Matsushita, K., Uchida, K., Inoue, Y., and Kusunoki, M. (2012). Prognostic significance of glucose transporter-1 (GLUT1) gene expression in rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy. *Surg. Today* 42, 460–469.
- Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96–99.
- Salceda, S., and Caro, J. (1997). Hypoxia-inducible Factor 1 α (HIF-1 α) Protein Is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions ITS STABILIZATION BY HYPOXIA DEPENDS ON REDOX-INDUCED CHANGES. *J. Biol. Chem.* 272, 22642–22647.
- Sancak, Y., Peterson, T.R., Shaul, Y.D., Lindquist, R.A., Thoreen, C.C., Bar-Peled, L., and Sabatini, D.M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320, 1496–1501.
- Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A.L., Nada, S., and Sabatini, D.M. (2010). Regulator-Rag Complex Targets mTORC1 to the Lysosomal Surface and Is Necessary for Its Activation by Amino Acids. *Cell* 141, 290–303.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.-H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol. CB* 14, 1296–1302.
- Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D.L., Valenza, M., Gennarino, V.A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R.S., et al. (2009). A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* 325, 473–477.
- Sato, H., Nomura, S., Maebara, K., Sato, K., Tamba, M., and Bannai, S. (2004). Transcriptional control of cystine/glutamate transporter gene by amino acid deprivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325, 109–116.

- Sato, K., Tsuchihara, K., Fujii, S., Sugiyama, M., Goya, T., Atomi, Y., Ueno, T., Ochiai, A., and Esumi, H. (2007). Autophagy Is Activated in Colorectal Cancer Cells and Contributes to the Tolerance to Nutrient Deprivation. *Cancer Res.* *67*, 9677–9684.
- Sbiera, S., Leich, E., Liebisch, G., Sbiera, I., Schirbel, A., Wiemer, L., Matysik, S., Eckhardt, C., Gardill, F., Gehl, A., et al. (2015). Mitotane Inhibits Sterol-O-Acyl Transferase 1 Triggering Lipid-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Adrenocortical Carcinoma Cells. *Endocrinology* *156*, 3895–3908.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.-M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* *17*, 1675–1687.
- Schulte, M.L., Khodadadi, A.B., Cuthbertson, M.L., Smith, J.A., and Manning, H.C. (2016). 2-Amino-4-bis(aryloxybenzyl)aminobutanoic acids: A novel scaffold for inhibition of ASCT2-mediated glutamine transport. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *26*, 1044–1047.
- Seastone, D.J., Harris, E., Temesvari, L.A., Bear, J.E., Saxe, C.L., and Cardelli, J. (2001). The WASp-like protein Scar regulates macropinocytosis, phagocytosis and endosomal membrane flow in Dictyostelium. *J. Cell Sci.* *114*, 2673–2683.
- Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 721–732.
- Shah, O.J., Anthony, J.C., Kimball, S.R., and Jefferson, L.S. (2000). 4E-BP1 and S6K1: translational integration sites for nutritional and hormonal information in muscle. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* *279*, E715–E729.
- Sharma, R., Williams, P.J., Gupta, A., McCluskey, B., Bhaskaran, S., Muñoz, S., and Oyajobi, B.O. (2015). A dominant-negative F-box deleted mutant of E3 ubiquitin ligase, β -TrCP1/FWD1, markedly reduces myeloma cell growth and survival in mice. *Oncotarget* *6*, 21589–21602.
- Shimizu, K., Kaira, K., Tomizawa, Y., Sunaga, N., Kawashima, O., Oriuchi, N., Tominaga, H., Nagamori, S., Kanai, Y., Yamada, M., et al. (2014). ASC amino-acid transporter 2 (ASCT2) as a novel prognostic marker in non-small cell lung cancer. *Br. J. Cancer* *110*, 2030–2039.
- Sibilia, M., Fleischmann, A., Behrens, A., Stingl, L., Carroll, J., Watt, F.M., Schlessinger, J., and Wagner, E.F. (2000). The EGF receptor provides an essential survival signal for SOS-dependent skin tumor development. *Cell* *102*, 211–220.
- Sikander, A., Rana, S.V., and Prasad, K.K. (2009). Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* *403*, 47–55.
- Siu, F., Bain, P.J., LeBlanc-Chaffin, R., Chen, H., and Kilberg, M.S. (2002). ATF4 Is a Mediator of the Nutrient-sensing Response Pathway That Activates the Human Asparagine Synthetase Gene. *J. Biol. Chem.* *277*, 24120–24127.
- Smith, E.R., Zurakowski, D., Saad, A., Scott, R.M., and Moses, M.A. (2008). Urinary biomarkers predict brain tumor presence and response to therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *14*, 2378–2386.

- Souba, W.W., Smith, R.J., and Wilmore, D.W. (1985). Glutamine metabolism by the intestinal tract. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* 9, 608–617.
- Sporn, M.B., and Roberts, A.B. (1985). Autocrine growth factors and cancer. *Nature* 313, 745–747.
- Srdelić Mihalj, S., Kuzmić-Prusac, I., Zekić-Tomaš, S., Šamija-Projić, I., and Čapkun, V. (2015). Lipocalin-2 and matrix metalloproteinase-9 expression in high-grade endometrial cancer and their prognostic value. *Histopathology* 67, 206–215.
- Stehle, G., Sinn, H., Wunder, A., Schrenk, H.H., Stewart, J.C.M., Hartung, G., Maier-Borst, W., and Heene, D.L. (1997). Plasma protein (albumin) catabolism by the tumor itself—implications for tumor metabolism and the genesis of cachexia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 26, 77–100.
- Sun, S., Chen, S., Liu, F., Wu, H., McHugh, J., Bergin, I.L., Gupta, A., Adams, D., and Guan, J.-L. (2015). Constitutive Activation of mTORC1 in Endothelial Cells Leads to the Development and Progression of Lymphangiosarcoma through VEGF Autocrine Signaling. *Cancer Cell* 28, 758–772.
- Sung, H., Choi, J.-Y., Lee, S.-A., Lee, K.-M., Han, S., Jeon, S., Song, M., Lee, Y., Park, S.K., Yoo, K.-Y., et al. (2012). The association between the preoperative serum levels of lipocalin-2 and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and prognosis of breast cancer. *BMC Cancer* 12, 193.
- Swierczynski, J., Hebanowska, A., and Sledzinski, T. (2014). Role of abnormal lipid metabolism in development, progression, diagnosis and therapy of pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.* WJG 20, 2279–2303.
- Tang, X., Keenan, M.M., Wu, J., Lin, C.-A., Dubois, L., Thompson, J.W., Freedland, S.J., Murphy, S.K., and Chi, J.-T. (2015). Comprehensive Profiling of Amino Acid Response Uncovers Unique Methionine-Deprived Response Dependent on Intact Creatine Biosynthesis. *PLoS Genet* 11, e1005158.
- Tardito, S., Oudin, A., Ahmed, S.U., Fack, F., Keunen, O., Zheng, L., Miletic, H., Sakariassen, P.Ø., Weinstock, A., Wagner, A., et al. (2015). Glutamine synthetase activity fuels nucleotide biosynthesis and supports growth of glutamine-restricted glioblastoma. *Nat. Cell Biol.* 17, 1556–1568.
- Terashima, J., Tachikawa, C., Kudo, K., Habano, W., and Ozawa, S. (2013). An aryl hydrocarbon receptor induces VEGF expression through ATF4 under glucose deprivation in HepG2. *BMC Mol. Biol.* 14, 27.
- Teske, B.F., Fusakio, M.E., Zhou, D., Shan, J., McClintick, J.N., Kilberg, M.S., and Wek, R.C. (2013). CHOP induces activating transcription factor 5 (ATF5) to trigger apoptosis in response to perturbations in protein homeostasis. *Mol. Biol. Cell* 24, 2477–2490.
- Thomas, J.D., Zhang, Y.-J., Wei, Y.-H., Cho, J.-H., Morris, L.E., Wang, H.-Y., and Zheng, X.F.S. (2014). Rab1A is an mTORC1 activator and a colorectal oncogene. *Cancer Cell* 26, 754–769.

- Thwaites, D.T., and Anderson, C.M.H. (2007). H⁺-coupled nutrient, micronutrient and drug transporters in the mammalian small intestine. *Exp. Physiol.* 92, 603–619.
- Tiong, K.H., Tan, B.S., Choo, H.L., Chung, F.F.-L., Hii, L.-W., Tan, S.H., Khor, N.T.W., Wong, S.F., See, S.-J., Tan, Y.-F., et al. (2016). Fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) and fibroblast growth factor 19 (FGF19) autocrine enhance breast cancer cells survival. *Oncotarget*.
- Toyoda, M., Kaira, K., Ohshima, Y., Ishioka, N.S., Shino, M., Sakakura, K., Takayasu, Y., Takahashi, K., Tominaga, H., Oriuchi, N., et al. (2014). Prognostic significance of amino-acid transporter expression (LAT1, ASCT2, and xCT) in surgically resected tongue cancer. *Br. J. Cancer* 110, 2506–2513.
- Tsun, Z.-Y., Bar-Peled, L., Chantranupong, L., Zoncu, R., Wang, T., Kim, C., Spooner, E., and Sabatini, D.M. (2013). The Folliculin tumor suppressor is a GAP for RagC/D GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Mol. Cell* 52.
- Tung, M.-C., Hsieh, S.-C., Yang, S.-F., Cheng, C.-W., Tsai, R.-T., Wang, S.-C., Huang, M.-H., and Hsieh, Y.-H. (2013). Knockdown of lipocalin-2 suppresses the growth and invasion of prostate cancer cells. *The Prostate* 73, 1281–1290.
- Van den Akker, N.M.S., Winkel, L.C.J., Nisancioglu, M.H., Maas, S., Wisse, L.J., Armulik, A., Poelmann, R.E., Lie-Venema, H., Betsholtz, C., and Gittenberger-de Groot, A.C. (2008). PDGF-B signaling is important for murine cardiac development: its role in developing atrioventricular valves, coronaries, and cardiac innervation. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 237, 494–503.
- Vattem, K.M., and Wek, R.C. (2004). Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 11269–11274.
- Veltman, D.M., Lemieux, M.G., Knecht, D.A., and Insall, R.H. (2014). PIP3-dependent macropinocytosis is incompatible with chemotaxis. *J. Cell Biol.* 204, 497–505.
- Viennois, E., Ingersoll, S.A., Ayyadurai, S., Zhao, Y., Wang, L., Zhang, M., Han, M.K., Garg, P., Xiao, B., and Merlin, D. (2016). Critical role of PepT1 in promoting colitis-associated cancer and therapeutic benefits of the anti-inflammatory PepT1-mediated tripeptide KPV in a murine model. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2, 340–357.
- Voskoboinik, I., Whisstock, J.C., and Trapani, J.A. (2015). Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 388–400.
- Wang, D., Tan, Y., Kreitzer, G.E., Nakai, Y., Shan, D., Zheng, Y., and Huang, X.-Y. (2006). G Proteins G12 and G13 Control the Dynamic Turnover of Growth Factor-induced Dorsal Ruffles. *J. Biol. Chem.* 281, 32660–32667.
- Wang, J.T.H., Teasdale, R.D., and Liebl, D. (2014a). Macropinosome quantitation assay. *MethodsX* 1, 36–41.
- Wang, L., Wang, X., and Proud, C.G. (2000). Activation of mRNA translation in rat cardiac myocytes by insulin involves multiple rapamycin-sensitive steps. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 278, H1056–H1068.

- Wang, M., Wey, S., Zhang, Y., Ye, R., and Lee, A.S. (2009a). Role of the Unfolded Protein Response Regulator GRP78/BiP in Development, Cancer, and Neurological Disorders. *Antioxid. Redox Signal.* *11*, 2307–2316.
- Wang, Q., Mora-Jensen, H., Weniger, M.A., Perez-Galan, P., Wolford, C., Hai, T., Ron, D., Chen, W., Trenkle, W., Wiestner, A., et al. (2009b). ERAD inhibitors integrate ER stress with an epigenetic mechanism to activate BH3-only protein NOXA in cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 2200–2205.
- Wang, Q., Beaumont, K.A., Otte, N.J., Font, J., Bailey, C.G., van Geldermalsen, M., Sharp, D.M., Tiffen, J.C., Ryan, R.M., Jormakka, M., et al. (2014b). Targeting glutamine transport to suppress melanoma cell growth. *Int. J. Cancer* *135*, 1060–1071.
- Wang, Q., Hardie, R., Hoy, A.J., van Geldermalsen, M., Gao, D., Fazli, L., Sadowski, M.C., Balaban, S., Schreuder, M., Nagarajah, R., et al. (2015a). Targeting ASCT2-mediated glutamine uptake blocks prostate cancer growth and tumour development. *J. Pathol.* *236*, 278–289.
- Wang, X., Li, W., Williams, M., Terada, N., Alessi, D.R., and Proud, C.G. (2001). Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *EMBO J.* *20*, 4370–4379.
- Wang, Y., Alam, G.N., Ning, Y., Visioli, F., Dong, Z., Nör, J.E., and Polverini, P.J. (2012). The unfolded protein response induces the angiogenic switch in human tumor cells through the PERK/ATF4 pathway. *Cancer Res.* *72*, 5396–5406.
- Wang, Y., Ning, Y., Alam, G.N., Jankowski, B.M., Dong, Z., Nor, J.E., and Polverini, P.J. (2013). Amino Acid Deprivation Promotes Tumor Angiogenesis through the GCN2/ATF4 Pathway. *Neoplasia N. Y. N* *15*, 989–997.
- Wang, Y.-W., Zhang, S.-D., Xue, W.-J., Zhu, M.-L., and Zheng, L.-Z. (2015b). SHMT1 C1420T polymorphism contributes to the risk of non-Hodgkin lymphoma: evidence from 7309 patients. *Chin. J. Cancer* *34*, 573–582.
- Watanabe, M., Maemura, K., Kanbara, K., Tamayama, T., and Hayasaki, H. (2002). GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int. Rev. Cytol.* *213*, 1–47.
- Wei, Z., Huang, Y., Xie, N., and Ma, Q. (2015). Elevated expression of secreted autocrine growth factor progranulin increases cervical cancer growth. *Cell Biochem. Biophys.* *71*, 189–193.
- Weng, S., Zhou, L., Deng, Q., Wang, J., Yu, Y., Zhu, J., and Yuan, Y. (2016). Niclosamide induced cell apoptosis via upregulation of ATF3 and activation of PERK in Hepatocellular carcinoma cells. *BMC Gastroenterol.* *16*, 25.
- Wise, D.R., and Thompson, C.B. (2010). Glutamine Addiction: A New Therapeutic Target in Cancer. *Trends Biochem. Sci.* *35*, 427–433.
- Wolfson, R.L., Chantranupong, L., Saxton, R.A., Shen, K., Scaria, S.M., Cantor, J.R., and Sabatini, D.M. (2016). Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway. *Science* *351*, 43–48.

- Woo, C.C., Chen, W.C., Teo, X.Q., Radda, G.K., and Hock Lee, P.T. (2014). Downregulating serine hydroxymethyltransferase 2 (SHMT2) suppresses tumorigenesis in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*.
- Wu, G., Meininger, C.J., Knabe, D.A., Bazer, F.W., and Rhoads, J.M. (2000). Arginine nutrition in development, health and disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 3, 59–66.
- Wu, H., Ding, Z., Hu, D., Sun, F., Dai, C., Xie, J., and Hu, X. (2012). Central role of lactic acidosis in cancer cell resistance to glucose deprivation-induced cell death. *J. Pathol.* 227, 189–199.
- Xie, Y., Kang, R., Sun, X., Zhong, M., Huang, J., Klionsky, D.J., and Tang, D. (2014). Posttranslational modification of autophagy-related proteins in macroautophagy. *Autophagy* 11, 28–45.
- Xu, X., Li, J., Sun, X., Guo, Y., Chu, D., Wei, L., Li, X., Yang, G., Liu, X., Yao, L., et al. (2015). Tumor suppressor NDRG2 inhibits glycolysis and glutaminolysis in colorectal cancer cells by repressing c-Myc expression. *Oncotarget* 6, 26161–26176.
- Yadav, R.B., Burgos, P., Parker, A.W., Iadevaia, V., Proud, C.G., Allen, R.A., O’Connell, J.P., Jeshtadi, A., Stubbs, C.D., and Botchway, S.W. (2013). mTOR direct interactions with Rheb-GTPase and raptor: sub-cellular localization using fluorescence lifetime imaging. *BMC Cell Biol.* 14, 3.
- Yanagida, O., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Segawa, H., Nii, T., Cha, S.H., Matsuo, H., Fukushima, J., Fukasawa, Y., et al. (2001). Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1514, 291–302.
- Yang, J., Goetz, D., Li, J.Y., Wang, W., Mori, K., Setlik, D., Du, T., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Strong, R., et al. (2002). An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol. Cell* 10, 1045–1056.
- Yang, J., Bielenberg, D.R., Rodig, S.J., Doiron, R., Clifton, M.C., Kung, A.L., Strong, R.K., Zurakowski, D., and Moses, M.A. (2009). Lipocalin 2 promotes breast cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 3913–3918.
- Yang, J., McNeish, B., Butterfield, C., and Moses, M.A. (2013). Lipocalin 2 is a novel regulator of angiogenesis in human breast cancer. *FASEB J.* 27, 45–50.
- Yang, X., Wang, D., Dong, W., Song, Z., and Dou, K. (2011). Expression and modulation of Na⁺/H⁺ exchanger 1 gene in hepatocellular carcinoma: A potential therapeutic target. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26, 364–370.
- Yasuda, H. (2008). Solid tumor physiology and hypoxia-induced chemo/radio-resistance: Novel strategy for cancer therapy: Nitric oxide donor as a therapeutic enhancer. *Nitric Oxide* 19, 205–216.
- Ye, J., Kumanova, M., Hart, L.S., Sloane, K., Zhang, H., Panis, D.N.D., Bobrovnikova-Marjon, E., Diehl, J.A., Ron, D., and Koumenis, C. (2010). The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *EMBO J.* 29, 2082–2096.

- Ye, J., Mancuso, A., Tong, X., Ward, P.S., Fan, J., Rabinowitz, J.D., and Thompson, C.B. (2012). Pyruvate kinase M2 promotes de novo serine synthesis to sustain mTORC1 activity and cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 6904–6909.
- Ye, J., Palm, W., Peng, M., King, B., Lindsten, T., Li, M.O., Koumenis, C., and Thompson, C.B. (2015). GCN2 sustains mTORC1 suppression upon amino acid deprivation by inducing Sestrin2. *Genes Dev.* *29*, 2331–2336.
- Young, S.K., and Wek, R.C. (2016). Upstream open reading frames differentially regulate gene-specific translation in the Integrated Stress Response. *J. Biol. Chem.* jbc.R116.733899.
- Young, R.M., Ackerman, D., Quinn, Z.L., Mancuso, A., Gruber, M., Liu, L., Giannoukos, D.N., Bobrovnikova-Marjon, E., Diehl, J.A., Keith, B., et al. (2013). Dysregulated mTORC1 renders cells critically dependent on desaturated lipids for survival under tumor-like stress. *Genes Dev.* *27*, 1115–1131.
- Yu, Q., Wang, X., Wang, L., Zheng, J., Wang, J., and Wang, B. (2016). Knockdown of asparagine synthetase (ASNS) suppresses cell proliferation and inhibits tumor growth in gastric cancer cells. *Scand. J. Gastroenterol.* *51*, 1220–1226.
- Yu, V.W.C., Ambartsoumian, G., Verlinden, L., Moir, J.M., Prud'homme, J., Gauthier, C., Roughley, P.J., and St-Arnaud, R. (2005). FIAT represses ATF4-mediated transcription to regulate bone mass in transgenic mice. *J. Cell Biol.* *169*, 591–601.
- Yumoto, R., Nishikawa, H., Okamoto, M., Katayama, H., Nagai, J., and Takano, M. (2006). Clathrin-mediated endocytosis of FITC-albumin in alveolar type II epithelial cell line RLE-6TN. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* *290*, L946–L955.
- Yun, J., Rago, C., Cheong, I., Pagliarini, R., Angenendt, P., Rajagopalan, H., Schmidt, K., Wilson, J.K.V., Markowitz, S., Zhou, S., et al. (2009). Glucose Deprivation Contributes to the Development of KRAS Pathway Mutations in Tumor Cells. *Science* *325*, 1555.
- Zaman, S., Wang, R., and Gandhi, V. (2014). Targeting the Apoptosis Pathway in Hematologic Malignancies. *Leuk. Lymphoma* *55*, 1980–1992.
- Zhang, J., Fan, J., Venneti, S., Cross, J.R., Takagi, T., Bhinder, B., Djaballah, H., Kanai, M., Cheng, E.H., Judkins, A.R., et al. (2014). Asparagine Plays a Critical Role in Regulating Cellular Adaptation to Glutamine Depletion. *Mol. Cell* *56*, 205–218.
- Zhao, E., Ding, J., Xia, Y., Liu, M., Ye, B., Choi, J.-H., Yan, C., Dong, Z., Huang, S., Zha, Y., et al. (2016). KDM4C and ATF4 Cooperate in Transcriptional Control of Amino Acid Metabolism. *Cell Rep.* *14*, 506–519.
- Zhdanov, A.V., Waters, A.H.C., Golubeva, A.V., Dmitriev, R.I., and Papkovsky, D.B. (2014). Availability of the key metabolic substrates dictates the respiratory response of cancer cells to the mitochondrial uncoupling. *Biochim. Biophys. Acta* *1837*, 51–62.
- Zoncu, R., Bar-Peled, L., Efeyan, A., Wang, S., Sancak, Y., and Sabatini, D.M. (2011). mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the Vacuolar H⁺-ATPase. *Science* *334*, 678–683.

Zwartkruis, F.J.T., and Burgering, B.M.T. (2013). Ras and macropinocytosis: trick and treat. *Cell Res.* 23, 982–983.

Annexes

Publication non présentée

Cédric Chaveroux,^{1,2} Valérie Carraro,^{1,2} Laurence Canaple,³ Julien Averous,^{1,2} Anne-Catherine Maurin,^{1,2} Céline Jousse,^{1,2} Yuki Muranishi,^{1,2} Laurent Parry,^{1,2} **Florent Mesclon**,^{1,2} Evelina Gatti,^{4,5,6,7} Jacques Mallet,⁸ Philippe Ravassard,⁸ Philippe Pierre,^{4,5,6,7} Pierre Fafournoux,^{1,2*} Alain Bruhat^{1,2*}

“In vivo imaging of the spatiotemporal activity of the eIF2a-ATF4 signaling pathway: Insights into stress and related disorders”

Science Signaling 28 April 2015 Vol 8 Issue 374 rs5

STRESS SIGNALING

In vivo imaging of the spatiotemporal activity of the eIF2 α -ATF4 signaling pathway: Insights into stress and related disorders

Cédric Chaveroux,^{1,2} Valérie Carraro,^{1,2} Laurence Canaple,³ Julien Averous,^{1,2} Anne-Catherine Maurin,^{1,2} Céline Jousse,^{1,2} Yuki Muranishi,^{1,2} Laurent Parry,^{1,2} Florent Mesclon,^{1,2} Evelina Gatti,^{4,5,6,7} Jacques Mallet,⁸ Philippe Ravassard,⁸ Philippe Pierre,^{4,5,6,7} Pierre Fafournoux,^{1,2*} Alain Bruhat^{1,2*}

The eIF2 α -ATF4 pathway is involved in cellular adaptation to stress and is dysregulated in numerous diseases. Activation of this pathway leads to phosphorylation of the α subunit of eukaryotic initiation factor 2 (eIF2 α) and the recruitment of the transcription factor ATF4 (activating transcription factor 4) to specific CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)-ATF response elements (CAREs) located in the promoters of target genes. To monitor the spatiotemporal modulation of this pathway in living animals, we generated a novel CARE-driven luciferase mouse model (CARE-LUC). These transgenic mice enable the investigation of the eIF2 α -ATF4 pathway activity in the whole organism and at the tissue and cellular levels by combining imaging, luciferase assays, and immunochemistry. Using this mouse line, we showed the tissue-specific activation pattern of this pathway in response to amino acid deficiency or endoplasmic reticulum stress and the hepatic induction of this pathway in a stress-related pathology model of liver fibrosis. The CARE-LUC mouse model represents an innovative tool to investigate the eIF2 α -ATF4 axis and to develop drugs targeting this important pathway in the remediation of related pathologies.

INTRODUCTION

Phosphorylation of eIF2 α (eukaryotic initiation factor 2 α) on Ser⁵¹ by eIF2 α kinases—GCN2 (general control nonderepressible 2), PERK [protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum (ER) kinase], PKR (protein kinase RNA-activated), or HRI (heme-regulated inhibitor kinase)—is a conserved regulatory event that occurs in response to diverse cellular stresses (*1*). When eIF2 α is phosphorylated at this site, most de novo protein synthesis is greatly inhibited, and this response is an important strategy in the cell's defense against multiple stressful insults, including viral infection, ER stress, and nutrient starvation. Accompanying this global translational control, eIF2 α phosphorylation selectively enhances the translation of a master regulator of gene expression, ATF4 (activating transcription factor 4) (*2, 3*). Once produced, this transcription factor increases transcription by binding to C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein)-ATF response element (CARE) sequences of a subset of specific target genes involved in metabolism, nutrient uptake, control of redox status, and regulation of apoptosis and autophagy (*4–8*). Because ATF4 is a common downstream target that integrates signaling from multiple eIF2 α kinases, this pathway is referred to as the eIF2 α -ATF4 pathway or the ISR (integrated stress response) (*4, 9*). The ISR is involved in a number of human stress-related

pathologies, including cancer and metabolic and neurodegenerative disorders (*10–12*).

Research has enhanced knowledge of the effects of the eIF2 α -ATF4 pathway in various cellular processes. However, because of the lack of a suitable in vivo model for studying this pathway at the level of the whole organism, there are important gaps in understanding the role of the eIF2 α -ATF4 axis in mammalian physiology and pathologies. Thus, we present the generation of an ATF4-inducible luciferase mouse model to visualize the real-time induction of the eIF2 α -ATF4 pathway in target tissues. We generated these mice by genomic integration of a transgene containing CARE sequences that drive expression of luciferase, and thus named this the CARE-LUC transgene. The use of bioluminescent luciferase as reporter system enables (i) temporal and tissue-specific quantitative analysis of the induction of the eIF2 α -ATF4 pathway in living animals subjected to physiological or pathological situations, (ii) quantitative analysis of the enzymatic activity in tissue homogenates, and (iii) localization of the induction at tissue and cellular levels by immunohistochemistry. Using this transgenic mouse model, we showed that the modulation of the eIF2 α -ATF4 pathway occurred in a tissue-specific manner in response to different stresses that stimulate the eIF2 α kinases PERK and GCN2. In addition, we validated the relevance of this model to study stress-related pathologies by showing the correlation between hepatic activation of the eIF2 α -ATF4 pathway and the occurrence of stress-induced liver fibrosis.

RESULTS

Generation and cellular validation of a CARE-regulated reporter construct for monitoring the eIF2 α -ATF4 pathway activity

The eIF2 α -ATF4 pathway is recognized for integrating signals from different stresses that result in the increased expression of specific CARE-regulated genes (*11*). Here, we focused on two of the kinases that phosphorylate

¹Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UMR 1019 Nutrition Humaine, Centre de Clermont-Ferrand-Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France. ²Université Clermont 1, UFR Médecine, UMR 1019 Nutrition Humaine, 63000 Clermont-Ferrand, France. ³Institut de Génétique Fonctionnelle de Lyon, IGFL UMR 5242 CNRS, ENS Lyon, INRA 1288, UCBL, 69364 Lyon, France. ⁴Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Aix-Marseille Université, U2M, 13288 Marseille, France. ⁵INSERM, U1104, 13288 Marseille, France. ⁶CNRS, UMR 7280, 13288 Marseille, France. ⁷Institute for Research in Biomedicine (IBIMED) and Aveiro Health Sciences Program University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal. ⁸Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière, Biotechnology and Biotherapy Team, Hôpital Pitié Salpêtrière, 47 Bd. De l'Hôpital, 75013 Paris, France. *Corresponding author. E-mail: alain.bruhat@clermont.inra.fr (A.B.); pierre.fafournoux@clermont.inra.fr (P.F.).

RESEARCH RESOURCE

eIF2 α : GCN2 and PERK. To selectively induce the activity of these kinases (that is, an increase in the abundance of their active phosphorylated forms), we induced GCN2 activity by essential amino acid (EAA) starvation or exposure to halofuginone, a pharmacological agent that mimics proline deprivation, and we induced PERK with tunicamycin, a compound that triggers ER stress (Fig. 1A). Protein analysis in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) confirmed that these stressors selectively activated GCN2 or PERK, increasing the phosphorylation of eIF2 α and the abundance of ATF4 (Fig. 1B). These stressors increased the abundance of mRNAs for ATF4-dependent genes, including *Trb3* (encoding tribbles pseudokinase 3) and *Asns* (encoding asparagine synthetase), containing CARE or ATF sites in their promoters (Fig. 1C and fig. S1, A and B).

To monitor the induction of the eIF2 α -ATF4 pathway, we initially developed and optimized an ATF4-inducible reporter construct in cell culture. We cloned one or two copies of the CARE sequence from the *Trb3* promoter upstream of a minimum thymidine kinase (TK) promoter driving the transcription of the firefly luciferase reporter gene (Fig. 1D). Transient transfections of these constructs in MEFs showed that the stress-induced luciferase activity was more strongly enhanced by the presence of two copies of the *Trb3* CARE sequence. The transcriptional activity from the *Trb3* CARE increased in a dose-dependent manner by decreasing concentrations of one EAA (leucine) (fig. S2A) or in response to tunicamycin (fig. S2B) or halofuginone (fig. S2C) treatment. Leucine concentrations in the medium at or below 30 μ M were sufficient to strongly induce luciferase activity (fig. S2A). In vivo, this range of leucine concentrations in the blood can occur after consumption of a diet devoid of the corresponding EAA and is sufficient to induce the GCN2-eIF2 α -ATF4 pathway (13, 14).

To confirm the role of GCN2, PERK, and ATF4 in the CARE-dependent transcription, MEFs deficient in GCN2, PERK, or ATF4 and their wild-type counterparts were transfected with the 2XCARE-TRB3-LUC construct (Fig. 1E). Lack of ATF4 resulted in a complete loss of luciferase induction in response to leucine deprivation or halofuginone or tunicamycin exposure, whereas the absence of GCN2 only abolished the luciferase induction in response to halofuginone exposure and leucine starvation. Conversely, the absence of PERK abrogated the induction of the 2XCARE-TRB3-LUC transgene by tunicamycin but did not affect the induction of luciferase activity by stimuli that activate GCN2. We also cloned the 2XCARE-TRB3-LUC construct into a lentiviral expression vector and validated the maintenance of its inducibility by an active eIF2 α -ATF4 pathway when stably integrated in the MEF genome (Fig. 2A and fig. S3, A and B). The transient and stable transfection data demonstrated the functionality of the 2XCARE-TRB3-LUC construct as a molecular tool for monitoring the activity of the eIF2 α -ATF4 pathway.

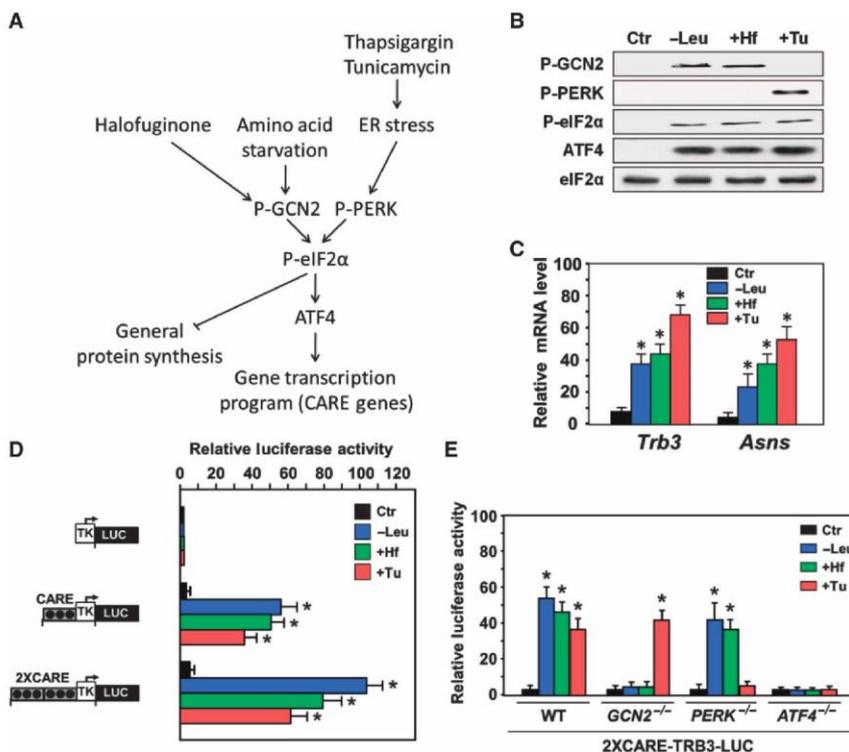
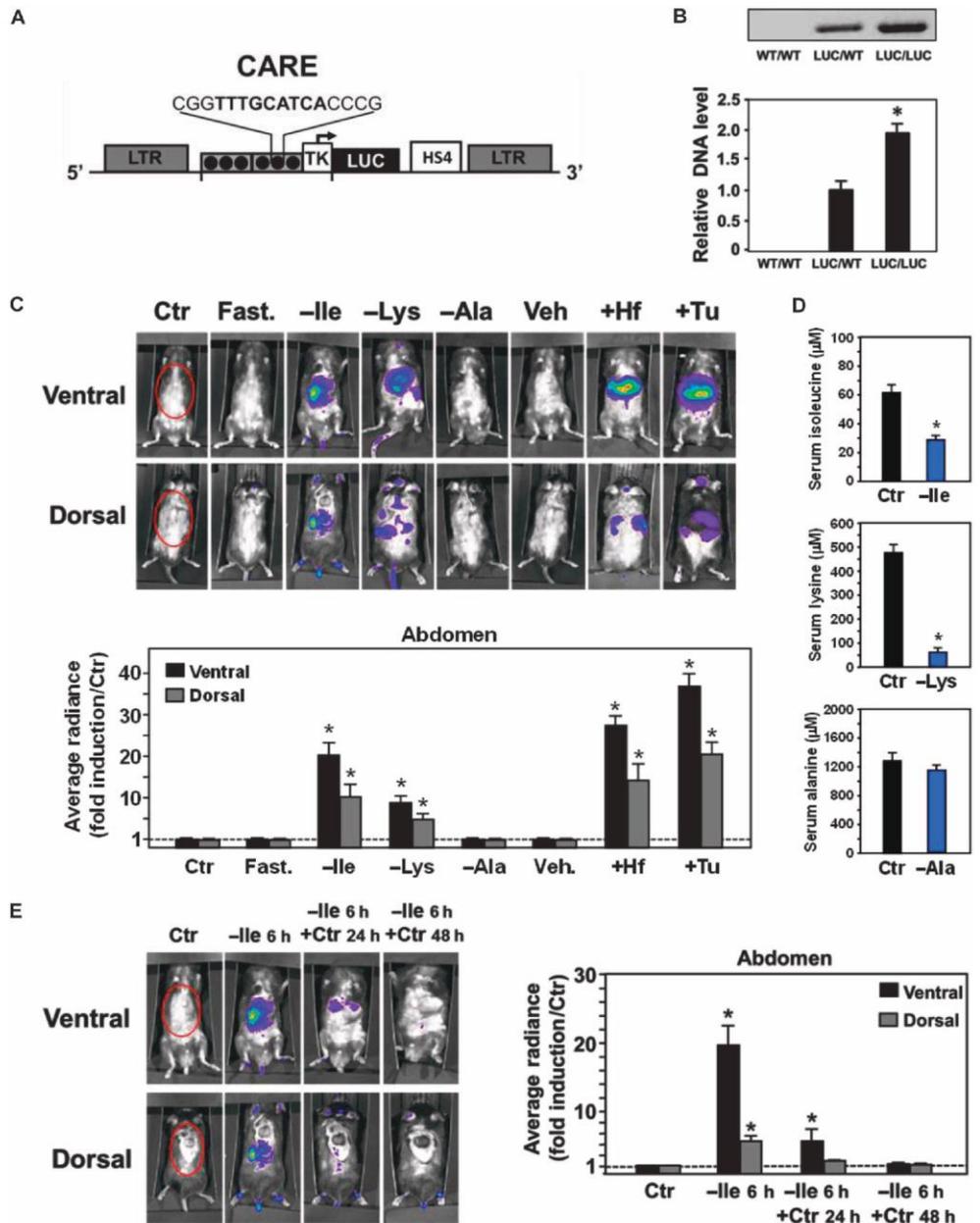


Fig. 1. Development and validation of the 2XCARE-TRB3-LUC reporter construct in response to GCN2 and PERK inducers. (A) Scheme of the eIF2 α -ATF4 pathway. We used tunicamycin or thapsigargin to induce ER stress and activate PERK. We used halofuginone or starvation of EAAs to activate GCN2. (B) Immunoblot analysis of phosphorylation (P-) of GCN2, PERK, and eIF2 α and the abundance of ATF4 and eIF2 α from MEFs incubated for 4 hours either in control (Ctr) or leucine-free medium (-Leu) or in medium containing halofuginone (20 nM, +Hf) or tunicamycin (4 μ g/ml, +Tu). (C) Abundance of *Trb3* and *Asns* mRNA from MEFs incubated for 4 hours in the indicated medium. (D) MEFs were transiently transfected with the indicated LUC constructs containing one or two copies of the *Trb3* CARE sequences (-7131/-7033) inserted 5' to the *TK* promoter. Twenty-four hours after transfection, cells were incubated for 16 hours in the indicated medium and assayed for luciferase activity. (E) Effect of lack of *GCN2*, *PERK*, and *ATF4* on the induction of CARE-LUC by amino acid starvation or ER stress. Wild-type (WT), *GCN2*^{-/-}, *PERK*^{-/-}, and *ATF4*^{-/-} MEFs were transiently transfected with the 2XCARE-TRB3-LUC construct and analyzed as described in (D). For (C) to (E), the graphs show means \pm SEM of three independent experiments. **P* \leq 0.05 relative to the Ctr value for (C) and (D) and to the Ctr value of each genotype for (E) (two-sided *t* test).

Visualization of the eIF2 α -ATF4 pathway induction by GCN2 and PERK inducers in living mice

We next generated a transgenic reporter mouse model to visualize the activity of the eIF2 α -ATF4 pathway in vivo. We microinjected concentrated lentiviral 2XCARE-TRB3-LUC vector preparations into the perivitelline space of C57Bl/6J fertilized oocytes and reimplanted the oocytes in pseudopregnant mice. We initially screened founders by amplifying a fragment of the lentiviral vector by polymerase chain reaction (PCR) to detect the insertion of the

Fig. 2. Visualization of the bioluminescence stimulated by GCN2 and PERK inducers in CARE-LUC mice. (A) Map of the 2XCARE-TRB3-LUC lentiviral vector including two copies of the *Trb3* CARE sequences (black circles) inserted 5' to the minimum TK promoter (−30 to +20) and the luciferase (LUC) coding sequence. The minimum CARE sequence is represented with the core in bold letters. LTR, long-terminal repeat. (B) Genotyping of heterozygous (LUC/WT) and homozygous (LUC/LUC) CARE-LUC transgenic mice by PCR (upper) and qPCR (lower) from mouse tail DNA. The graphs show means ± SEM of three independent experiments. **P* ≤ 0.05 relative to the LUC/WT value (two-sided *t* test). (C) In vivo imaging of homozygous CARE-LUC mice exposed to different GCN2 or PERK inducers. Homozygous CARE-LUC mice were fed a diet deficient in isoleucine (−Ile), lysine (−Lys), or alanine (−Ala) after an overnight fasting (Fast.) or injected with halofuginone (+Hf) or tunicamycin (+Tu). Ventral and dorsal views of representative mice are depicted. Photon emission was quantified 6 hours after treatment using regions of interest (ROIs) from the abdominal area (red circles). Signal intensity as a result of photon detection is graded from red (highest number of photons) to blue (lowest intensity). (D) Plasma amino acid concentrations of CARE-LUC mice fed for 6 hours a control diet (Ctr) or a diet without isoleucine (−Ile), lysine (−Lys), or alanine (−Ala). The graphs show means ± SEM of six mice. **P* ≤ 0.05 relative to the Ctr value (two-sided Student's *t* test). (E) Reversibility of the bioluminescence induction in the abdomen following



the consumption of an isoleucine-deficient diet. CARE-LUC mice were fed an isoleucine-deficient diet (−Ile) for 6 hours and then a control diet (Ctr) for 24 to 48 hours. Ventral and dorsal views of representative mice are depicted. Photon emission was quantified using ROIs from the abdominal area (red circles). For bioluminescence analyses (C and D), the graphs show means ± SEM of six mice. **P* ≤ 0.05 relative to the Ctr value (two-sided *t* test).

RESEARCH RESOURCE

lentiviral vector into the mouse genome and then determined the number of copies of the transgene in the genome by a quantitative PCR (qPCR) approach. After several steps of screening and breeding of founders carrying one copy of the transgene, we obtained a mouse strain, which we named CARE-LUC. We generated homozygous transgenic mice for the following quantitative studies to minimize genotypic variability (Fig. 2B).

To establish the stress responsiveness of the reporter construct *in vivo*, we subjected CARE-LUC mice to the different stressors that activate either GCN2 or PERK. To stimulate GCN2, we fed mice a diet lacking the EAA lysine after an overnight fasting period; the control group ate a control diet providing all of the amino acids. Kinetic analysis revealed that induction of bioluminescence reached a maximum after 6 to 12 hours (fig. S4, A and B). Therefore, all of the following measurements of bioluminescence were acquired 6 hours after inducer administration.

To trigger a GCN2-dependent activation of the CARE-LUC transgene, we used two specific inducers for this kinase—nutritional EAA starvation and halofuginone injection (Fig. 2C). Consumption of a diet devoid of one EAA (isoleucine or lysine) significantly reduced the respective EAA concentrations in the blood, and this reduction correlated with a significant increase of bioluminescence in the abdominal cavity (Fig. 2, C and D). As expected, the CARE-LUC mice did not display induction of bioluminescence after consumption of a diet lacking the nonessential amino acid alanine, which did not cause any significant change in the concentration of alanine in the serum blood (Fig. 2, C and D). In accordance with the nutrition experiments, pharmacological induction of GCN2 with halofuginone also promoted a robust increase in bioluminescence (Fig. 2C). Furthermore, because the activated GCN2 pathway can be turned off by the ingestion of a diet supplying all the EAA (14), we used this nutritional model to test the kinetics of the reversibility of the CARE-dependent transcription *in vivo*. In mice fed a diet devoid of isoleucine for 6 hours, the induced bioluminescence signal was strongly reduced within 24 hours after consumption of a control diet and completely abolished by 48 hours (Fig. 2E). Tunicamycin injection to activate PERK elicited stronger bioluminescence induction after 6 hours than those visualized 6 hours after the consumption of an EAA-starved diet or halofuginone administration (Fig. 2C).

We sought to confirm that the molecular mechanisms governing luciferase expression in the CARE-LUC mice require activation of the eIF2 α -ATF4 pathway. The high bioluminescence signal in the abdominal cavity in response to the different stressors and previous data showing that the eIF2 α -ATF4 pathway is functional in hepatocytes led us to focus on the liver (14, 15). Western blot analysis confirmed that this pathway was increased in the liver in response to GCN2 or PERK inducers that also stimulated CARE-dependent gene expression (Fig. 3, A and B). Luciferase mRNA analysis revealed that the transgene expression was induced similarly to that of *Trb3*

and *Asns* (Fig. 3C). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments showed an increase in ATF4 recruitment to the CARE sequences of the transgene (Fig. 3D, left panel) and to the CARE sequence in *Trb3* (Fig. 3D, right panel). Collectively, these results showed that the activation of the eIF2 α -ATF4 pathway by stimuli that activate GCN2 and PERK involves the same molecular factors as those we described in the MEFs. Consequently, we concluded that visualization of bioluminescence in CARE-LUC mice reflects the molecular events that occur during the activation of the eIF2 α -ATF4 pathway.

Profiling the eIF2 α -ATF4 pathway induction pattern at the tissue and cellular levels

Despite the central role of the eIF2 α -ATF4 pathway in controlling major cellular processes, the different tissues and cell types in which activation of this pathway can occur remain poorly described. To identify the tissues in which the eIF2 α -ATF4 pathway becomes activated in response to stimuli that activate GCN2 or PERK, we performed three-dimensional (3D) bioluminescence imaging on CARE-LUC mice. Luciferase-dependent bioluminescence measurements after consumption of an EAA-deficient diet or injection with halofuginone or tunicamycin suggested that the eIF2 α -ATF4 pathway was activated in several organs (Fig. 4A). However, we observed differences in the intensity of the response and in the organs depending on whether GCN2 or PERK was the activating kinase.

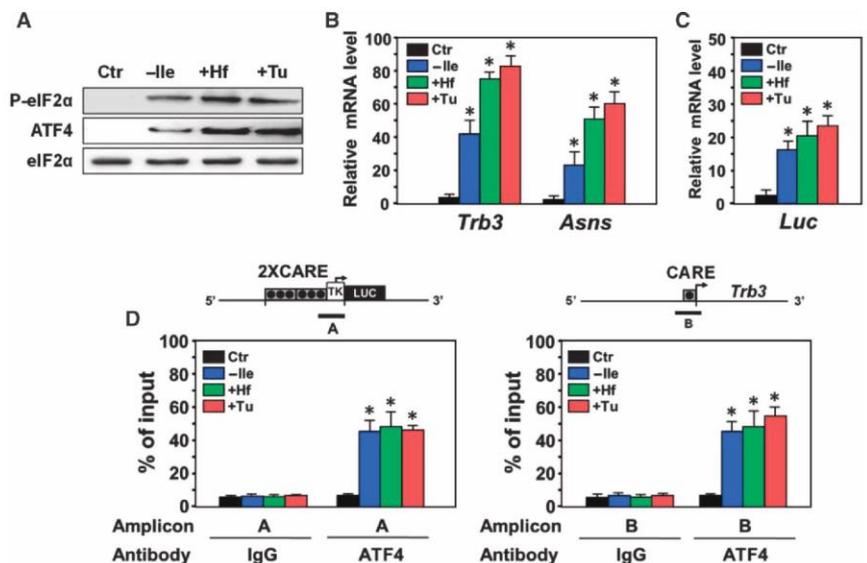


Fig. 3. Molecular mechanisms controlling the CARE-LUC transgene in the liver. CARE-LUC mice were fed a control (Ctr) or an isoleucine-deficient diet (–Ile) after an overnight fasting or were injected halofuginone (+Hf) or tunicamycin (+Tu). Tunicamycin and halofuginone were resuspended in PBS, and the same amount of PBS was injected in Ctr and –Ile mice. After 6 hours, the livers were collected for the following analyses. (A) Immunoblot analysis of phosphorylation of eIF2 α and the abundance of ATF4 and eIF2 α from the CARE-LUC mice subjected to the indicated treatments. (B) Effect of the indicated treatment on the hepatic mRNA of *Trb3* and *Asns*. (C) Effect of the indicated treatment on the hepatic *Luc* mRNA expression. (D) ATF4 recruitment to the CARE-LUC transgene in the liver of mice subjected to the indicated treatments. ATF4 binding to CARE-LUC or *Trb3* CARE was assessed in liver extracts by ChIP assays. Data were plotted as the percentage of antibody binding versus the amount of PCR product obtained using a standardized aliquot of input chromatin (% of input). The graphs in (B) to (D) show means \pm SEM of three independent experiments. * $P \leq 0.05$ relative to the Ctr mice value (two-sided *t* test).

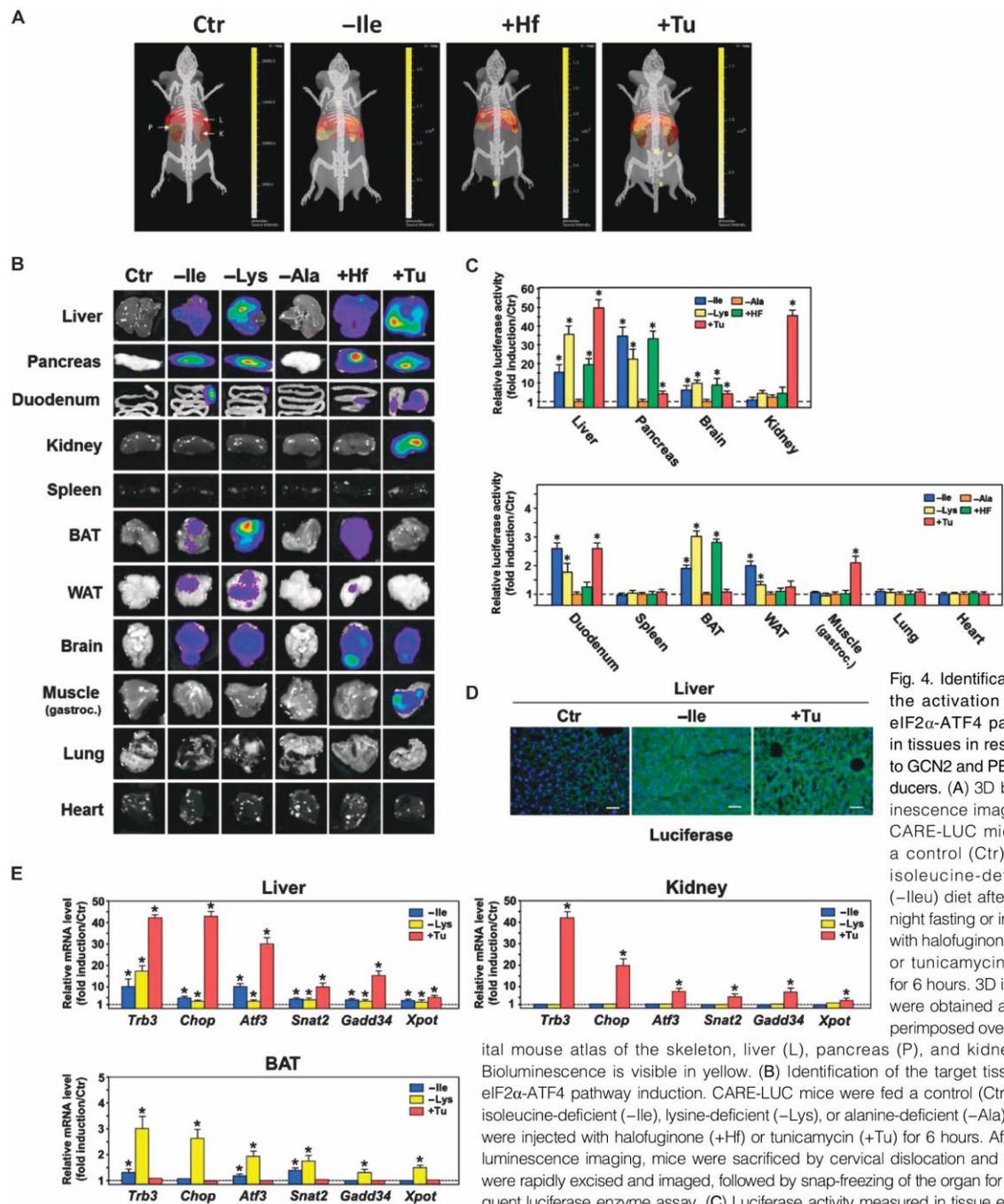


Fig. 4. Identification of the activation of the eIF2 α -ATF4 pathway in tissues in response to GCN2 and PERK inducers. (A) 3D bioluminescence imaging of CARE-LUC mice fed a control (Ctr) or an isoleucine-deficient (-Ile) diet after overnight fasting or injected with halofuginone (+Hf) or tunicamycin (+Tu) for 6 hours. 3D images were obtained and superimposed over a digital mouse atlas of the skeleton, liver (L), pancreas (P), and kidney (K). Bioluminescence is visible in yellow. (B) Identification of the target tissues of eIF2 α -ATF4 pathway induction. CARE-LUC mice were fed a control (Ctr) or an isoleucine-deficient (-Ile), lysine-deficient (-Lys), or alanine-deficient (-Ala) diet or were injected with halofuginone (+Hf) or tunicamycin (+Tu) for 6 hours. After bioluminescence imaging, mice were sacrificed by cervical dislocation and organs were rapidly excised and imaged, followed by snap-freezing of the organ for subsequent luciferase enzyme assay. (C) Luciferase activity measured in tissue extracts. (D) Immunohistochemical localization of luciferase (green) in livers from CARE-LUC mice fed a control (Ctr) or an isoleucine-deficient (-Ile) diet or injected with tunicamycin (+Tu) for 6 hours. Nuclei are stained in blue. Scale bars, 50 μ m. (E) Expression of a set of ATF4-dependent genes in liver, kidney, and BAT in response to GCN2 and PERK inducers. Total RNA extracted from liver, kidney, and BAT was analyzed by reverse transcription qPCR (RT-qPCR). The graphs show means \pm SEM of three independent experiments. * P \leq 0.05 relative to the Ctr value (two-sided t test).

Results are given as fold induction relative to the control condition. The graphs show means \pm SEM of six mice for each condition. * P \leq 0.05 relative to the Ctr mice value (equal 1, not represented) (two-sided t test). (D) Immunohistochemical localization of luciferase (green) in livers from CARE-LUC mice fed a control (Ctr) or an isoleucine-deficient (-Ile) diet or injected with tunicamycin (+Tu) for 6 hours. Nuclei are stained in blue. Scale bars, 50 μ m. (E) Expression of a set of ATF4-dependent genes in liver, kidney, and BAT in response to GCN2 and PERK inducers. Total RNA extracted from liver, kidney, and BAT was analyzed by reverse transcription qPCR (RT-qPCR). The graphs show means \pm SEM of three independent experiments. * P \leq 0.05 relative to the Ctr value (two-sided t test).

To localize more precisely the origin of the luminescence, we excised and individually imaged several organs from control or induced mice (Fig. 4B). Liver, brain, pancreas, and duodenum displayed induction of bioluminescence in response to both amino acid starvation (GCN2 activation) and tunicamycin (PERK activation). Strikingly, luminescence was specifically induced in brown (BAT) and white (WAT) adipose tissues in response to GCN2 inducers, whereas the PERK inducer tunicamycin increased the luminescence signal in kidney and skeletal muscle. As expected, the consumption of an alanine-deficient diet did not activate the eIF2 α -ATF4 pathway in any organs.

To confirm imaging data, we quantified luciferase activity in homogenates of organs collected from control and induced mice (Fig. 4C) and performed immunohistochemistry with an antibody recognizing luciferase (Fig. 4D). In accordance with the results from noninvasive imaging, liver, pancreas, and brain exhibited the greatest induction in luciferase activity for both GCN2 and PERK inducers, and kidney exhibited the greatest increase specific to PERK activation (Fig. 4C). BAT, WAT, duodenum, and skeletal muscle also exhibited significant increases in luciferase activity with muscle specifically responding to PERK activation (Fig. 4C). Lung, heart, and spleen did not exhibit any detectable bioluminescence or induction of luciferase activity (Fig. 4, B and C). By performing immunohistochemistry staining with luciferase antibody, we observed the activated eIF2 α -ATF4 pathway in specific cells within an organ. In particular, we identified that this pathway was activated in hepatocytes in response to either GCN2 or PERK activation (Fig. 4D). Together, these results revealed the tissue-specific induction of the eIF2 α -ATF4 pathway that depended on the upstream activating kinase.

To confirm that another ER stress-inducing agent stimulated the eIF2 α -ATF4 pathway in a pattern similar to that stimulated by tunicamycin, we analyzed the effect of thapsigargin, another ER stress inducer that activates PERK (Fig. 1A) (9), in 2XCARE-TRB3-LUC-expressing MEFs and the CARE-LUC mice. The MEFs exhibited a dose-dependent induction of luciferase activity in response to thapsigargin (fig. S5A). Thapsigargin injection induced a similar pattern of bioluminescence and luciferase activity in organs as that produced by tunicamycin (fig. S5, B and C). Expression analysis of the previously studied ATF4-dependent genes confirmed the tissue-specific activation of the AARE-dependent transcription according to the different inducers (Fig. 4E).

Visualization of the eIF2 α -ATF4 pathway induction in a model of liver fibrosis

We sought to show the relevance of the reporter mouse model to study stress-related pathologies. Because we found that the liver was one of the central organs for the adaptive response regulated by the eIF2 α -ATF4 axis, we monitored the activation of this pathway in a hepatic disease model induced by chemical injury. Liver fibrosis is a common consequence of chronic liver injuries, including alcohol abuse, viral hepatitis, autoimmune disease, and nonalcoholic steatohepatitis (16). Activation of the eIF2 α -ATF4 pathway is associated with a number of these liver disorders (17–19).

We injected CARE-LUC mice with carbon tetrachloride (CCl₄), a well-characterized chemical that produces oxidative stress and hepatic injury (20, 21). Acute injection (6 hours before analysis) of this compound caused induced luciferase activity in the liver and brain (fig. S6, A and B). To establish liver fibrosis in CARE-LUC mice, we performed chronic administration (8 weeks) of CCl₄. To avoid the bioluminescence noise caused by acute CCl₄ injection, we measured photon emission 3 days after injection. Kinetic analysis revealed that chronic CCl₄ injection elicited a strong increase of bioluminescence in the part of the abdomen corresponding to liver (Fig. 5A), and the excised livers from treated mice had high luciferase activity, confirming that the drug targeted the liver (Fig.

5B). To determine the correlation between liver fibrosis and activation of the eIF2 α -ATF4 pathway, we detected luciferase by immunohistochemistry and performed hematoxylin and eosin (H&E) staining for histological analysis and immunohistochemical staining to detect collagen 1, a marker of fibrosis development (16). The H&E staining showed that chronic CCl₄ treatment led to organ disorganization, and this was associated with collagen type 1 deposition and abundant luciferase (Fig. 5C). Consistent with these results, mRNA for *Colla1* and *Colla2*, encoding collagen type 1, was significantly increased in the livers of mice chronically injected with CCl₄ (Fig. 5D). Thus, these results indicated that liver fibrosis resulting from chronic administration of CCl₄ was associated with activation of the eIF2 α -ATF4 pathway as detected by induction of the reporter.

To confirm that the bioluminescence and luciferase activity and abundance were associated with activation of eIF2 α -ATF4 pathway activation liver with CCl₄-induced fibrosis, we performed immunoblot analysis of eIF2 α and ATF4 in liver tissue. Indeed, chronic CCl₄ injection increased phosphorylation of eIF2 α and the abundance of ATF4 and triggered the appearance of the activated form of PERK (Fig. 5E). As expected, the induction of the eIF2 α -ATF4 pathway significantly increased the expression of two endogenous ATF4 target genes, *Trib3* and *Asns*, as well as the mRNA of the luciferase reporter, in the transgenic mice (Fig. 5F). Together, these data demonstrated that liver fibrosis in response to chronic CCl₄ treatment correlates with activation of the eIF2 α -ATF4 pathway in this organ and confirmed the relevance of the CARE-LUC mouse model for investigating stress-related pathologies.

DISCUSSION

The eIF2 α -ATF4 signaling pathway controls a specific CARE-dependent transcriptional program involved in the adaptive response to multiple stresses. Furthermore, its implication in many disorders creates a need to determine precisely its role in physiological and pathological contexts. Here, we describe the generation of a novel ATF4-inducible luciferase mouse model for real-time monitoring of the eIF2 α -ATF4 pathway in living animals subjected to various types of cellular stress. We showed that this sensitive reporter mouse enables *in vivo* imaging of CARE transcription under physiological and pathological situations.

This mouse model has several features that make it particularly useful for investigating the role of the eIF2 α /ATF4 pathway *in vivo*. First, luciferase enables high-sensitivity *in vivo* imaging and biochemical assays, and induction of the encoding gene can be monitored with good kinetic resolution because the enzyme is active upon synthesis. The stability of luciferase enables the detection of its induction that occurs before analysis (22). Second, the generation of a transgenic mouse model enables the visualization of the activation of the eIF2 α -ATF4 axis by imaging or histology in all cells of the mouse. Thus, modulation of the pathway at multiple levels of organization (whole organism, organs, tissues, or single cells) is possible, and reporter cell lines can be generated or primary cells can be isolated from the transgenic mouse. Moreover, our data showed a reversibility of the transgene expression, suggesting that change in the activation of the pathway can be detected as long as the pathway is inactive longer than luciferase is stable. Third, because the mice with the reporter are healthy and reproduce and live normal life spans, numerous pathologies, metabolic disorders, and aging, which are, in part, the consequence of chronic stresses applied across life span and are associated with phosphorylation of eIF2 α (23, 24), can be investigated with these mice. The CARE-LUC mice enable long-term longitudinal studies of the induction of this signaling pathway, which thus limits the number of mice required for kinetic studies.

With the CARE-LUC mice, we provided two new insights into the eIF2 α -ATF4 pathway, demonstrating the usefulness of these animals as

RESEARCH RESOURCE

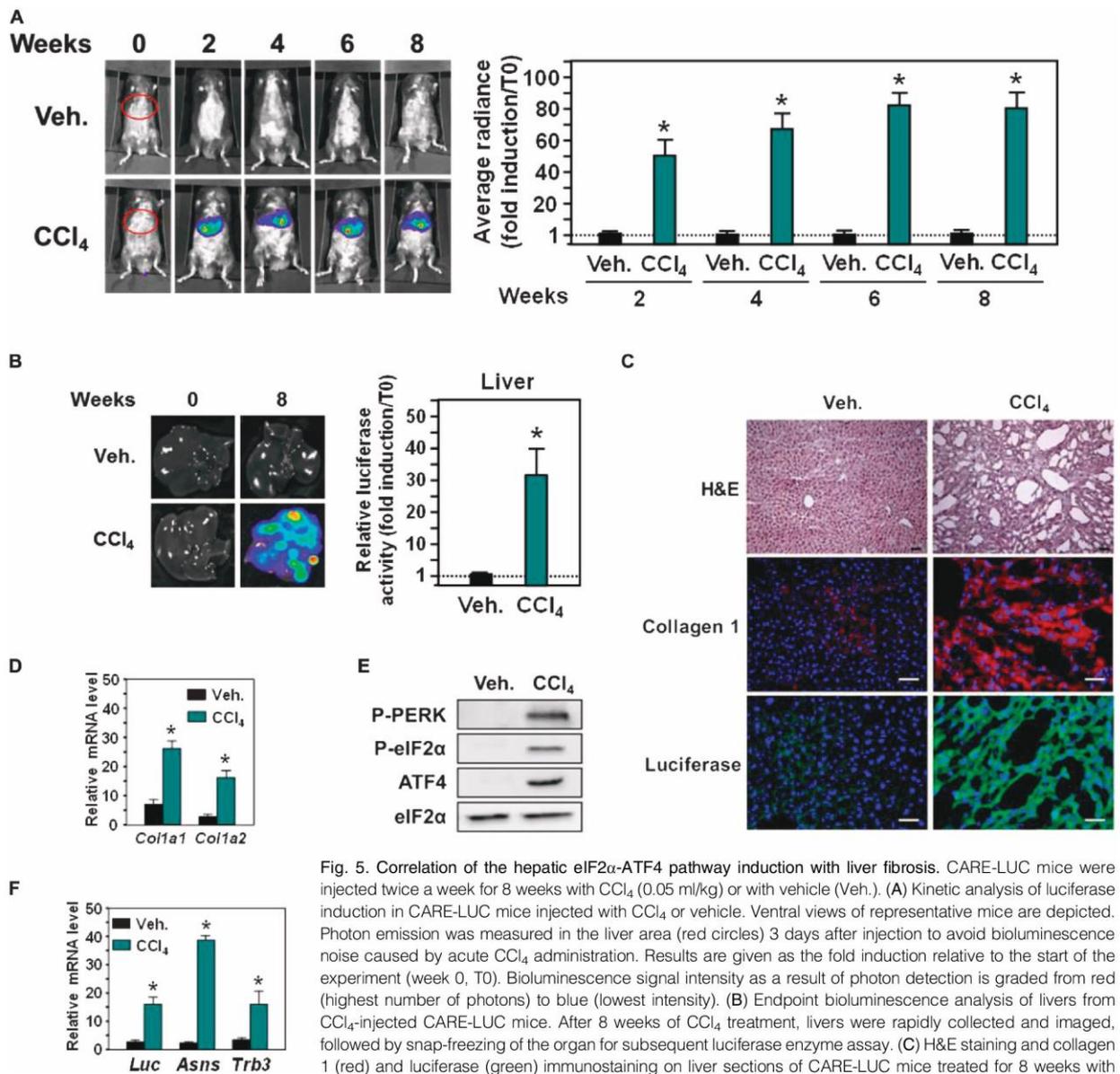


Fig. 5. Correlation of the hepatic eIF2 α -ATF4 pathway induction with liver fibrosis. CARE-LUC mice were injected twice a week for 8 weeks with CCl₄ (0.05 ml/kg) or with vehicle (Veh.). (A) Kinetic analysis of luciferase induction in CARE-LUC mice injected with CCl₄ or vehicle. Ventral views of representative mice are depicted. Photon emission was measured in the liver area (red circles) 3 days after injection to avoid bioluminescence noise caused by acute CCl₄ administration. Results are given as the fold induction relative to the start of the experiment (week 0, T0). Bioluminescence signal intensity as a result of photon detection is graded from red (highest number of photons) to blue (lowest intensity). (B) Endpoint bioluminescence analysis of livers from CCl₄-injected CARE-LUC mice. After 8 weeks of CCl₄ treatment, livers were rapidly collected and imaged, followed by snap-freezing of the organ for subsequent luciferase enzyme assay. (C) H&E staining and collagen 1 (red) and luciferase (green) immunostaining on liver sections of CARE-LUC mice treated for 8 weeks with CCl₄. Nuclei are stained in blue. Scale bars, 50 μ m. (D) Effect of CCl₄ on the abundance of hepatic mRNA of collagen type 1 (*Col1a1* and *Col1a2*). (E) Liver protein analysis of phosphorylation of PERK and eIF2 α and total abundance of ATF4 and eIF2 α . (F) Effect of CCl₄ on the abundance of hepatic mRNA of *Luc*, *Trb3*, and *Asns*. For bioluminescence analyses (A and B), the graphs show means \pm SEM of six mice for each condition. * $P \leq 0.05$ relative to the week 0 value (two-sided *t* test). For RT-qPCR analyses (D and F), the graphs show means \pm SEM of three independent experiments. * $P \leq 0.05$ relative to the Ctr mice value (two-sided *t* test).

a model. First, we identified the main organs in which the eIF2 α -ATF4 pathway was induced by specific stresses. In particular, our results demonstrated that this pathway is induced in a tissue-specific manner that depended on the stress and which eIF2 α kinase was activated. The CARE-LUC mice exhibited the expected activation of the GCN2-eIF2 α -ATF4 pathway

in brain and liver after the consumption of a EAA-deficient diet, as described previously (14, 25–27). However, we also found that an EAA-deficient diet stimulated the GCN2-eIF2 α -ATF4 pathway in key metabolic organs: pancreas, BAT, and WAT. The CARE-LUC mice exhibited the expected activation of the PERK-eIF2 α -ATF4 axis in liver, brain, and

pancreas (28–30), which were also tissues in which the eIF2 α -ATF4 pathway activity occurred in response to an EAA-deficient diet. In contrast, we showed that the CARE-LUC mice exhibited eIF2 α -ATF4 pathway activity in kidney and skeletal muscle only in response to PERK activation, as described previously (31, 32), not GCN2 activation. Considering that a large number of stresses converge on the eIF2 α -ATF4 axis, the difference in spatial and temporal induction patterns may constitute a first degree of the stress-response orchestration in the body. This difference cannot be explained solely on the basis of the presence of different eIF2 α kinases in the tissues. For example, GCN2 is abundant in lung and kidney (33), whereas no bioluminescence signal was detected in these organs in response to EAA starvation or halofuginone. The mechanisms controlling the specificity of eIF2 α -ATF4 pathway induction remain unknown, and the CARE-LUC mice represent a valuable tool for their investigation, which should lead to better understanding of the complexity of stress adaptation mechanisms.

By monitoring activation of the eIF2 α -ATF4 pathway during the development of chronic hepatic fibrosis, we provided the second example of the usefulness of these transgenic mice. We showed that hepatic fibrosis that developed over an 8-week period in response to chemical injury is correlated with the activation of PERK, which is consistent with a previous study implicating the unfolded protein response in the promotion of liver fibrosis (21). These data demonstrated the relevance of the CARE-LUC transgenic mice in the analysis of the modulation of the eIF2 α -ATF4 pathway in physiopathological situations and in the identification of molecular events contributing to disease progression.

We anticipate that the CARE-LUC mouse model will enable studies with clinical implications. For example, if crossed with other mouse models of human diseases, the resulting mice will be useful for studying pathologies in which the eIF2 α -ATF4 pathway is implicated, such as neurodegenerative disorders or cancer (12, 34, 35). One clinical challenge is developing selective and bioavailable modulators of the eIF2 α kinases, the downstream effectors, or both to treat those diseases (36, 37). In this regard, the CARE-LUC mice could help in the drug discovery or target validation process. Overall, this reporter mouse model represents an important tool for investigating the role of the eIF2 α -ATF4 pathway in physiology and disease and opens new avenues for the development of drugs that modify this important pathway in stress-related human pathologies.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid constructions

1XCARE-TRB3-TK-LUC and 2XCARE-TRB3-TK-LUC constructs were generated by inserting Mlu I-Xho I double-stranded oligonucleotides containing one or two iterations of the TRB3 CARE sequence (–7131 to –7033) into the Mlu I-Xho I sites of TATA-TK-LUC (38). The 2XCARE-TRB3-TK-LUC construct was then cloned into a lentiviral expression vector to produce lentivirus used to generate a stable MEF cell line and the transgenic mouse strain (39).

Generation of the CARE-LUC transgenic mouse model

C57Bl/6 transgenic mice expressing the luciferase gene under the control of CARE regulatory elements (CARE-LUC) were generated by perivitelline injection of fertilized oocytes with 2XCARE-TK-LUC lentiviral vector, as described previously (40). Offspring were screened by PCR genotyping of tail DNA using specific LUC primers (forward primer, 5'-TCTGG-TGGCGCTCCCTCTC-3'; reverse primer, 5'-AACAACAACGGCGG-CGGGAA-3'). We used real-time PCR to quantify the number of copies of integrated transgene. After alkaline extraction, DNA (4 ng/ μ l) was subjected to qPCR (SYBR Green) using specific vector primers (forward

primer, 5'-CCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3'; reverse primer, 5'-GG-CGCCACTGCTAGAGATTTT-3') and primers specific for CD8 promoter as an internal standard (forward primer, 5'-CCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3'; reverse primer, 5'-GGCGCCACTGCTAGAGATTTT-3'), as described previously (40). Heterozygous mice with one copy of the transgene were crossed with each other to obtain homozygous CARE-LUC mice. Mouse maintenance and all experiments were approved by our Institutional Animal Care and Use Committee, in conformance with French and European Union laws (permission to experiment on mice B63-150, local ethic committee CEMEA CE10-13, animal facilities agreement C6334514, GMO agreement 4756CA-I).

Experimental diets and animal treatments

Experimental diets were manufactured in our institute facilities [Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité de Préparation des Aliments Expérimentaux, Jouy-en-Josas, France]. A standard chow containing 20% protein (casein) was used for mice injected with tunicamycin, halofuginone, or CCl₄. In experiments to study the impact of dietary isoleucine, lysine, or alanine deprivation on CARE-LUC transgene induction, experimental diets containing 20% free L-amino acids as the sole amino acid source were used as previously described (13). The diets lacking isoleucine, lysine, or alanine were obtained by removing the corresponding EAA from the free amino acid mixture. Tunicamycin (0.5 μ g/g), halofuginone (0.05 μ g/g), or thapsigargin (1 μ g/g) was injected intraperitoneally.

Acute liver injury was induced by intraperitoneal injection of CCl₄ (0.05 ml/kg) [25% (v/v) in mineral oil]. Chronic liver injury was induced by intraperitoneal administrations of CCl₄ (0.05 ml/kg) [25% (v/v) in mineral oil] twice a week for 2 months. Tunicamycin (T7765), halofuginone (32481), and CCl₄ (289116) were purchased from Sigma, and thapsigargin (T7458) was from Life Technologies. All liver injury experiments were done with CARE-LUC mice on C57Bl/6 background between 8 and 12 weeks of age maintained with lab chow and drinking water available ad libitum and kept under a 12-hour light/12-hour dark cycle. Experiments were performed with a minimum of six animals per condition.

Bioluminescence imaging

Bioluminescence imaging was performed using the IVIS Spectrum (PerkinElmer) imaging scanner coupled to the Living Image software (PerkinElmer). Briefly, in vivo luciferase substrate (100 mg/kg) (beetle luciferin substrate, Promega) was injected intraperitoneally into each mouse. Mice were then anesthetized with isoflurane and scanned 10 min after luciferin injection. The abdominal cavity was shaved once a week to allow accurate collection of bioluminescence signals. Light emission was quantified with imaging software from constant ROIs drawn manually. Photon emission was measured as radiance in ps⁻¹ cm⁻² sr⁻¹. The sensitivity of the imaging scanner was tested weekly with commercially available positive sources of bioluminescence. Excised organs were imaged immediately after sacrifice using the IVIS Spectrum (PerkinElmer) imaging scanner coupled to the Living Image software (PerkinElmer).

Luciferase biochemical assay

Luciferase assays were performed as previously described (8). Luciferase activities measured in tissue extracts were normalized to protein content (relative light units per milligram of protein) and expressed as fold induction relative to the control condition.

Plasma amino acid analysis

Blood samples were drawn from the aorta of anesthetized mice. Plasma amino acids were purified; that is, 100 μ l of plasma was added to 30 μ l of sulfosalicylic acid solution (1 M in ethanol with 0.5 M thiodiglycol)

previously completely evaporated. We added norleucine as an internal standard to evaluate sample treatment efficiency, which was then used to correct the raw values. Amino acid concentrations were determined using an L8900 amino acid analyzer (ScienceTec) with BTC 2410 resin (Hitachi Chemical).

Histologic analysis

Livers were retrieved from intracardiac-perfused animals with 1% paraformaldehyde prepared in 1× phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2). Collected livers were fixed overnight in 1% paraformaldehyde prepared in 1× PBS and then cryoprotected in 15% sucrose/1× PBS for at least 24 hours. Livers were embedded in 7% gelatin, 15% sucrose prepared in 1× PBS, frozen in -50°C isopentane, and stored at -80°C until used. Sections (14 μm) were taken and processed as previously described (41). Luciferase detection was performed using goat anti-luciferase (1:1000, Millipore) primary antibody and an Alexa Fluor 488 donkey anti-goat (1:1000, Invitrogen) secondary antibody. Nuclei were stained with Hoechst 33342 fluorescent stain. Collagen type 1 immunostaining was carried out using a monoclonal antibody (1:1000, Millipore).

Cell culture and treatments conditions

MEFs were cultured at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 (Sigma) containing 10% fetal bovine serum. A DMEM/F12 medium devoid of leucine, glutamine, lysine, and methionine (Sigma, catalog no. D9785) was used to make medium lacking leucine. For leucine starvation experiments, cells were washed twice with PBS, and DMEM/F12 lacking leucine containing 10% dialyzed serum was added. Transient transfections were performed as previously described (8). MEFs deficient in GCN2 (9), PERK (42), or ATF4 (4) were given by D. Ron (Institute of Metabolic Science, Cambridge, UK).

Analysis of gene expression using real-time RT-qPCR

Real-time RT-qPCR was performed as previously described (8). Primers for mouse sequences (table S1) yielded PCR products of about 100 to 200 base pairs in size. To control for RNA quality and complementary DNA synthesis, β -actin mRNA was also amplified with forward (5'-TA-CAGCTTCACCACCACAGC-3') and reverse primers (5'-AAGGA-AGGCTGGAAAAGAGC-3'). The abundance of each mRNA was normalized to the β -actin signal. Each experiment was repeated three times to confirm the reproducibility of the results.

Immunoblot analysis and antibodies

Western blot analyses were performed as previously described (8). ATF4 (sc-200), β -actin (sc-7210), and normal rabbit IgG (sc-2027) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. Antibodies recognizing phosphorylated eIF2 α (catalog no. 3398S) and phosphorylated PERK (catalog no. 3179S) were from Cell Signaling Technology, and the antibody recognizing phosphorylated GCN2 was from Abcam (ab75836).

ChIP analysis

ChIP analysis in the liver was performed as previously described (14). Purified immunoprecipitated DNA was analyzed by real-time qPCR. The following primers were used for the CARE-TK transgenic promoter (amplicon A): 5'-CTCGAGGTCCACTTCGCATA-3' and 5'-CCAA-CAGTACCGGAATGCCA-3'. The following primers were used for the mouse *Trb3* promoter (amplicon B): 5'-GGGCGGGTTCACAGAT-GGTGC-3' and 5'-GACCGCCGCCAGCCTAACTG-3'. The results are expressed as the percentage of antibody binding versus the amount of PCR product obtained using a standardized aliquot of input chromatin (% of input). Samples from at least three independent immunoprecipita-

tions were analyzed in duplicate PCR assays, and results are reported as means \pm SEM.

Statistical analysis

For animal experiments, a minimum of six mice were used for each group. For luciferase assay and RT-qPCR analyses, experiments were repeated at least three times with three samples per group. All data are expressed as means \pm SEM. Statistical significance was assessed by two-sided Student's *t* test. For all experiments, the asterisks indicate a *P* value of ≤ 0.05 .

SUPPLEMENTARY MATERIALS

www.sciencesignaling.org/cgi/content/full/8/374/rs5/DC1

Fig. S1. Increase in ATF4-dependent gene expression by GCN2 and PERK inducers in MEFs. Fig. S2. Dose-response analyses of the induction of the 2XCARE-TRB3-LUC construct in response to leucine starvation or halofuginone or tunicamycin treatment. Fig. S3. Inducibility of the 2XCARE-TRB3-LUC construct when stably integrated in the MEF genome. Fig. S4. Kinetic of bioluminescence imaging of CARE-LUC mice fed a lysine-deficient diet. Fig. S5. Induction of bioluminescence in CARE-LUC mice in response to thapsigargin administration. Fig. S6. Hepatic and cerebral induction of the eIF2 α -ATF4 pathway in response to CCl₄ administration. Table S1. List of mouse qPCR primers.

REFERENCES AND NOTES

- N. Donnelly, A. M. Gorman, S. Gupta, A. Samali, The eIF2 α kinases: Their structures and functions. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 3493–3511 (2013).
- P. D. Lu, H. P. Harding, D. Ron, Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J. Cell Biol.* **167**, 27–33 (2004).
- K. M. Vatterm, R. C. Wek, Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 11269–11274 (2004).
- H. P. Harding, Y. Zhang, H. Zeng, I. Novoa, P. D. Lu, M. Calton, N. Sadri, C. Yun, B. Popko, R. Paules, D. F. Stojil, J. C. Bell, T. Hettmann, J. M. Leiden, D. Ron, An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* **11**, 619–633 (2003).
- R. C. Wek, H. Y. Jiang, T. G. Anthony, Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 7–11 (2006).
- M. S. Kilberg, J. Shan, N. Su, ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends Endocrinol. Metab.* **20**, 436–443 (2009).
- E. Bevilacqua, X. Wang, M. Majumder, F. Gaccioli, C. L. Yuan, C. Wang, X. Zhu, L. E. Jordan, D. Scheuner, R. J. Kaufman, A. E. Koromilas, M. D. Snider, M. Holcik, M. Hatzoglou, eIF2 α phosphorylation tips the balance to apoptosis during osmotic stress. *J. Biol. Chem.* **285**, 17098–17111 (2010).
- W. BChir, A. C. Maurin, V. Carraro, J. Averous, C. Jousse, Y. Muranishi, L. Parry, G. Stepien, P. Faoumoux, A. Bruhat, The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* **41**, 7683–7699 (2013).
- H. P. Harding, I. I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira, D. Ron, Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* **6**, 1099–1108 (2000).
- J. Ye, M. Kumanova, L. S. Hart, K. Sloane, H. Zhang, D. N. De Paris, E. Bobrovnikova-Marjon, J. A. Diehl, D. Ron, C. Koumenis, The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *EMBO J.* **29**, 2082–2096 (2010).
- T. D. Baird, R. C. Wek, Eukaryotic initiation factor 2 phosphorylation and translational control in metabolism. *Adv. Nutr.* **3**, 307–321 (2012).
- M. Ohno, Roles of eIF2 α kinases in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front. Mol. Neurosci.* **7**, 22 (2014).
- A. C. Maurin, C. Jousse, J. Averous, L. Parry, A. Bruhat, Y. Cherasse, H. Zeng, Y. Zhang, H. P. Harding, D. Ron, P. Faoumoux, The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores. *Cell Metab.* **1**, 273–277 (2005).
- V. Carraro, A. C. Maurin, S. Lambert-Langlais, J. Averous, C. Chaveroux, L. Parry, C. Jousse, D. Örd, T. Örd, P. Faoumoux, A. Bruhat, Amino acid availability controls TRB3 transcription in liver through the GCN2/eIF2 α /ATF4 pathway. *PLOS One* **5**, e15716 (2010).
- F. Guo, D. R. Cavener, The GCN2 eIF2 α kinase regulates fatty-acid homeostasis in the liver during deprivation of an essential amino acid. *Cell Metab.* **5**, 103–114 (2007).

RESEARCH RESOURCE

16. R. Bataller, D. A. Brenner, Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.* **115**, 209–218 (2005).
17. K. A. Tazi, I. Bieche, V. Paradis, C. Guichard, I. Laurendeau, D. Dargere, A. Legrand, M. Fay, E. Pedruzzi, M. A. Robin, D. Cazals-Hatem, Z. Tellier, D. Bemuau, G. Feldmann, M. Vidaud, D. Lebrech, E. Ogier-Denis, R. Moreau, In vivo altered unfolded protein response and apoptosis in livers from lipopolysaccharide-challenged cirrhotic rats. *J. Hepatol.* **46**, 1075–1088 (2007).
18. P. Puri, F. Mirshahi, O. Cheung, R. Natarajan, J. W. Maher, J. M. Kellum, A. J. Sanyal, Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **134**, 568–576 (2008).
19. H. K. Cho, K. J. Cheong, H. Y. Kim, J. Cheong, Endoplasmic reticulum stress induced by hepatitis B virus X protein enhances cyclo-oxygenase 2 expression via activating transcription factor 4. *Biochem. J.* **435**, 431–439 (2011).
20. E. Arriazu, M. Ruiz de Galarreta, M. J. Lopez-Zabalza, T. M. Leung, N. Nieto, M. J. Iraburu, GCN2 kinase is a key regulator of fibrogenesis and acute and chronic liver injury induced by carbon tetrachloride in mice. *Lab. Invest.* **93**, 303–310 (2013).
21. D. DeZwaan-McCabe, J. D. Riordan, A. M. Arensdorf, M. S. Icardi, A. J. Dupuy, D. T. Rutkowski, The stress-regulated transcription factor CHOP promotes hepatic inflammatory gene expression, fibrosis, and oncogenesis. *PLoS Genet.* **9**, e1003937 (2013).
22. S. Lienenklaus, M. Comitescu, N. Zietara, M. Lyszkiewicz, N. Gekara, J. Jablonska, F. Edenhofer, K. Rajewsky, D. Bruder, M. Hafner, P. Staeheli, S. Weiss, Novel reporter mouse reveals constitutive and inflammatory expression of IFN- β in vivo. *J. Immunol.* **183**, 3229–3236 (2009).
23. U. Ozcan, Q. Cao, E. Yilmaz, A. H. Lee, N. N. Iwakoshi, E. Ozdelen, G. Tuncman, C. Gorgun, L. H. Glimcher, G. S. Hotamisligil, Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* **306**, 457–461 (2004).
24. S. G. Hussain, K. V. Ramaiah, Reduced eIF2 α phosphorylation and increased proapoptotic proteins in aging. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**, 365–370 (2007).
25. P. Zhang, B. C. McGrath, J. Reinert, D. S. Olsen, L. Lei, S. Gill, S. A. Wek, K. M. Vatter, R. C. Wek, S. R. Kimball, L. S. Jefferson, D. R. Cavener, The GCN2 eIF2 α kinase is required for adaptation to amino acid deprivation in mice. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 6681–6688 (2002).
26. M. Roffe, G. N. Hajji, H. F. Azevedo, V. S. Alves, B. A. Castilho, IMPACT is a developmentally regulated protein in neurons that opposes the eukaryotic initiation factor 2 α kinase GCN2 in the modulation of neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* **288**, 10860–10869 (2013).
27. A. C. Maurin, A. Benani, A. Lorisignol, X. Brenachot, L. Parry, V. Carraro, C. Guissard, J. Averous, C. Jousse, A. Bruhat, C. Chaveroux, W. B'Chir, Y. Muranishi, D. Ron, L. Penicaud, P. Fafournoux, Hypothalamic eIF2 α signaling regulates food intake. *Cell Rep.* **6**, 438–444 (2014).
28. B. F. Teske, S. A. Wek, P. Bunpo, J. K. Cundiff, J. N. McClintock, T. G. Anthony, R. C. Wek, The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* **22**, 4390–4405 (2011).
29. Z. Jiang, J. E. Belforte, Y. Lu, Y. Yabe, J. Pickel, C. B. Smith, H. S. Je, B. Lu, K. Nakazawa, eIF2 α phosphorylation-dependent translation in CA1 pyramidal cells impairs hippocampal memory consolidation without affecting general translation. *J. Neurosci.* **30**, 2582–2594 (2010).
30. S. Yamaguchi, H. Ishihara, T. Yamada, A. Tamura, M. Usui, R. Tominaga, Y. Munakata, C. Satake, H. Katagiri, F. Tashiro, H. Aburatani, K. Tsukiyama-Kohara, J. Miyazaki, N. Sonenberg, Y. Oka, ATF4-mediated induction of 4E-BP1 contributes to pancreatic β cell survival under endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab.* **7**, 269–276 (2008).
31. S. J. Marciniak, C. Y. Yun, S. Oyadomari, I. Novoa, Y. Zhang, R. Jungreis, K. Nagata, H. P. Harding, D. Ron, CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* **18**, 3066–3077 (2004).
32. L. Deldicque, P. D. Cani, A. Philp, J. M. Raymackers, P. J. Meakin, M. L. Ashford, N. M. Delzenne, M. Francaux, K. Baar, The unfolded protein response is activated in skeletal muscle by high-fat feeding: Potential role in the downregulation of protein synthesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **299**, E695–E705 (2010).
33. R. Sood, A. C. Porter, D. A. Olsen, D. R. Cavener, R. C. Wek, A mammalian homologue of GCN2 protein kinase important for translational control by phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 α . *Genetics* **154**, 787–801 (2000).
34. T. Mitsuda, Y. Hayakawa, M. Itoh, K. Ohta, T. Nakagawa, ATF4 regulates γ -secretase activity during amino acid imbalance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **352**, 722–727 (2007).
35. L. Bouman, A. Schlierf, A. K. Lutz, J. Shan, A. Deinlein, J. Kast, Z. Galehdar, V. Palmisano, N. Patenge, D. Berg, T. Gasser, R. Augustin, D. Trumbach, I. Irrcher, D. S. Park, W. Wurst, M. S. Kilberg, J. Tatzelt, K. F. Winkhofer, Parkin is transcriptionally regulated by ATF4: Evidence for an interconnection between mitochondrial stress and ER stress. *Cell Death Differ.* **18**, 769–782 (2011).
36. M. J. Fullwood, W. Zhou, S. Shenolikar, Targeting phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 α to treat human disease. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **106**, 75–106 (2012).
37. H. J. Kim, A. R. Raphael, E. S. LaDow, L. McGurk, R. A. Weber, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee, S. Finkbeiner, A. D. Gitler, N. M. Bonini, Therapeutic modulation of eIF2 α phosphorylation rescues TDP-43 toxicity in amyotrophic lateral sclerosis disease models. *Nat. Genet.* **46**, 152–160 (2014).
38. A. Bruhat, C. Jousse, V. Carraro, A. M. Reimold, M. Ferrara, P. Fafournoux, Amino acids control mammalian gene transcription: Activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the CHOP promoter. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7192–7204 (2000).
39. A. Schambach, M. Galla, T. Maetzig, R. Loew, C. Baum, Improving transcriptional termination of self-inactivating gamma-retroviral and lentiviral vectors. *Mol. Ther.* **15**, 1167–1173 (2007).
40. M. Tomkowiak, R. Ghittoni, M. Teixeira, B. Blanquier, J. Szecsi, D. Negre, D. Aubert, C. A. Coupet, M. Brunner, E. Verhoeven, J. L. Thoumas, F. L. Cossat, Y. Leverrier, J. Marvel, Generation of transgenic mice expressing EGFP protein fused to NP68 MHC class I epitope using lentivirus vectors. *Genesis* **51**, 193–200 (2013).
41. H. Kiefer, F. Chatail-Hermitte, P. Ravassard, E. Bayard, I. Brunet, J. Mallet, ZENON, a novel POZ Kruppel-like DNA binding protein associated with differentiation and/or survival of late postmitotic neurons. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 1713–1729 (2005).
42. H. P. Harding, Y. Zhang, A. Bertolotti, H. Zeng, D. Ron, Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol. Cell* **5**, 897–904 (2000).

Acknowledgments: We are grateful to D. Ron and H. Harding (Institute of Metabolic Science, Cambridge, UK) for the gift of ATF4- GCN2 and PERK-deficient MEFs. We thank G. Froment, D. Nègre, and C. Costa from the lentivectors production facility/SFR BioSciences Gerland-Lyon Sud (UMS3444/US8). We also thank D. Aubert and M. Teixeira from the transgenic animal production facility/SFR BioSciences Gerland-Lyon Sud (UMS3444/US8), A. Terrisse and A. Teynié (INRA, Theix) for animal care, N. Hafnaoui for plasma amino acid analysis, E. Miot-Noirault (UMR 990 INSERM/Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand) for imaging assistance, and J. Bianchi for technical assistance. **Funding:** This study was supported by Programmes Emergence (ANR-12-EMMA-0024) and STRESSOR (ANR-12-BSV2-0025-03) of Agence Nationale de la Recherche and INRA. **Author contributions:** C.C., P.F., and A.B. designed the experiment; C.C., V.C., L.C., and P.R. performed the experiments; J.A., A.-C.M., C.J., Y.M., and F.M. provided reagents, materials, or analysis tools; C.C., L.P., P.R., P.F., and A.B. analyzed the data; J.M., E.G., and P.P. provided scientific expertise; C.C., P.F., and A.B. wrote the paper. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** Material should be requested from the corresponding authors (P.F. and A.B.) and is subject to a material transfer agreement (INRA).

Submitted 7 November 2014

Accepted 13 April 2015

Final Publication 28 April 2015

10.1126/scisignal.aaa0549

Citation: C. Chaveroux, V. Carraro, L. Canaple, J. Averous, A.-C. Maurin, C. Jousse, Y. Muranishi, L. Parry, F. Mesclon, E. Gatti, J. Mallet, P. Ravassard, P. Pierre, P. Fafournoux, A. Bruhat, In vivo imaging of the spatiotemporal activity of the eIF2 α -ATF4 signaling pathway: Insights into stress and related disorders. *Sci. Signal.* **8**, rs5 (2015).

Publication non présentée

Julien Averous^{1,2,*}, Sarah Lambert-Langlais^{1,2,*}, **Florent Mesclon^{1,2}**, Valérie Carraro^{1,2}, Laurent Parry^{1,2}, Céline Jousse^{1,2}, Alain Bruhat^{1,2}, Anne-Catherine Maurin^{1,2}, Philippe Pierre^{3,4,5,6}, Christopher G. Proud^{7,8} & Pierre Fafournoux^{1,2}

“GCN2 contributes to mTORC1 inhibition by leucine deprivation through an ATF4 independent mechanism”

Scientific Reports June 2016

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN GCN2 contributes to mTORC1 inhibition by leucine deprivation through an ATF4 independent mechanism

Received: 09 December 2015

Accepted: 19 May 2016

Published: 14 June 2016

Julien Averous^{1,2,*}, Sarah Lambert-Langlais^{1,2,*}, Florent Mesclon^{1,2}, Valérie Carraro^{1,2}, Laurent Parry^{1,2}, Céline Jousse^{1,2}, Alain Bruhat^{1,2}, Anne-Catherine Maurin^{1,2}, Philippe Pierre^{3,4,5,6}, Christopher G. Proud^{7,8} & Pierre Fafournoux^{1,2}

It is well known that the GCN2 and mTORC1 signaling pathways are regulated by amino acids and share common functions, in particular the control of translation. The regulation of GCN2 activity by amino acid availability relies on the capacity of GCN2 to sense the increased levels of uncharged tRNAs upon amino acid scarcity. In contrast, despite recent progress in the understanding of the regulation of mTORC1 by amino acids, key aspects of this process remain unsolved. In particular, while leucine is well known to be a potent regulator of mTORC1, the mechanisms by which this amino acid is sensed and control mTORC1 activity are not well defined. Our data establish that GCN2 is involved in the inhibition of mTORC1 upon leucine or arginine deprivation. However, the activation of GCN2 alone is not sufficient to inhibit mTORC1 activity, indicating that leucine and arginine exert regulation via additional mechanisms. While the mechanism by which GCN2 contributes to the initial step of mTORC1 inhibition involves the phosphorylation of eIF2 α , we show that it is independent of the downstream transcription factor ATF4. These data point to a novel role for GCN2 and phosphorylation of eIF2 α in the control of mTORC1 by certain amino acids.

The control of cell growth is tightly coupled to the level of protein synthesis, which in turn is controlled by nutrient availability. Among nutrients, amino acids exert a major role on protein synthesis regulation through the control of the kinases mTOR (mammalian [or mechanistic] Target Of Rapamycin) and GCN2 (General Control Non-derepressible 2) which have opposing effects on protein synthesis. In mammals, the potential regulatory interactions between these two pathways are still poorly understood. mTOR, as part of the complex mTORC1, is activated by the presence of amino acids¹ and phosphorylates the eIF4E-binding proteins, the S6 kinases and eukaryotic elongation factor 2 kinase, all of which events favor protein synthesis²⁻³. GCN2 is activated during scarcity of an essential amino acid and phosphorylates the α -subunit of eukaryotic initiation factor 2 alpha (eIF2 α)⁴. This leads to the general inhibition of protein synthesis. However, the phosphorylation of eIF2 α actually promotes the translation of certain mRNAs that possess uORFs (upstream Open Reading Frames) in their 5'-UTRs, an example of such an mRNA being that encoding the transcription factor activating transcription factor 4 (ATF4)⁵. ATF4 plays a key role in the adaptation of the cell to the lack of amino acids by regulating the expression, of amino acid transporters⁶, enzymes involved in amino acid metabolism⁷ or factors involved in autophagy⁸.

¹INRA, UMR 1019 Nutrition Humaine, Centre de Clermont-Ferrand-Theix, F-63122 Saint Genès Champanelle, France. ²Université Clermont 1, UFR Médecine, UMR 1019 Nutrition Humaine, Clermont-Ferrand, France. ³Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Aix-Marseille Université, U2M, 13288 Marseille, France. ⁴INSERM, U1104, 13288 Marseille, France. ⁵CNRS, UMR 7280, 13288 Marseille, France. ⁶Institute for Research in Biomedicine - iBiMED and Aveiro Health Sciences Program, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal. ⁷Nutrition and Metabolism, South Australian Health & Medical Research Institute, PO Box 11060, Adelaide, SA5001, Australia. ⁸School of Biological Sciences, University of Adelaide, Australia. *These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.A. (email: julien.averous@clermont.inra.fr) or P.F. (email: pierre.fafournoux@clermont.inra.fr)

Recent years have seen important advances in the understanding of the regulation of mTORC1 by amino acids⁹. The current model involves the control of mTOR localization at the level of the lysosomal membrane by the Rags, a family of small GTPases^{10,11}. However, the lysosome is not the only location where mTORC1 can be activated^{12,13}. This illustrates that our understanding of the mechanisms involved in the sensing of amino acids remains incomplete. There is another level of complexity in the regulation of mTORC1 by amino acids regarding the effects of a starvation/stimulation of all amino acids or for a single amino acid. In particular, leucine has been the focus of many studies, as it is one of the most potent regulators of mTORC1 signaling¹⁴. The mechanisms involved in the regulation of mTORC1 by leucine or by other amino acids seem to be distinct; in particular, leucine can control mTORC1 activity without modifying the lysosomal localization of mTOR¹². In addition, it is evident that the mechanisms involved in the sensing of all the amino acids or leucine alone are, at least in part, distinct.

Beside its action on mTORC1 signaling, it is well established that leucine is a potent regulator of the kinase GCN2. The activation of GCN2 by amino acid starvation is mediated by the levels of uncharged tRNA; such tRNAs bind to and activate GCN2¹⁵. Previous work has established that GCN2 participates in the regulation of mTORC1 activity by leucine^{16,17}. These two studies observed that a diet devoid of leucine failed to inhibit mTORC1 activity in the liver of GCN2^{-/-} mice, whereas it did impair mTORC1 signaling in wild-type mice. This suggests that GCN2 acts upstream of mTORC1. In agreement with this hypothesis, an analogous result was observed in HepG2 cells knocked-down for GCN2 and starved for leucine for 24 hours¹⁶. It is conceivable that a transcriptional target of ATF4 mediates the inhibitory effect of GCN2 activation on mTORC1. Indeed, in contexts other than amino acid deprivation, such as endoplasmic reticulum stress or virus infection, two targets of ATF4, REDD1 and GADD34, are known to inhibit mTORC1 activity^{18,19}. However, since the inhibition of mTORC1 signaling by leucine deprivation is rapid¹², the contribution of such transcriptional mechanisms is questionable given the inherent delay between increased translation of ATF4, the rise in ATF4 protein levels and subsequent downstream transcription-dependent events.

This study aimed at investigating more deeply the contribution of GCN2 to the regulation of mTORC1 by leucine deprivation. Our data demonstrate that GCN2 is necessary for the early effect of leucine deprivation on mTORC1 signaling and that this operates independently of ongoing transcription. Furthermore, our data establish that the phosphorylation of eIF2 α is necessary but not sufficient for the inhibition of mTORC1 during leucine deprivation. Importantly, we show that the role of GCN2 in the inhibition of mTORC1 is not restricted to leucine deprivation, since the ability of arginine deprivation to inhibit mTORC1 also depends on GCN2.

Results

GCN2 is necessary for mTORC1 inhibition by leucine deprivation. To examine the role of GCN2 in the inhibition of mTORC1 activity we first performed a time-course of leucine deprivation in mouse embryonic fibroblasts (MEFs). By 30 min, leucine starvation increased the phosphorylation of eIF2 α (Fig. 1A) and also inhibited mTORC1 activity as shown by the decrease in the level of phosphorylation of its direct substrate S6 kinase 1 (S6K1). The effect of leucine deprivation on S6K1 phosphorylation was transient, a recovery of the phosphorylation being observed between 2 and 4 h of starvation. This phenomenon may reflect the fact that the induction of proteolysis, and notably autophagy, upon leucine deprivation may enhance the intracellular levels of the missing amino acid^{8,20}.

We then focused on the shorter times of starvation and explored the effect of the absence of the eIF2 α kinase GCN2 on the regulation of S6K1 phosphorylation. As expected, leucine deprivation failed to induce eIF2 α phosphorylation in GCN2^{-/-} MEFs (Fig. 1B). In contrast to the situation for the wild-type (WT) MEFs, we did not observe a consistent or significant decrease in S6K1 phosphorylation during leucine deprivation, at any time-point tested. This observation was confirmed by the study of the phosphorylation of 4E-BP1, the second well-known target of mTORC1 (Fig. S1). In the WT MEFs a decrease of the phosphorylation was observed after 30 and 60 minutes of leucine deprivation whereas no effect was observed in the GCN2^{-/-} MEFs. The level of mTOR phosphorylation at serine 2448 was also assessed. A moderate but significant decrease of the phosphorylation of this site was measured in the WT MEFs after 30 minutes of leucine deprivation. Consistently with the level of phosphorylation of S6K1 and 4E-BP1, no decrease of mTOR phosphorylation was observed in the GCN2^{-/-} MEFs following leucine deprivation. This result implies that GCN2 is necessary for the rapid inhibition of mTORC1 activity by leucine deprivation.

Since the mechanisms involved in the regulation of mTORC1 by leucine or by all amino acid appear to differ, we wanted to evaluate the role of GCN2 in the inhibition of mTORC1 during starvation of cells for all amino acids. The data in Fig. 1C show that this manipulation was still able to strongly decrease S6K1 phosphorylation in GCN2^{-/-} MEFs. This demonstrates that GCN2 is not required for the inhibitory effect of general amino acid starvation on mTORC1 signaling, in contrast to the situation of starvation for leucine alone. In order to assess the idea that GCN2 contributes to the rapid modulation of mTORC1 activity specifically by leucine, we took advantage of the ability of total amino acid deprivation to inhibit S6K1 phosphorylation in GCN2^{-/-} MEFs and tested the role of GCN2 in the re-activation of mTORC1 when amino acids are resupplied. Following a one-hour AA starvation (-AA), cells were resupplied for 15 min with all amino acids (+AA) or all amino acids without leucine (-Leu). In WT MEFs, medium lacking leucine was unable to stimulate mTORC1 activity, whereas in GCN2^{-/-} cells this medium did induce S6K1 phosphorylation indicating activation of mTORC1 (Fig. 1D). This result demonstrates that, in the absence of GCN2, leucine is dispensable for the activation of mTORC1 by the other amino acids. Taken together, these experiments demonstrate that GCN2 plays a central role in the regulation of mTORC1 activity by leucine and that this is distinct from the control of mTORC1 signaling by amino acids in general.

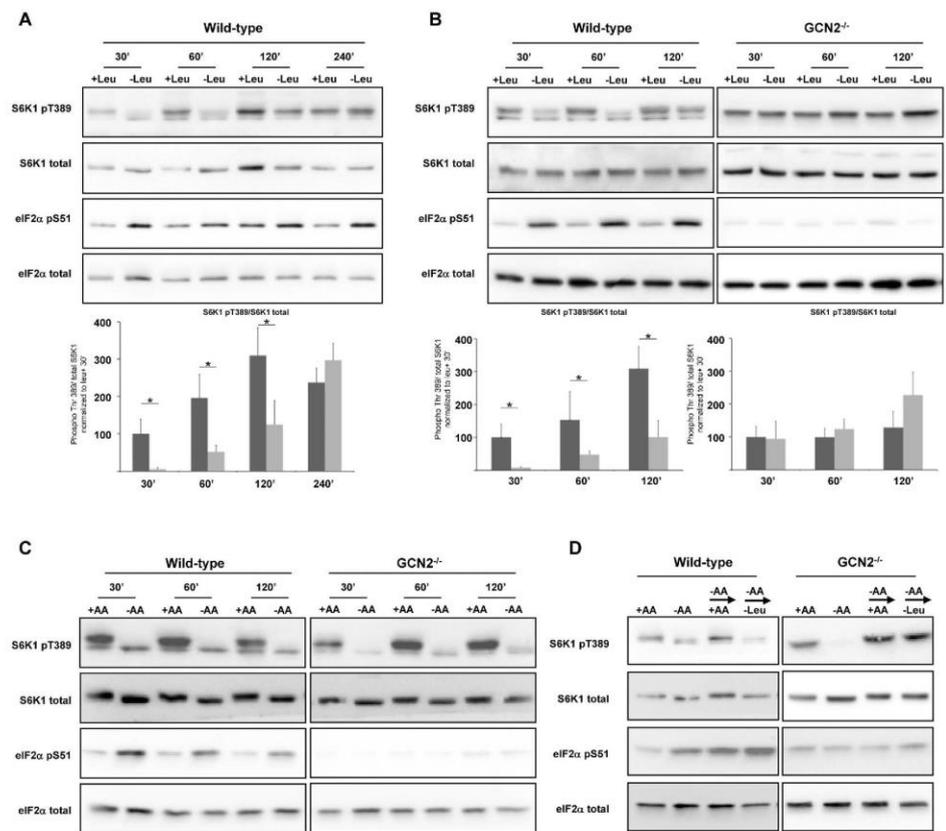


Figure 1. GCN2 is necessary for mTORC1 regulation by leucine. (A) Wild-Type (WT) MEFs were transferred to fresh medium containing dialysed serum and all amino acids except leucine, and then maintained in the presence or in absence of leucine (Leu) for the times indicated (minutes). Immunoblot analyses were performed on the resulting cell lysates using the indicated antibodies. The ratio of phosphorylated S6K1 (Thr389) to total S6K1 was determined by densitometry analysis, differences between control cells (dark bars) and leucine starved cells (light bars) at each time point were assessed by 1-way ANOVA. Bars with (*) are significantly different from each other ($P < 0.05$). (B) WT or GCN2-KO (−/−) MEFs were maintained in all amino acids including or excluding leucine (Leu) for the times indicated. The ratio of phosphorylated S6K1 (Thr389) to total S6K1 was determined by densitometry analysis, differences between control cells and leucine starved cells at each time point were assessed by 1-way ANOVA. Bars with (*) are significantly different from each other ($P < 0.05$). (C) WT or GCN2^{−/−} MEFs were cultured in presence or in absence of all amino acids (AA) for the times shown. (D) WT and GCN2^{−/−} MEFs were kept in the presence (+AA) or absence (−AA) of AA for 75 min; or in the absence of AA for 60 min prior to addition for 15 min of a medium containing all AA (−AA → +AA) or a medium containing all AA except leucine (−AA → −Leu). In all panels, immunoblot analyses were performed on the resulting cell lysates using the indicated antibodies.

ATF4 is not required for the short-term effect of leucine deprivation on mTORC1 signaling. The fact that GCN2 acts in the early events of the regulation of mTORC1 led us to assess the role of ATF4, a transcription factor whose expression is controlled by GCN2²¹, in this process. We investigated the effect of leucine starvation on mTORC1 activity in ATF4^{−/−} MEFs. As in the wild-type cells, inhibition of S6K1 phosphorylation was still seen at the earliest time of leucine starvation (Fig. 2A). The same observation was made for the level of phosphorylation of 4E-BP1 and mTOR (Fig. S1). It can be concluded that ATF4 is not involved in mTORC1 inhibition at early times of leucine starvation. We then performed the same type of experiment of starvation/stimulation as in Fig. 1D. No significant difference was observed between the WT and ATF4^{−/−} cells suggesting that ATF4 is not involved in maintaining mTORC1 inhibition at least in the context of short-term amino acid deprivation (Fig. 2B). Because ATF4 is not the only transcription factor, or protein, that is induced at the translational level by phosphorylation of eIF2 α , we also tested the effect of actinomycin D, a transcription inhibitor. This experiment demonstrated that ongoing transcriptional activity is not required for the inhibition of mTORC1 activity by leucine starvation (Fig. S2). These findings emphasize that GCN2 acts independently of ATF4 or any other transcriptional event to regulate mTORC1 signaling.

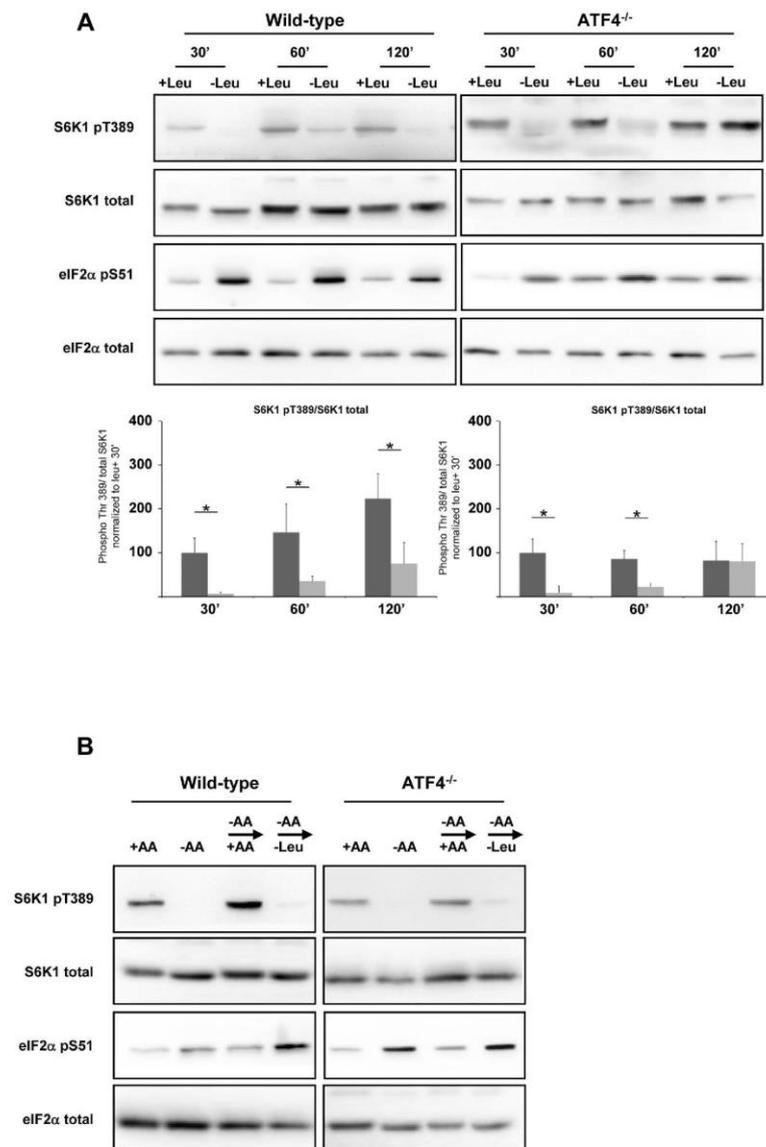


Figure 2. ATF4 is not involved at early times of mTORC1 regulation by leucine. (A) WT or GCN2^{-/-} MEFs were cultured in presence or in absence of leucine (Leu) with all the other AAs for 30 min, 60 min or 120 min. The ratio of phosphorylated S6K1 (Thr389) to total S6K1 was determined by densitometry analysis, differences between control cells (dark bars) and leucine starved cells (light bars) at each time point were assessed by 1-way ANOVA. Bars with (*) are significantly different from each other ($P < 0.05$). (B) WT MEFs and ATF4^{-/-} MEFs were cultured in the presence or absence of AA for 75 min; or in absence of AA for 60 min prior to addition for 15 min of a medium containing all AA (-AA → +AA) or a medium containing all AA except leucine (-AA → -Leu). In all panels, immunoblot analyses were performed on the resulting cell lysates using the indicated antibodies.

The phosphorylation of eIF2α is necessary but not sufficient to inhibit mTORC1 activity upon leucine deprivation. We then examined the role of eIF2α phosphorylation in the regulation of mTORC1 signaling by leucine. For this purpose, we used eIF2α^{S51A/S51A} MEFs in which eIF2α has been mutated at Ser51 and so cannot be phosphorylated. In this cell line, leucine starvation was unable to inhibit S6K1, 4E-BP1 and mTOR phosphorylation (Figs 3A and S1) whereas deprivation of all amino acids did still inhibit S6K1 phosphorylation (Fig. 3B). Furthermore, following the inhibition of mTORC1 activity by the withdrawal of amino acids, addition of medium lacking leucine was still able to induce the phosphorylation of S6K1 (Fig. 3B) in eIF2α^{S51A/S51A} MEFs,

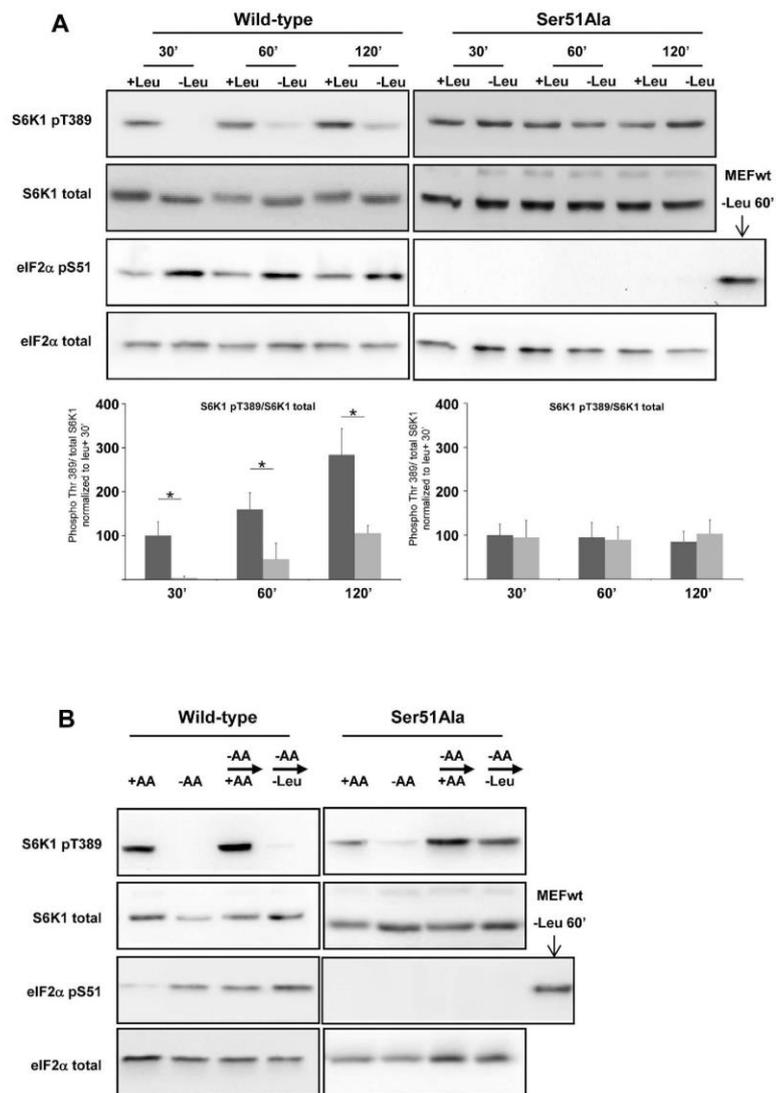


Figure 3. The phosphorylation of eIF2 α is necessary for the regulation of mTORC1 by leucine. (A) WT or eIF2 α [Ser51Ala] MEFs were maintained in presence or in absence of leucine (Leu) with all the other AAs for the times shown. A positive control has been included in the immunoblot analysis for the phosphorylated eIF2 α in the eIF2 α [Ser51Ala] MEFs. The ratio of phosphorylated S6K1 (Thr389) to total S6K1 was determined by densitometry analysis, differences between control cells (dark bars) and leucine starved cells (light bars) at each time point were assessed by 1-way ANOVA. Bars with (*) are significantly different from each other ($P < 0.05$). (B) WT or eIF2 α [Ser51Ala] MEFs were kept in the presence or absence of AA for 75 min (+AA); or in the absence of AA (-AA) for 60 min prior to addition for 15 min of a medium containing all AA (-AA \rightarrow +AA) or a medium containing all AA except leucine (-AA \rightarrow -Leu). A positive control has been included in the immunoblot analysis for the phosphorylated eIF2 α in the eIF2 α [Ser51Ala] MEFs. Immunoblot analyses were performed to measure the amounts of the indicated proteins and their levels of phosphorylation.

whereas this medium was unable to induce S6K1 phosphorylation in WT MEFs. We studied whether leucine deprivation induced activation of GCN2 in eIF2 α ^{S51A/S51A} MEFs; a significant increase in the phosphorylation of GCN2 at threonine 898 was observed in this cell line (Fig. S3). These results demonstrate that the phosphorylation of eIF2 α is a necessary event in the inhibition of mTORC1 by GCN2 activation upon starvation for leucine.

We subsequently investigated whether inducing the phosphorylation of eIF2 α was sufficient to inhibit mTORC1. We used tunicamycin to increase eIF2 α phosphorylation; this drug induces endoplasmic reticulum stress and the activation of a different eIF2 α kinase, PERK. As expected, this treatment increased the phosphorylation of eIF2 α , but also the phosphorylation of S6K1 (Fig. 4A). This could perhaps be explained by the fact that

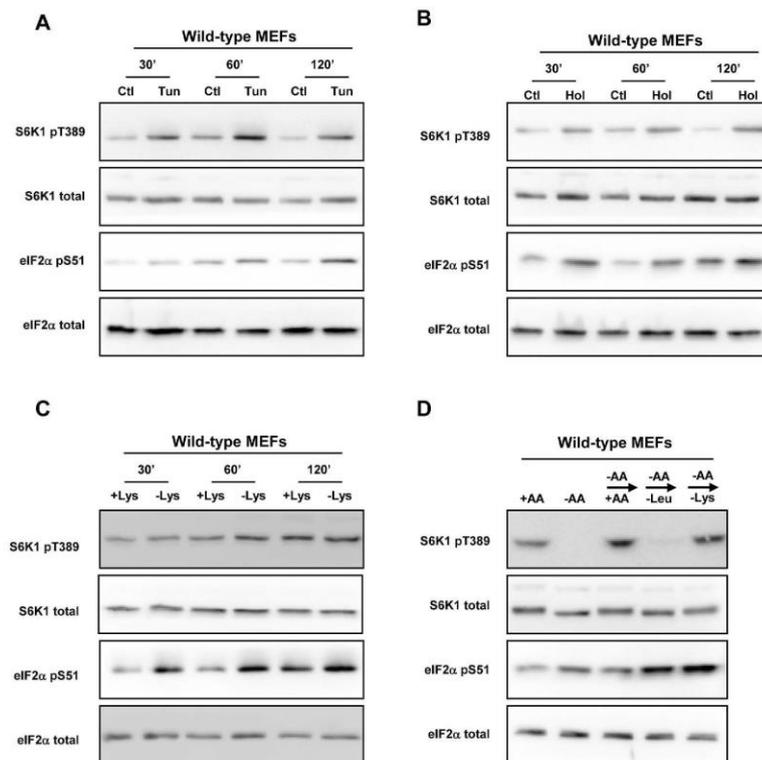


Figure 4. The phosphorylation of eIF2 α is not sufficient to inhibit mTORC1. (A) WT MEFs were treated without (Ctl) or with tunicamycin (Tun) for the times shown. (B) WT MEFs were treated without (Ctl) or with histidinol (Hol) for the times shown. (C) WT MEFs were cultured in the presence or in absence of lysine (Lys) with all the other AAs for the indicated times. (D) WT MEFs were cultured in the presence or absence of AA for 75 min (+AA); or in absence of AA for 60 min prior to addition for 15 min of a medium containing all AA (-AA \rightarrow +AA) or a medium containing all AA except leucine (-AA \rightarrow -Leu) or lysine (-AA \rightarrow -Lys). Immunoblot analyses were performed to measure the amounts of the indicated proteins and their levels of phosphorylation.

eIF2 α phosphorylation inhibits translation and so can evoke a transient rise in the intracellular levels of amino acids that in turn induces the activation of mTORC1. This phenomenon has been already observed with another protein synthesis inhibitor, cycloheximide²². These results demonstrate that the induction of eIF2 α phosphorylation by itself is not sufficient to inhibit mTORC1 activity.

The finding that the phosphorylation of eIF2 α is necessary but not sufficient to inhibit mTORC1 led us to postulate that the activation of GCN2 alone might be not sufficient. To test this hypothesis, cells were treated with histidinol, a structural analogue of histidine that inhibits the charging of the histidyl-tRNA²³ and in consequence activates GCN2. A induction of eIF2 α phosphorylation was observed in cells treated with histidinol (Fig. 4B). This was accompanied by an induction of the phosphorylation of S6K1, which might again be explained by a transient rise in the intracellular level of amino acids due to inhibition of protein synthesis (and thus of amino acid utilization)²². As hypothesized, activation of GCN2 by itself does not seem sufficient to inhibit mTORC1 activity. In order to confirm this, cells were starved for lysine, since lysine deprivation efficiently induces the GCN2/ATF4 pathway in MEFs²⁴ although there were no clear data concerning the effect of this condition on mTORC1 signaling. Indeed, despite the increase in eIF2 α phosphorylation induced by lysine deprivation, we did not observe any change in S6K1 phosphorylation (Fig. 4C). Moreover, following the inhibition of S6K1 phosphorylation by amino acid deprivation, medium lacking lysine induced S6K1 phosphorylation to the same extent as the complete medium (Fig. 4D). These results confirm that the activation of GCN2 does not necessarily result in mTORC1 inhibition, even though both GCN2 and phosphorylation of eIF2 α are required for inhibition of mTORC1. The corollary of this observation is that additional events controlled by leucine deprivation are required to inhibit mTORC1 activity.

GCN2 is also necessary for the inhibition of mTORC1 activity during arginine deprivation. We wondered whether the role of GCN2 was restricted only to leucine deprivation. Among amino acids, it is well known that arginine is also potent regulator of mTORC1 activity. Moreover, previous studies have demonstrated that arginine can control eIF2 α phosphorylation²⁵. We therefore tested the contribution of GCN2 to the

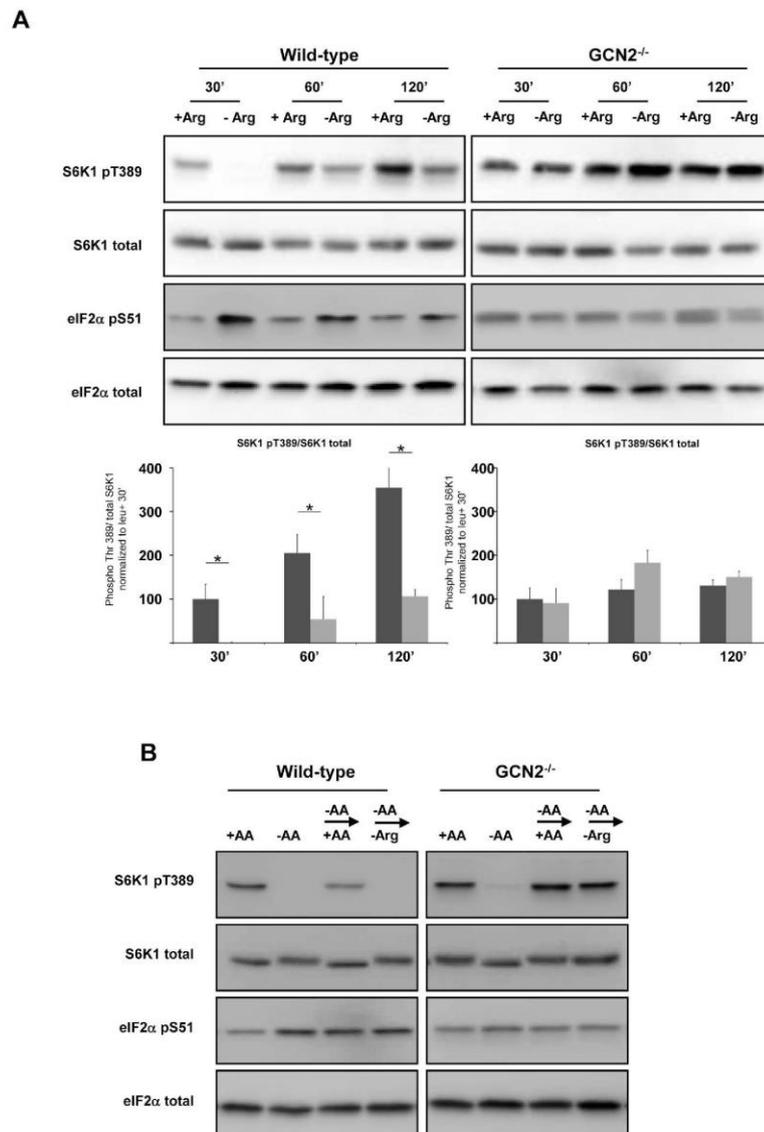


Figure 5. GCN2 is necessary for the regulation of mTORC1 by arginine. **(A)** WT or GCN2^{-/-} MEFs were cultured in presence or in absence of arginine (Arg) with all the other AAs for 30, 60 or 120 min. The ratio of phosphorylated S6K1 (Thr389) to total S6K1 was determined by densitometry analysis, differences between control cells (dark bars) and arginine starved cells (light bars) at each time point were assessed by 1-way ANOVA. Bars with (*) are significantly different from each other ($P < 0.05$). **(B)** WT MEFs and GCN2^{-/-} MEFs were cultured in the presence or absence of AA for 75 min; or in absence of AA for 60 min prior to addition for 15 min of a medium containing all AA (-AA → +AA) or a medium containing all AA except arginine (-AA → -Arg). Immunoblot analyses were performed to assess the amounts of the indicated proteins and their levels of phosphorylation.

regulation of mTORC1 by arginine. The data in Fig. 5A illustrate that, in WT MEFs, arginine deprivation induces eIF2α phosphorylation and decreases S6K1 phosphorylation. In contrast, in GCN2^{-/-} cells, the regulation of S6K1 phosphorylation by arginine was abolished. The same observation was made for 4E-BP1 and mTOR phosphorylation (Fig. S4). Then, the experimental model of starvation/stimulation was used. Following amino acid deprivation, the addition of a medium containing all amino acids except arginine was unable to induce S6K1 phosphorylation in WT MEFs, whereas this same medium efficiently induced the phosphorylation of S6K1 in GCN2^{-/-} MEFs (Fig. 5B). All these data demonstrate that GCN2 is also necessary for the regulation of mTORC1 by arginine and thus that the role of GCN2 in the control of mTORC1 is not restricted to leucine deprivation.

Discussion

Our study reinforces the conclusion that regulation of mTORC1 by amino acids is complicated and is not limited to a single mechanism²⁶. This is underscored by the fact that the regulation of mTORC1 by all amino acids differs from its control by individual amino acids such as leucine. The present study demonstrates that GCN2 plays an indispensable role in the inhibition of mTORC1 activity in response to leucine or arginine deprivation in mouse embryonic fibroblasts. However, our study also shows that activation of GCN2 is not itself sufficient to inhibit mTORC1. The observation that lysine deprivation over a short time period did not inhibit mTORC1 whereas it did induce GCN2 activation clearly illustrates this. It remains puzzling, in terms of biological significance, that deprivation for some amino acids induces GCN2 activation and inhibits mTORC1 whereas starvation for others only activates GCN2. It is very important to bear in mind that the ability of a given amino acid to control mTORC1 may differ according to the cell type. This illustrates the challenges of understanding the regulation of mTORC1 by single amino acids. Understanding this evident complexity is made harder by the fact that various different protocols have been used to study this regulation, e.g., cells maintained in the presence or absence of serum, or studying the effect of an amino acid in the presence or in the absence of other amino acids. These aspects might well be confounding when the results of different studies are evaluated.

One major finding of our study is that GCN2 acts in the early stages of mTORC1 inhibition independently of ATF4 or ongoing transcription. Thus, while one might speculate that transcriptional targets of ATF4 such as REDD1¹⁸ could be involved in the inhibition of mTORC1 under such conditions, our results clearly demonstrate that GCN2 contributes to the early stages of mTORC1 inhibition in the absence of ATF4 and even of ongoing transcriptional activity. Importantly, our data do not contradict the possibility that the ATF4 target genes may contribute to maintaining mTORC1 inhibition upon prolonged leucine deprivation. Indeed, a faster recovery of S6K1 phosphorylation seems to occur in ATF4^{-/-} MEFs after 2 h of leucine deprivation (Fig. 2A). In the context of serum deprivation, it has been demonstrated that REDD1 sustains the repression of mTORC1 but is not responsible for the initial inhibition¹⁸.

According to our results obtained with eIF2 α ^{S51A/S51A} MEFs, the phosphorylation of eIF2 α is necessary for the inhibition of mTORC1 signaling in amino acid-deprived cells. However, given that lack of need for ATF4, which can be translationally upregulated following eIF2 α phosphorylation, the mechanism by which phosphorylation of eIF2 α controls mTORC1 remains to be identified. The phosphorylation of eIF2 α inhibits the guanine nucleotide-exchange activity of eIF2B; consequently, eIF2 remains in its inactive GDP-bound form and the formation of the 43S ribosomal preinitiation complex is abolished²⁷. Holtz *et al.*²⁸ have described that mTOR interacts with a multisubunit translation factor, eIF3, to regulate the formation of the preinitiation complex. Thus, the inhibition of the formation of the 43S preinitiation complex by eIF2 α phosphorylation could impact on the localization of mTORC1 and thus on its regulation. Interestingly, a study which was published while we were finalizing our manuscript²⁹, emphasizes the importance of the translation pre-initiation complex, in particularly eIF4A, in the regulation of mTORC1 activity.

The fact that GCN2 activation is necessary but not sufficient to inhibit mTORC1 signaling indicates the existence of additional mechanisms invoked by leucine or arginine deprivation^{30,31}. Concerning arginine, the recent study by Wang *et al.*³⁰ demonstrated that the amino acid transporter SLC38A9 is responsible for the regulation of mTORC1 specifically by arginine. This transporter is located at the lysosomal membrane and interacts with the Ragulator complex and the Rag proteins. Several mechanisms have been proposed to explain the regulation of mTORC1 by leucine, all of which are thought to rely upon the regulation of the Rag proteins and the localization of mTORC1 at the lysosome^{32,33}. Finally, while we were finalizing our study, Wolfson *et al.*³⁴ established that Sestrin2 (*sesn2*), an inhibitor of mTORC1 activity, is a sensor of leucine availability and that its presence is necessary for mTORC1 regulation by leucine availability. Even more recently, Ye *et al.*³⁵ demonstrated that *sesn2* is a target gene of the GCN2/ATF4 pathway and that its transcriptional activation is required to sustain mTORC1 inhibition upon leucine deprivation. The authors also showed that *sesn2* is needed for signaling the inhibition of mTORC1 upon long-term deprivation (24 h) of other amino acids such as arginine. Given that Wolfson *et al.*³⁴ demonstrated that Sestrin2 does not bind arginine, it will be important to determine how the increase of the expression of Sestrin2 contributes to the inhibitory effect of 24 h arginine deprivation.

It remains difficult to establish a unifying model that integrates the available data concerning the roles of GCN2 and Sestrin2 in the regulation of mTORC1 by individual amino acids. Concerning the setting of leucine deprivation, Sestrin2 appears to be a crucial regulator of mTORC1 activity through its ability to bind leucine³⁴. In addition, it is clear that GCN2 and ATF4 contribute to the regulation of mTORC1 by Sestrin2 through the induction of its expression during leucine deprivation³⁵. Nevertheless, as discussed above, GCN2 provides an additional input to mTORC1 signaling that does not require ATF4 expression or, therefore, the induction of *sesn2*. This interpretation is reinforced by the fact that GCN2 is also necessary for inhibition of mTORC1 upon short-term arginine deprivation whereas Sestrin2 does not appear to be directly involved in sensing arginine or the effects of arginine on mTORC1 signaling³⁴.

The present study establishes that, in the context of mTORC1 regulation, GCN2 is a crucial sensor, probably of the cytoplasmic levels of leucine and arginine, which, among the amino acids, are the most potent regulators of mTORC1³⁶. Our results complement the recent advances in the understanding of the mechanisms involved in sensing these two amino acids. However, it remains unresolved how GCN2, independently of ATF4, cooperates with sensing systems involving Sestrin2 and SLC38A9. It should be borne in mind that the relative contributions of these inputs may differ according to the cell type and/or the model of amino acid deprivation/stimulation. It will be important to determine if the role of GCN2 during leucine or arginine deprivation is related to the control of mTORC1 at the level of lysosome, since the ability of mTOR to interact with the lysosome also appears to be crucial for mTORC1 inhibition by amino acid starvation^{12,37}. Indeed, we previously observed a strong attenuation of the inhibitory effect of leucine deprivation on mTORC1 signaling in cells knocked down for RagC/D¹². In addition, Ye *et al.*³⁵ observed that leucine deprivation was less efficient in decreasing S6K1 phosphorylation

in RagA/B-KO cells. A corollary of these experiments is the likely existence of Rag-independent inputs to the control of mTORC1. It is conceivable that GCN2 activation contributes to the regulation of mTORC1 in another cellular compartment such as the Golgi apparatus¹³.

Our findings add significantly to the body of information on the control of mTORC1 by showing that GCN2 and the phosphorylation of its substrate eIF2 α are important for the control of mTORC1 by leucine, but that this can occur independently of the best-known target of the GCN2/eIF2 pathway, the transcription factor ATF4.

Materials and Methods

Reagents. Antibodies against S6K1 (#9202), S6K phosphorylated at Thr-389 (#9205), eIF2 α (#9722) were from Cell Signaling Technology, antibody against eIF2 α phosphorylated at Ser-51 (ab32157) was from Abcam. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12 Ham's DMEM/F12 used for leucine deprived medium were from Sigma. DMEM without amino acids was from Genaxxon. DMEM used for arginine deprived medium was from ThermoFisher Scientific. Fetal bovine serum (FBS) was from Gibco and had been dialysed (using a membrane with a cut-off of 3500 Da) against phosphate-buffered saline (PBS) (pH: 7.4) at 4 °C. MEFs deficient in GCN2²¹ and ATF4³⁸ were kindly donated by Prof. D. Ron (Institute of Metabolic Science, Cambridge, UK), eIF2 α ^{S51A/S51A}³⁹ MEFs were kindly provided by Dr R. J. Kaufman (La Jolla, California, University of Michigan, USA). Actinomycin D, tunicamycin and histidinol were from Sigma.

Cell culture and treatments. Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were grown in high glucose (4.5 g/liter) DMEM with 10% (v/v) FBS, 2 mM L-glutamine, mixture of MEM Non-essential Amino Acids (Invitrogen), 100 units/ml streptomycin sulfate, and 100 units/ml penicillin G, at 37 °C with 5% (v/v) CO₂. For amino acid starvation experiments, cells were grown in DMEM containing high glucose and lacking all amino acids in the presence or absence of 10% (v/v) dialysed FBS. Cells were washed twice with PBS before starvation. The amino acid stimulation was performed by changing the 'starved' medium for complete DMEM medium in the presence or absence of 10% dialysed FBS. For leucine starvation, cells were grown in DMEM/F12 lacking leucine in the presence or absence of 10% dialysed FBS. Cells were rinsed twice with PBS before starvation. Leucine stimulation was performed by adding leucine at a final concentration of 450 μ M to the leucine-free medium. All the experiments were repeated at least three times, and those using siRNA were repeated at least five times.

Protein analysis. For protein extraction, lysis was performed with our standard lysis buffer (50 mM Tris, 25 mM β -glycerophosphate, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5% (v/v) Triton X100, 1 mM DTT, 1 mM benzamidine, protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma)). SDS-PAGE was performed as previously described¹². The total protein concentrations were determined using a standard Bradford protein assay. Proteins were transferred onto PVDF membrane which was then blocked in Tris-Buffered Saline (TBS) containing 0.1% Tween20 and 5% (w/v) non-fat dry milk powder for 1 h at room temperature. The membrane was incubated with primary antibody overnight at 4 °C in TBS; 0.1% Tween20, 5% (w/v) non-fat dry milk or 5% (w/v) bovine serum albumin (BSA). Antibodies were diluted according to the manufacturer's instructions. Membranes were washed 4 times for 5 min in TBS, 0.1% Tween20. Secondary antibodies coupled to HRP, diluted at 1/5000 in TBS, 0.1% Tween20, 5% (w/v) non-fat dried milk, was incubated at room temperature for 1 h. Membranes were washed 4 times for 5 min in TBS, 0.1% Tween20. A final wash of 5 min was performed in TBS. Luminata western HRP substrate (Millipore) and a chemiluminescence imager (G:box, Syngene) were used to detect the signals.

Statistical analyses. All data are expressed as means \pm SEM. Differences between sample of a same time of treatment and same genotype were assessed by one-way ANOVA (fisher test). Significance was defined at the 0.05 level.

References

- Kim, D.-H. *et al.* mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* **110**, 163–175 (2002).
- Burnett, P. E., Barrow, R. K., Cohen, N. A., Snyder, S. H. & Sabatini, D. M. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1432–1437 (1998).
- Hara, K. *et al.* Amino Acid Sufficiency and mTOR Regulate p70 S6 Kinase and eIF-4E BP1 through a Common Effector Mechanism. *J. Biol. Chem.* **273**, 14484–14494 (1998).
- Berlanga, J. J., Santoyo, J. & de Haro, C. Characterization of a mammalian homolog of the GCN2 eukaryotic initiation factor 2 α kinase. *Eur. J. Biochem.* **265**, 754–762 (1999).
- Vattem, K. M. & Wek, R. C. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 11269–74 (2004).
- Lopez, A. B. *et al.* A feedback transcriptional mechanism controls the level of the arginine/lysine transporter cat-1 during amino acid starvation. *Biochem. J.* **402**, 163–173 (2007).
- Siu, F., Bain, P. J., LeBlanc-Chaffin, R., Chen, H. & Kilberg, M. S. ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. *J Biol Chem* **277**, 24120–7 (2002).
- B'Chir, W. *et al.* The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res* **41**, 7683–99 (2013).
- Ham, D. J., Lynch, G. S. & Koopman, R. Amino acid sensing and activation of mechanistic target of rapamycin complex 1: implications for skeletal muscle. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **19**, 67–73 (2016).
- Sancak, Y. *et al.* The Rag GTPases Bind Raptor and Mediate Amino Acid Signaling to mTORC1. *Science* **320**, 1496–1501 (2008).
- Sancak, Y. *et al.* Ragulator-Rag Complex Targets mTORC1 to the Lysosomal Surface and is Necessary for its Activation by Amino Acids. *Cell* **141**, 290–303 (2010).
- Averous, J. *et al.* Requirement for lysosomal localization of mTOR for its activation differs between leucine and other amino acids. *Cell. Signal.* **26**, 1918–1927 (2014).
- Thomas, J. D. *et al.* Rab1A is an mTORC1 Activator and a Colorectal Oncogene. *Cancer Cell* **26**, 754–769 (2014).

14. Fox, H. L., Kimball, S. R., Jefferson, L. S. & Lynch, C. J. Amino acids stimulate phosphorylation of p70S6k and organization of rat adipocytes into multicellular clusters. *Am J Physiol* **274**, C206–13 (1998).
15. Dong, J., Qiu, H., Garcia-Barrio, M., Anderson, J. & Hinnebusch, A. G. Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Mol Cell* **6**, 269–79 (2000).
16. Xiao, F. *et al.* Leucine Deprivation Increases Hepatic Insulin Sensitivity via GCN2/mTOR/S6K1 and AMPK Pathways. *Diabetes* **60**, 746–756 (2011).
17. Anthony, T. G. *et al.* Preservation of Liver Protein Synthesis during Dietary Leucine Deprivation Occurs at the Expense of Skeletal Muscle Mass in Mice Deleted for eIF2 Kinase GCN2. *J. Biol. Chem.* **279**, 36553–36561 (2004).
18. Dennis, M. D., McGhee, N. K., Jefferson, L. S. & Kimball, S. R. Regulated in DNA damage and development 1 (REDD1) promotes cell survival during serum deprivation by sustaining repression of signaling through the mechanistic target of rapamycin in complex 1 (mTORC1). *Cell. Signal* **25**, 2709–2716 (2013).
19. Minami, K. *et al.* Suppression of viral replication by stress-inducible GADD34 protein via the mammalian serine/threonine protein kinase mTOR pathway. *J. Virol.* **81**, 11106–11115 (2007).
20. Mordier, S., Deval, C., Bechet, D., Tassa, A. & Ferrara, M. Leucine limitation induces autophagy and activation of lysosome-dependent proteolysis in C2C12 myotubes through a mammalian target of rapamycin-independent signaling pathway. *J Biol Chem* **275**, 29900–6 (2000).
21. Harding, H. P. *et al.* Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* **6**, 1099–108. (2000).
22. Beugnet, A., Tee, A. R., Taylor, P. M. & Proud, C. G. Regulation of targets of mTOR (mammalian target of rapamycin) signalling by intracellular amino acid availability. *Biochem. J.* **372**, 555–566 (2003).
23. Hansen, B. S., Vaughan, M. H. & Wang, L. Reversible inhibition by histidinol of protein synthesis in human cells at the activation of histidine. *J. Biol. Chem.* **247**, 3854–3857 (1972).
24. Chaveroux, C. *et al.* Identification of a novel amino acid response pathway triggering ATF2 phosphorylation in mammals. *Mol Cell Biol* **29**, 6515–26 (2009).
25. Lee, J., Ryu, H., Ferrante, R. J., Morris, S. M. & Ratan, R. R. Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 4843–4848 (2003).
26. Shimobayashi, M. & Hall, M. N. Multiple amino acid sensing inputs to mTORC1. *Cell Res.* **26**, 7–20 (2016).
27. Sokabe, M. & Fraser, C. S. Human Eukaryotic Initiation Factor 2 (eIF2)-GTP-Met-tRNAⁱ Ternary Complex and eIF3 Stabilize the 43 S Preinitiation Complex. *J. Biol. Chem.* **289**, 31827–31836 (2014).
28. Holz, M. K., Ballif, B. A., Gygi, S. P. & Blenis, J. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* **123**, 569–580 (2005).
29. Tsokanos, F.-E. *et al.* eIF4A inactivates TORC1 in response to amino acid starvation. *EMBO J.* n/a–n/a. doi: 10.15252/embj.201593118 (2016).
30. Wang, S. *et al.* Lysosomal amino acid transporter SLC38A9 signals arginine sufficiency to mTORC1. *Science* **347**, 188–194 (2015).
31. Rebsamen, M. *et al.* SLC38A9 is a component of the lysosomal amino acid-sensing machinery that controls mTORC1. *Nature* **519**, 477–481 (2015).
32. Han, J. M. *et al.* Leucyl-tRNA Synthetase is an Intracellular Leucine Sensor for the mTORC1-Signaling Pathway. *Cell* **149**, 410–424 (2012).
33. Durán, R. V. *et al.* Glutaminolysis Activates Rag-mTORC1 Signaling. *Mol. Cell* **47**, 349–358 (2012).
34. Wolfson, R. L. *et al.* Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway. *Science* **351**, 43–48 (2016).
35. Ye, J. *et al.* GCN2 sustains mTORC1 suppression upon amino acid deprivation by inducing Sestrin2. *Genes Dev.* **29**, 2331–2336 (2015).
36. Hara, K. *et al.* Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J Biol Chem* **273**, 14484–94 (1998).
37. Demetriades, C., Doumpas, N. & Teleman, A. A. Regulation of TORC1 in Response to Amino Acid Starvation via Lysosomal Recruitment of TSC2. *Cell* **156**, 786–799 (2014).
38. Harding, H. P. *et al.* An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* **11**, 619–633 (2003).
39. Scheuner, D. *et al.* Translational Control is Required for the Unfolded Protein Response and *In Vivo* Glucose Homeostasis. *Mol. Cell* **7**, 1165–1176 (2001).

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and from Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer, PP is supported by the Ilídio Pinho foundation.

Author Contributions

J.A. and S.L.-L. designed the experiments. J.A., S.L.-L., V.C., F.M. and L.P. performed the experiments. J.A., S.L.-L., C.G.P. and P.F. interpreted the data. J.A., C.G.P. and P.F. wrote the manuscript. A.B., A.-C.M., P.P. and C.J. gave technical support, conceptual advice and reviewed the paper.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Averous, J. *et al.* GCN2 contributes to mTORC1 inhibition by leucine deprivation through an ATF4 independent mechanism. *Sci. Rep.* **6**, 27698; doi: 10.1038/srep27698 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Publication non présentée

Cédric Chaveroux¹, Alain Bruhat¹, Valérie Carraro¹, Céline Jousse¹, Julien Averous¹, Anne-Catherine Maurin¹, Laurent Parry¹, **Florent Mesclon**, Yuki Muranishi¹, Pierre Cordelier², Aline Meulle², Patrick Baril³, Anh Do Thi⁴, Philippe Ravassard⁴, Jacques Mallet^{4,5} & Pierre Fafournoux^{1,3}

“Regulating the expression of therapeutic transgenes by controlled intake of dietary essential amino acids”

Nature Biotechnology July 2016

Regulating the expression of therapeutic transgenes by controlled intake of dietary essential amino acids

Cédric Chaveroux¹, Alain Bruhat¹, Valérie Carraro¹, Céline Jousse¹, Julien Averous¹, Anne-Catherine Maurin¹, Laurent Parry¹, Florent Mesclon¹, Yuki Muranishi¹, Pierre Cordelier², Aline Meulle², Patrick Baril³, Anh Do Thi⁴, Philippe Ravassard⁴, Jacques Mallet^{4,5} & Pierre Fafournoux^{1,3}

Widespread application of gene therapy will depend on the development of simple methods to regulate the expression of therapeutic genes. Here we harness an endogenous signaling pathway to regulate therapeutic gene expression through diet. The GCN2-eIF2 α signaling pathway is specifically activated by deficiencies in any essential amino acid (EAA); EAA deficiency leads to rapid expression of genes regulated by ATF4-binding *cis* elements. We found that therapeutic genes under the control of optimized amino acid response elements (AAREs) had low basal expression and high induced expression. We applied our system to regulate the expression of *TNFSF10* (*TRAIL*) in the context of glioma therapy and found that intermittent activation of this gene by EAA-deficient meals retained its therapeutic efficacy while abrogating its toxic effects on normal tissue. The GCN2-eIF2 α pathway is expressed in many tissues, including the brain, and is highly specific to EAA deficiency. Our system may be particularly well suited for intermittent regulation of therapeutic transgenes over short or long time periods.

Recent technological improvements in gene transfer vectors and the development of adequate gene delivery systems have led to substantial clinical successes in gene therapy¹. However, several barriers must be overcome before gene therapy becomes a widely accepted treatment for a broad range of diseases^{1–4}. Beside safety concerns with respect to available vector systems (e.g., genotoxicity and immune response), the major limitation is our current inability to exogenously modulate the expression of transgenes in a simple and safe manner. Ideally, gene expression should be regulated in a dose-dependent way by an orally available well-tolerated inducer, and both induction and repression of the gene expression should be reversible.

After consumption of a diet deficient in one EAA, the blood concentration of the limiting EAA decreases rapidly and greatly, triggering an ubiquitous adaptive process referred to as the amino-acid response pathway^{5–7}. The initial step of this pathway is the activation of the mammalian GCN2 protein kinase by uncharged tRNAs. GCN2 then phosphorylates the α subunit of eukaryotic initiation factor 2 (eIF2 α) on serine 51, leading to upregulation of the translation of the activating transcription factor 4 (ATF4)^{8–10}. Once induced, ATF4 activates transcription of specific target genes through binding to the AARE^{11–12}. The GCN2-eIF2 α -ATF4 pathway can be rapidly turned off by the administration of the missing EAA¹³.

Here we show that the amino-acid response pathway can be harnessed as a regulatory system for gene therapy. This system, based on dietary starvation of specific amino acids, does not require the expression of synthetic transcription factors or regulatory proteins,

or the administration of pharmacological inducers. It is physiological, nontoxic and amenable to clinical application.

RESULTS

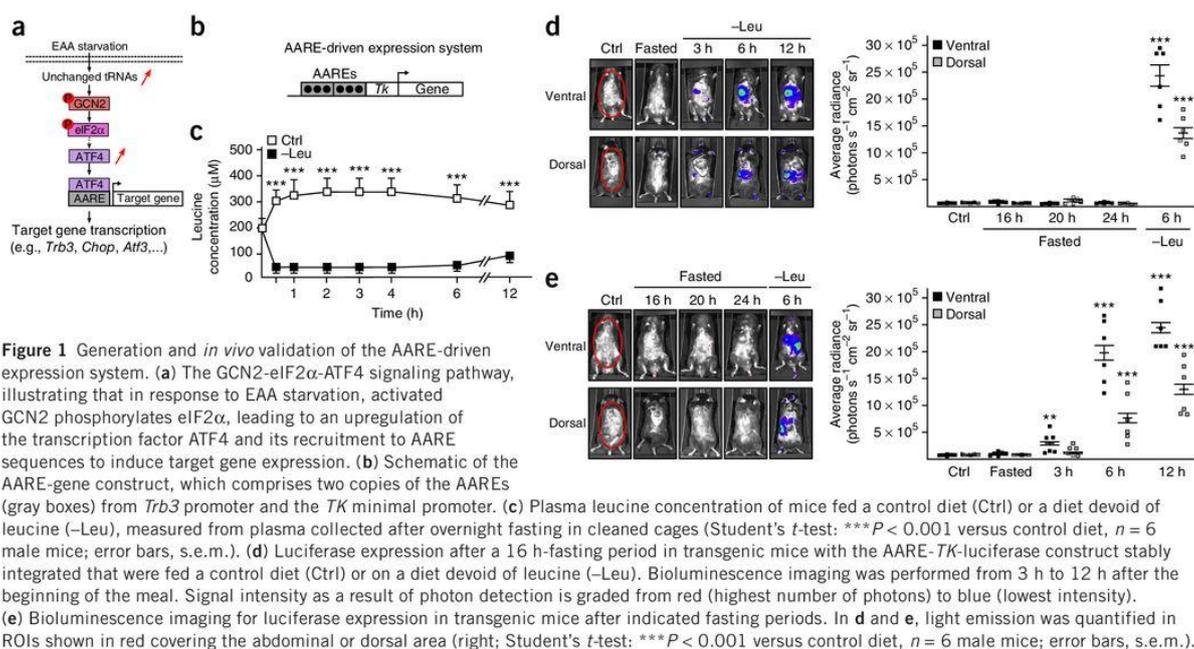
Optimization of the AARE-driven expression system

Based on our previous results⁶, we developed gene expression system controlled by EAA availability. As reported, the expression of *Trb3*, *Chop* and *Atf3* is upregulated after activation of the GCN2-eIF2 α -ATF4 pathway and by recruitment of ATF4 to specific AAREs to induce their expression (Fig. 1a). We tested, in transfected mouse embryonic fibroblasts (MEFs), different combinations of these AAREs fused with two minimal promoters (thymidine kinase and β -globin), using luciferase as a reporter gene (Supplementary Fig. 1a). We obtained the highest responsiveness with a low background level with two copies of the *Trb3* AARE associated with the human thymidine kinase *TK1* (here referred to as *TK*) promoter, yielding a sixfold induction in response to leucine starvation (Supplementary Fig. 1b,c). Thus, all further experiments were carried out with two *Trb3* AARE associated with the *TK* minimal promoter. We designated this construct the AARE-driven expression system (Fig. 1b). Finally, we validated the maintenance of the inducibility of this construct by amino acid starvation, when stably integrated in mouse (MEF) or human (HeLa) cells (Supplementary Fig. 1d).

Other than by GCN2, eIF2 α can be phosphorylated in mammalian tissues by three other kinases: PKR (activated by dsRNA and cytokines), PERK (activated by endoplasmic reticulum stress) or

¹Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UMR-1019 Nutrition Humaine, Genes-Nutrients team, Centre de Clermont-Theix, Université Clermont-Ferrand 1, 63122 Saint Genès Champanelle, France. ²CRCT, Université de Toulouse, Inserm, UPS, Toulouse, France. ³Centre de Biophysique Moléculaire, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UPR4301, Université d'Orléans and Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), Orléans, France. ⁴CNRS UMR7225, INSERM U1127, Université Pierre et Marie Curie, Institut du Cerveau et de la Moelle (ICM), Biotechnology and Biotherapy Team, Paris, France. ⁵Department of Neurological Surgery, University of California San Francisco, San Francisco, California, USA. Correspondence should be addressed to P.F. (pierre.fafournoux@clermont.inra.fr).

Received 22 June 2015; accepted 20 April 2016; published online 6 June 2016; doi:10.1038/nbt.3852



HRI (activated by heme deficiency)¹⁴. HRI is expressed in an erythroid-cell-specific manner¹⁵; so we focused our attention on the role of the ubiquitously expressed kinases GCN2, PKR and PERK. We have previously shown that AARE-driven transgenes are activated by inducers of eIF2 α phosphorylation¹⁶. In response to leucine starvation, luciferase induction was completely abolished in *Eif2ak4*^{-/-} (here referred to as *GCN2*^{-/-}) cells, whereas we observed no effect in *Eif2ak3*^{-/-} (*PERK*^{-/-}) and *Eif2ak2*^{-/-} (*PKR*^{-/-}) cells, demonstrating that transgene regulation was strictly dependent on GCN2 expression (Supplementary Fig. 2a).

Next, we tested *in vitro* induction of luciferase expression with respect to the concentration of leucine. Leucine concentration that triggered activation of transcription (Supplementary Fig. 2b) was similar to that obtained in mammals after consumption of a leucine-deficient diet⁵, suggesting that it may also be equally efficient *in vivo*.

Considering that organisms rapidly absorb dietary free amino acids, we optimized a synthetic diet in which the protein fraction is replaced by a mixture of free amino acids (Supplementary Table 1). In this condition, when the diet is lacking one EAA, the amount of that EAA in the blood should rapidly decrease. To translate the concept of this gene regulation system to animals, we first tested the effect of a leucine-deficient diet on post-prandial blood leucine content. Leucinemia dramatically decreased as early as 30 min after consumption of a leucine-devoid diet (Fig. 1c).

We next proceeded to *in vivo* validation of the AARE-driven expression system by taking advantage of an AARE-driven luciferase mouse model previously engineered in our laboratory¹⁶. Consumption of a leucine-free diet resulted in a significant increase in bioluminescence in the abdominal cavity as soon as 3 h and was maintained for at least 12 h (Fig. 1d). A fasting period of 16–24 h had no effect on transgene expression (Fig. 1e). Previous work from our laboratory showed that the GCN2-eIF2 α -ATF4 pathway is activated *in vivo* 1 h after consumption of a leucine-devoid diet¹³. The delay before we could obtain measurable bioluminescence was due to the necessity to

accumulate enough luciferase. As anticipated from our *in vitro* results, this experiment provided a clear indication that the AARE-driven expression system functions *in vivo* as well.

Nutritional induction of the AARE-driven expression system

In mammals, nine EAAs must be supplied in the diet, and a lack of any one of them represents a potential inducer of the AARE-driven expression system. We compared the effect of diets independently depleted of each of the nine EAAs on AARE-driven luciferase expression. We first ascertained that the blood concentration of the lacking EAA dropped substantially after consumption of the diet. The extent of the decrease varied from one amino acid to another (Supplementary Fig. 3). We measured the induction ratio of luciferase activity in AARE-driven luciferase mice by *in vivo* bioluminescence imaging 6 h after switching mice to the specific diet (Fig. 2a). The induction ratio varied from 5 to over 50 in the case of isoleucine or tryptophan starvation. As expected, we observed no luciferase induction in fasted mice or in mice fed a diet deprived of a nonessential amino acid such as alanine. These results highlight the flexibility of the AARE-driven expression system, in which each individual EAA can act as a potential inducer.

A nutrition-based protocol for long-term transgene expression

Gene therapy may require long-term expression of the transgene. Considering that long-term EAA deprivation is not physiologically feasible, we tested the ability of maintaining long-term expression of the transgene by taking advantage of the flexibility the AARE-driven expression system. To that end, we performed pulses of amino acid-deprived diet, swapping each of the lacking EAA. We subjected mice with AARE-driven luciferase to a nutritional cycle including a fasting period, a feeding period on an EAA-deficient diet and a recovery period with a control diet for 6 d (Fig. 2b). The quantification of bioluminescence clearly showed that transgene expression returned to a near-basal level 24 h after the dietary challenges. Re-induction followed similar kinetics with maximal levels depending on the lacking amino acid.

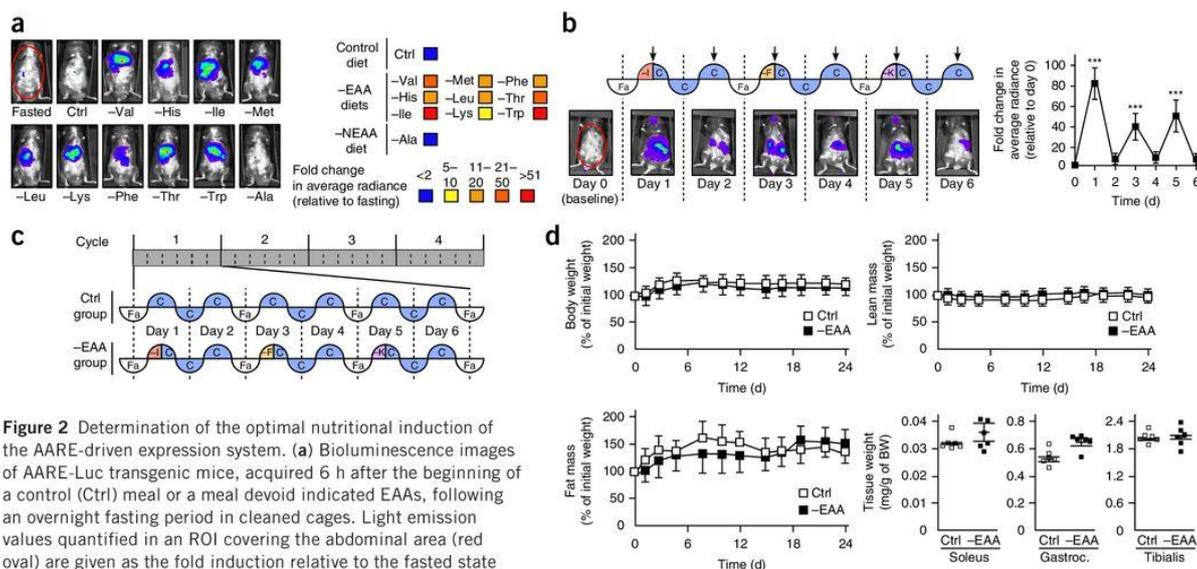


Figure 2 Determination of the optimal nutritional induction of the AARE-driven expression system. **(a)** Bioluminescence images of AARE-Luc transgenic mice, acquired 6 h after the beginning of a control (Ctrl) meal or a meal devoid indicated EAAs, following an overnight fasting period in cleaned cages. Light emission values quantified in an ROI covering the abdominal area (red oval) are given as the fold induction relative to the fasted state (right). Signal intensity as a result of photon detection is graded as indicated in the legend. **(b)** Nutritional protocol (top) for pulses of diets with swapping of the lacking amino acid (isoleucine, phenylalanine or lysine). AARE-Luc transgenic mice were subjected to three starvation sequences each including sequentially: a 12-h fast (Fa), a 6-h feeding period on an EAA-deficient diet (-I, -F or -K) and a 30-h recovery period with a control diet (C). A quarter circle represents 6 h. Black arrows indicate acquisition of bioluminescence images. Signal intensity as a result of photon detection is graded from red (highest number of photons) to blue (lowest intensity). Light emission was quantified in ROIs marked by red ovals covering the abdominal area, and bioluminescence fold induction is shown (right; Student's *t*-test: $***P < 0.001$ versus day 0, $n = 6$ male mice; error bars, s.e.m.). **(c)** Nutritional protocol, as in **b**, for a 24-d use of the AARE-driven expression system, showing that the 6-d is repeated four times (-EAA and control group). **(d)** Body weight, lean mass, fat mass, and total weight of soleus, gastrocnemius and tibialis muscles (collected from mice at the end of the experiment) for Ctrl and -EAA groups subjected to the nutritional protocols in **c**. Data are expressed in percent of control group. No significant difference (Student's *t*-test) was observed between the two groups. Error bars, s.d.

Feeding cycles of an EAA-deficient diet had no effects on protein metabolism, provided that the amino acid differed from one cycle to the other. We monitored body weight, percentage of lean and fat mass, and weight of muscle in mice subjected for 24 d to the above cycling nutritional protocol (four nutritional cycles; Fig. 2c), none of these physiological parameters were modified relative to control (Fig. 2d).

The nutrition system is relevant for *in vivo* gene therapy

We next investigated the capacity of nutrition to regulate the AARE-driven expression system in gene transfer experimental settings, targeting various tissues relevant for gene therapy. Although the GCN2-eIF2 α -ATF4 pathway is ubiquitous, certain organs are more sensitive than others to an EAA-free diet. Data from transgenic mice fed an EAA-deficient diet showed that this pathway was functional in the brain and in many metabolic organs, including the liver and the pancreas (Supplementary Fig. 4).

We first explored hydrodynamic injection of plasmids carrying the luciferase gene driven by AAREs (Fig. 1b) into the tail vein of Balb/C mice, allowing hepatic transfection¹⁷. Bioluminescence in the abdominal area and in the collected livers was induced more than 30-fold in response to a 6-h dietary isoleucine starvation compared to the control diet (Fig. 3a). Luciferase assay of hepatic protein extracts confirmed this increase in luciferase activity.

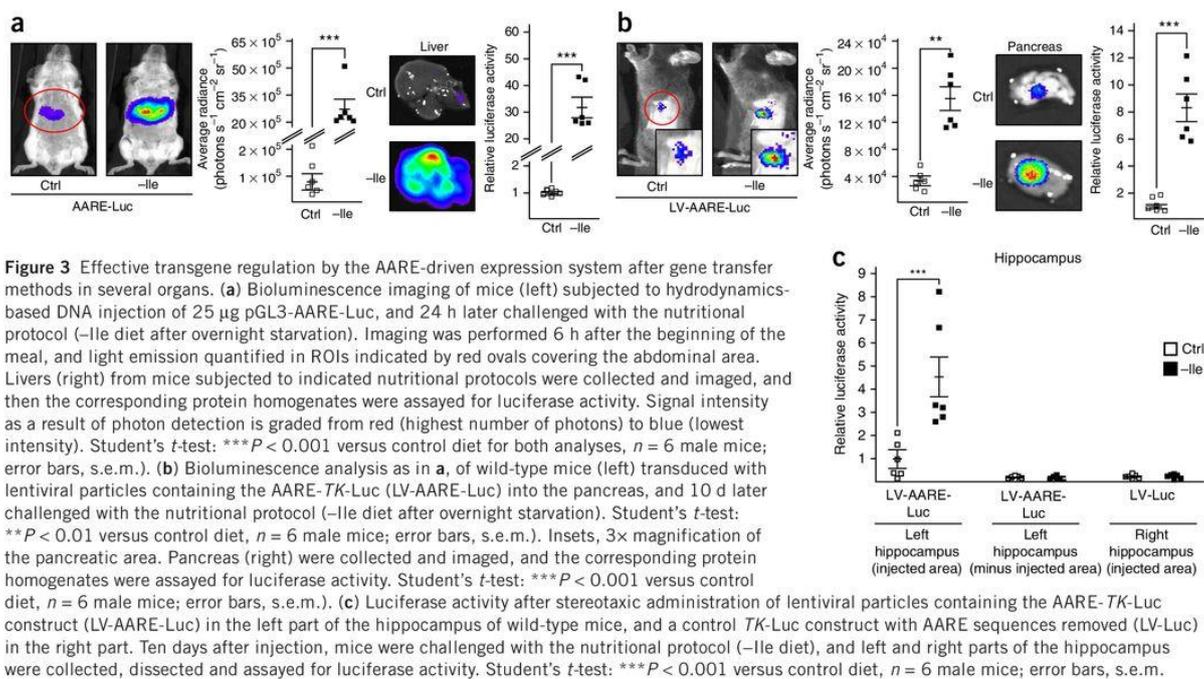
In a second experiment, we transduced pancreatic tissues with a lentiviral vector carrying the luciferase gene driven by AAREs. We observed induction of luminescence in the pancreas in response to the inducer diet that we confirmed by measuring luciferase activity in protein extracts (Fig. 3b). We detected no signal in other parts of the mice (Supplementary Fig. 5a,b).

Finally, to test the regulation of the AARE-driven expression system in the brain, we performed lentiviral injection of the AARE-driven luciferase expression system in the hippocampus of rats, a cerebral region that is easily accessible by stereotaxic injection. The left hippocampus received lentiviral particles containing the AARE-Luc sequence, whereas the right received particles without AARE sequences. At the completion of the nutritional protocol, brain extracts of the left hippocampus containing the vector harboring the AARE-driven luciferase expression system exhibited increased luciferase activity, whereas the right hippocampus and the non-injected area of the left hippocampus had background activity (Fig. 3c).

In the context of these *in vivo* studies, we also found that the AARE-driven expression system can be pharmacologically induced in liver and in pancreas after intraperitoneal injection of halofuginone, a pharmacological activator of GCN2 (ref. 18) (Supplementary Fig. 6). Pharmacological activation of GCN2 could provide an alternative to the nutritional protocol. However, a careful assessment of the specificity, pharmacokinetics and potential adverse effects of halofuginone is being awaited¹⁹.

Intermittent expression of hazardous therapeutic genes

In some instances, the level of therapeutic factors may need to be tightly regulated according to the need of the patient and/or expression may need to be abrogated in case of undesirable toxic effects. We chose *TRAIL* as a gene of interest. *TRAIL* is a secreted cytokine that acts in a paracrine manner by binding to specific death receptors to initiate apoptosis^{20–23}. *TRAIL* has been intensely investigated, particularly in glioblastoma cells²⁴. It has a short biological half-life (30 min) and is rapidly cleared from the body after systemic administration.



However, prolonged exposure of normal human cells to TRAIL could still be toxic^{25–28}.

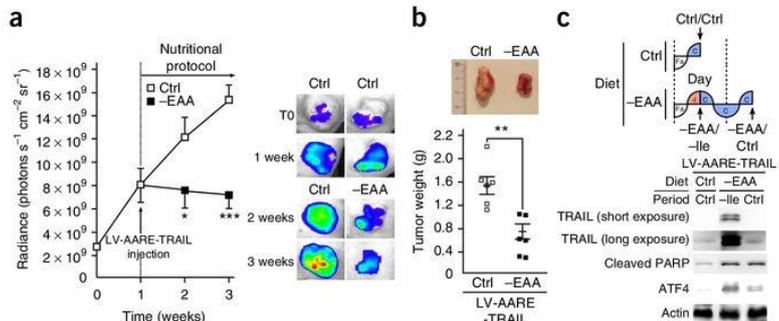
In that context, a suitable solution to regulation of TRAIL expression is to take advantage of the AARE-driven expression system. We used human Gli36-luciferase cells as a model for glioblastoma cells. We transduced these cells, which constitutively express luciferase²⁹, with the AARE-driven TRAIL expression system (Supplementary Fig. 7a). We first ascertained that TRAIL protein expression was induced in response to leucine starvation, secreted into the culture medium, had a paracrine effect on surrounding cells and triggered apoptosis (Supplementary Fig. 7b–e).

We then tested the effects of TRAIL expression on Gli36-luciferase glioblastoma xenografts in nude mice. We directly injected

the lentiviral vector into the tumor (1 week after cell implantation) and applied the long-term nutrition-based protocol described above for 2 weeks. We assessed tumor development by bioluminescence imaging. TRAIL expression prevented tumor growth with no apparent toxicity at the gross level (group with EAAs removed in cycles '-EAA group'), whereas similar mice fed a control diet showed no inhibition (control group) (Fig. 4a,b). Immunoblot analysis of protein from tumors showed that only mice from the -EAA group displayed an elevation in the amount of the apoptosis marker cleaved PARP, indicating that an apoptotic process occurred in these cells and not in the counterpart controls (Fig. 4c). We detected TRAIL protein solely in tumors from the -EAA group, after 6 h of the Ile-deprived diet. As expected, the nutritional protocol by itself had no effects on

Figure 4 TRAIL expression driven by the nutrition-based AARE gene system prevents growth of xenografted glioblastoma cells.

(a) Tumor growth in nude mice subcutaneously implanted with Gli36-luc cells (2×10^6), a week later injected intratumorally with the LV-AARE-TRAIL lentivirus, and then fed a control diet (Ctrl) or an alternation of EAA-deficient diets (-EAA) as depicted in Figure 2c. Tumor growth was monitored by bioluminescence imaging on the first day after Gli36-luc implantation (T0) and every week thereafter. Signal intensity was quantified in ROIs covering the tumors (6 mice per group). Photon detection is graded from red (highest number of photons) to blue (lowest intensity). Data were analyzed using a two-way ANOVA with interaction, including nutritional protocol as one way and week as the second way **P* < 0.05; ****P* < 0.001, *n* = 6 male mice; error bars, s.e.m.). **(b)** Tumor weights at the end of the experiment (Student's *t*-test: ***P* < 0.01 versus control diet, *n* = 6 male mice; error bars, s.e.m.). **(c)** TRAIL expression, PARP cleavage and ATF4 expression at the end of the experiment. Black arrows indicate when the mice were killed (day 21 and 22). Ctrl/Ctrl indicates the control group fed a control diet. Within the -EAA group, half of the lot was killed after a feeding period on an Ile-deficient diet (-Ile), whereas the other half was killed after the recovery period. Proteins homogenates from the excised tumors were analyzed by western blot for detection of TRAIL (short and long exposures), cleaved PARP and ATF4 (bottom). Actin levels are shown as a loading control.



tumor growth (Supplementary Fig. 8a–c). Collectively, these findings validate the capacity of the AARE-driven expression system to generate pulses of transgene expression, thereby allowing long-term or intermittent gene therapy treatments.

DISCUSSION

The temporal regulation of therapeutic gene expression has long been awaited to broaden the clinical utility of gene therapy³⁰. In this study, we showed how a regulatory system, initially discovered in the context of basic studies pertaining to the physiology of nutritional deprivation, provides a simple and robust means to control the expression of exogenous transgenes, and exhibits the desirable properties for translation from the laboratory to clinical practice.

The development of this nutrition-based regulatory system takes advantage of the GCN2-eIF2 α -ATF4 pathway that senses amino acid deficiency. This pathway is triggered when omnivorous animals are confronted with food restricted in one EAA, a situation that may occur frequently in the wild if only a single plant protein source is accessible⁶. Its activation occurs exclusively in response to the consumption of an EAA unbalanced diet and is engaged in no other human nutritional conditions. Physiological conditions, such as fasting, do not affect the amino acids blood concentration to such an extent that it would trigger the GCN2 pathway, as the blood concentration of all amino acids would be maintained through an increased proteolysis in liver and then in muscle³¹.

The GCN2-eIF2 α -ATF4 pathway has been found in numerous tissues such as liver, pancreas and in different parts of the brain, revealing the large potential applicability of the AARE-driven expression system to treatment of many diseases. It exhibits no inherent toxicity, as it is not based on an exogenous ligand-inducible system relying on nonhuman or viral transcription factors and/or regulatory proteins, which could generate immune responses. Moreover, it obviates the need for pharmacological inducers, which could generate toxic effects, especially for long-term treatments^{32,33}.

The nutrient-based regulatory system offers a robust and flexible means to precisely tune the expression of a desired gene because the inducer diets are composed of free amino acids that are easily absorbed, leading to a rapid EAA blood drop kinetics and triggering of expression of the therapeutic transgene. The level of expression of a given transgene will depend on the specific EAA lacking in the diet. A diet composed of free amino acid taken by a patient, in the morning, is not anticipated to be a challenge for the patients. In this clinical context, it is also particularly worth noting that a medical formula of leucine-free diet, available on the market and validated in Maple syrup urine disease (MSUD), could be readily used in conjunction with the AARE system. In addition, a new formula tailored to the individual needs and tastes of the patient can be developed. After the induction period, patients could after a few hours resume eating a normal diet. When required, sustained expression of the transgene can be obtained by an alternation of diets every day or few days.

Timely exogenous regulation of transgene expression appears to be particularly suitable in the context of pharmacological gene therapies as opposed to gene replacement or surgery. The latter strategy allows the replacement of a defective gene by a bona fide functional counterpart, obviating the need for exogenous regulation. By contrast, pharmacological gene therapies may require long-term or intermittent regulation of the transgene expression. Pertinent situations are represented by tropic factors that are receiving considerable attention in the context of neurodegenerative disorders. In particular, the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), has been

shown to be essential for the survival of dopaminergic neurons in the adult brain, and gene therapy approaches are being evaluated for Parkinson's disease³⁴.

The dynamics of a given regulatory system is a key feature in addressing the pharmacological properties of a given medication supplied through gene transfer. To be clinically relevant, a gene regulatory system should be regulated over a wide dose range of the inducer, within a safe dose of the vector, and exhibit a low level of background expression. In this regard, the study of the pro-apoptotic TRAIL cytokine described here provided a direct and quantitative comparison between transgene expression and the resulting physiological/clinical effect. Specifically, the level of TRAIL expressed in the induced tumor was, in the absence of dietary isoleucine, estimated to be over a hundred-fold more intense than the faint signal obtained under control conditions. Such a high ratio of induction associated with the nutritional protocol offers great flexibility in adapting transgene expression to optimal therapeutic levels, and to abrogate the background activity when required. Thus, in the clinical setting, one should be in a position to generate efficient and safe doses of therapeutic molecule through the handling of the (i) dose of the therapeutic vector, (ii) strength of the minimal promoter driving the therapeutic transgene, (iii) (de)stabilization of the corresponding RNA, and (iv) selection of the EEA-deprived diet that would satisfy all efficacy and safety concerns.

The absence of background activity would be particularly crucial in considering suicide strategies in the context of *ex vivo* gene therapy. In particular, linking the AARE sequence to a pro-apoptotic gene would provide a potentially non-immunogenic alternative to the recently developed safety switch, based on the fusion of human caspase 9 to a modified human FK-binding protein³⁵.

The AARE system may, in particular situations, act as an endogenously controlled system in view of the fact that the eIF2 α -ATF4 signaling pathway is part of one of the three branches of the ER stress response³⁶. Thus, after delivery of the vector strictly in diseased tissues, AARE-dependent transcription can become internally activated in situations such as certain tumors or certain brain areas of patients suffering from Alzheimer's³⁷ or Parkinson's disease³⁸. In these instances, the expression of a therapeutic gene could be triggered endogenously, without resorting to an EAA-deficient diet. Alternatively, when the therapeutic factor is a secreted protein with a paracrine effect, the therapeutic effect may be obtained by injection of the vector into neighboring healthy tissue followed by dietary induction.

Lastly, we showed that the nutrition-based regulatory system was effective in the context of a vector backbone, such as that of the lentiviral vector, which transduces many types of cells efficiently and is among the most promising viral vectors currently used in gene therapy trials. This finding calls for the testing of other vectors for their capacities to express the AARE system, which may further exemplify the flexibility and potential of the nutrition-regulated system.

Clearly, the AARE system highlights that synthetic diets can enable a tight and robust temporal control of therapeutic transgene expression, thereby overcoming a frequent hurdle in the translation of gene therapy protocols to clinical fruition.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper.

Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the online version of the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank K. Shah (Harvard Medical School) for Gli36-Luc cells, D. Ron and H. Harding (Institute of Metabolic Science, Cambridge, UK) for GCN2^{-/-} and PERK^{-/-} MEFs, J.C. Bell (Ottawa health research institute, Canada) for PKR^{-/-} MEFs, M. Petera for statistical analysis assistance, and A. Terrisse and A. Teygnie for animal care and technical assistance. This study was supported by 'Programmes Emergence' (ANR-12-EMMA-0024) and (ANR-12-BSV2-0025-03) of 'Agence Nationale de la Recherche'.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.C., A.B., J.M. and P.F. designed the experiment; C.C., A.B., V.C., A.M., P.B., A.D.T. and P.R. performed the experiments; P.C. supervised A.M.'s work; J.A., A.-C.M., L.P., C.J., Y.M. and F.M. provided reagents, materials, or analysis tools; C.C., P.F., J.M., P.R. and A.B. analyzed the data; J.M., A.B. and P.F. wrote the paper.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare competing financial interests: details are available in the online version of the paper.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

- Kaufmann, K.B., Büning, H., Galy, A., Schambach, A. & Grez, M. Gene therapy on the move. *EMBO Mol. Med.* **5**, 1642–1661 (2013).
- Benítez, J.A., Domínguez-Monzón, G. & Segovia, J. Conventional and gene therapy strategies for the treatment of brain tumors. *Curr. Med. Chem.* **15**, 729–742 (2008).
- Sheridan, C. Gene therapy finds its niche. *Nat. Biotechnol.* **29**, 121–128 (2011).
- Misra, S. Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution. *J. Assoc. Physicians India* **61**, 127–133 (2013).
- Maurin, A.C. *et al.* The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores. *Cell Metab.* **1**, 273–277 (2005).
- Chaveroux, C. *et al.* Molecular mechanisms involved in the adaptation to amino acid limitation in mammals. *Biochimie* **92**, 736–745 (2010).
- Kilberg, M.S., Balasubramanian, M., Fu, L. & Shan, J. The transcription factor network associated with the amino acid response in mammalian cells. *Adv. Nutr.* **3**, 295–306 (2012).
- Dever, T.E. *et al.* Phosphorylation of initiation factor 2 alpha by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast. *Cell* **68**, 585–596 (1992).
- Lu, P.D., Harding, H.P. & Ron, D. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J. Cell Biol.* **167**, 27–33 (2004).
- Vattem, K.M. & Wek, R.C. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 11269–11274 (2004).
- Bruhat, A. *et al.* Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the CHOP promoter. *Mol. Cell Biol.* **20**, 7192–7204 (2000).
- Harding, H.P. *et al.* An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* **11**, 619–633 (2003).
- Carraro, V. *et al.* Amino acid availability controls TRB3 transcription in liver through the GCN2/eIF2 α /ATF4 pathway. *PLoS One* **5**, e15716 (2010).
- Donnelly, N., Gorman, A.M., Gupta, S. & Samali, A. The eIF2 α kinases: their structures and functions. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 3493–3511 (2013).

- Crosby, J.S., Lee, K., London, I.M. & Chen, J.J. Erythroid expression of the heme-regulated eIF-2 alpha kinase. *Mol. Cell Biol.* **14**, 3906–3914 (1994).
- Chaveroux, C. *et al.* In vivo imaging of the spatiotemporal activity of the eIF2 α -ATF4 signaling pathway: Insights into stress and related disorders. *Sci. Signal.* **8**, rs5 (2015).
- Ezzine, S. *et al.* RILES, a novel method for temporal analysis of the in vivo regulation of miRNA expression. *Nucleic Acids Res.* **41**, e192 (2013).
- Keller, T.L. *et al.* Halofuginone and other febrifugine derivatives inhibit prolyl-tRNA synthetase. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 311–317 (2012).
- Pines, M. & Spector, I. Halofuginone - the multifaceted molecule. *Molecules* **20**, 573–594 (2015).
- Seol, J.Y. *et al.* Adenovirus-TRAIL can overcome TRAIL resistance and induce a bystander effect. *Cancer Gene Ther.* **10**, 540–548 (2003).
- Griffith, T.S. *et al.* TRAIL gene therapy: from preclinical development to clinical application. *Curr. Gene Ther.* **9**, 9–19 (2009).
- Bellail, A.C., Qi, L., Mulligan, P., Chhabra, V. & Hao, C. TRAIL agonists on clinical trials for cancer therapy: the promises and the challenges. *Rev. Recent Clin. Trials* **4**, 34–41 (2009).
- Kim, C.Y. *et al.* Preclinical studies for pharmacokinetics and biodistribution of Ad-stTRAIL, an adenovirus delivering secretatable trimeric TRAIL for gene therapy. *Exp. Mol. Med.* **43**, 580–586 (2011).
- Nagane, M., Cavenee, W.K. & Shiohara, Y. Synergistic cytotoxicity through the activation of multiple apoptosis pathways in human glioma cells induced by combined treatment with ionizing radiation and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J. Neurosurg.* **106**, 407–416 (2007).
- Walczak, H. *et al.* Tumorcidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med.* **5**, 157–163 (1999).
- Nitsch, R. *et al.* Human brain-cell death induced by tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Lancet* **356**, 827–828 (2000).
- Nesterov, A., Ivashchenko, Y. & Kraft, A.S. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) triggers apoptosis in normal prostate epithelial cells. *Oncogene* **21**, 1135–1140 (2002).
- Volkman, X. *et al.* Increased hepatotoxicity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in diseased human liver. *Hepatology* **46**, 1498–1508 (2007).
- Hingtgen, S. *et al.* Targeting multiple pathways in gliomas with stem cell and viral delivered S-TRAIL and Temozolomide. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 3575–3585 (2008).
- Agha-Mohammadi, S. & Lotze, M.T. Regulatable systems: applications in gene therapy and replicating viruses. *J. Clin. Invest.* **105**, 1177–1183 (2000).
- Mortimore, G.E. & Pösö, A.R. Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply. *Annu. Rev. Nutr.* **7**, 539–568 (1987).
- Goverdhan, S. *et al.* Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges. *Mol. Ther.* **12**, 189–211 (2005).
- Naidoo, J. & Young, D. Gene regulation systems for gene therapy applications in the central nervous system. *Neurol. Res. Int.* **2012**, 595410 (2012).
- Bartus, R.T., Weinberg, M.S. & Samulski, R.J. Parkinson's disease gene therapy: success by design meets failure by efficacy. *Mol. Ther.* **22**, 487–497 (2014).
- Di Stasi, A. *et al.* Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1673–1683 (2011).
- Ron, D. & Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 519–529 (2007).
- O'Connor, T. *et al.* Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α increases BACE1 levels and promotes amyloidogenesis. *Neuron* **60**, 988–1009 (2008).
- Hoozemans, J.J. *et al.* Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**, 707–711 (2007).

ONLINE METHODS

Ethics statement. This study was carried out in accordance with INRA guidelines in compliance with European animal welfare regulation. Mice maintenance and all experiments have been approved by our institutional animal care and use committee, in conformance with French and European Union laws (permission to experiment on mice B63-150, local ethic committee CEMEA CE10-13, animal facilities agreement C6334514, GMO agreement 4756CA-I).

Animals and experimental diets. C57Bl/6 transgenic mice expressing the luciferase gene under the control of AARE were engineered in our laboratory as described previously¹⁶. Fisher rats and BalB/C and C57Bl/6 mice were housed in an animal facility at INRA. Nude mice were purchased from Janvier labs (SM-NU-6S-M). For each experiment, six 6-week-old males per group were used. Animals were excluded from the study if they died during the period of time between intratumoral or tissular delivery of lentivirus and feeding protocols. Examiners were not blinded with respect to diet administration and treatments. Animals had *ad libitum* access to food and water at all times, unless otherwise indicated. Animals were individually housed in plastic cages and subjected to a 12-h light/dark cycle at 22 °C, in a pathogen-free environment. Nutritional experiments were performed as previously described⁵. In general terms, their design should be in compliance with the contingency related to working with rodents, taking into account that rodents constantly nibble and are coprophagous. Thus, before subjecting mice to amino-acid-deprived meal, an overnight fasting period was essential, and newly cleaned cages were provided to the mice during this period. In doing so, animals were starved and hungry when the meal was provided and readily ate the nutritional diet. Food intake was controlled in each experiment. If necessary, force-feeding could also be an option but should be performed under conditions that are not stressful to animals. Experimental diets were manufactured in the INRA diets core facility (Unité de Préparation des Aliments Expérimentaux, INRA).

In vivo lentiviral transduction and hydrodynamic injection procedures. Pancreatic injections were conducted as follow: 6-week-old male C57Bl/6 mice were anesthetized with isoflurane, and a laparotomy through midline incision was made. The lentiviral vector solution containing 2×10^7 particles was administrated into the splenic vein. Ten days after injection, 16-h fasted mice were fed a control or a diet devoid of isoleucine for 6 h. At the end of the experiment, whole body and excised pancreas bioluminescence were measured by using a bioluminescence imaging system (IVIS spectrum, PerkinElmer).

Hippocampal administration of lentiviral particles was performed in 6-week-old male 344 rats (6 animals per group). Animals were anesthetized with isoflurane and placed in a stereotaxic frame. Before injections, lentiviral vectors were diluted with sterile PBS to achieve a titer of 10×10^9 . Viral preparation in 2- μ L volume was injected unilaterally into the dentate gyrus region of the hippocampus. The preparation was injected with a speed of 0.5 μ L/min over a period of 4 min by using a Hamilton 5- μ L syringe and a 27 G syringe.

Hydrodynamic injections were prepared by diluting 50 μ g of pGL3-2XAARE TRB3-Tk-LUC plasmid in a saline physiological buffer corresponding to 10% body volume of the mouse and were administrated over a 5-s period in to the tail vein of 6-week-old male BalB/C mice¹⁷ (6 animals per group). Twenty-four hours after injection, 16-h fasted mice were fed a control or a diet devoid of isoleucine for 6 h. At the end of the experiment, whole body and excised livers bioluminescence were imaged in a bioluminescence imaging system (IVIS spectrum, PerkinElmer).

For *in vivo* bioluminescence experiments, after gene transfer methods, basal light emission was assessed through IVIS spectrum measurements. Mice were ranked respective to the luciferase activity and distributed into the experimental groups to ensure equal average bioluminescence activity between the different groups.

In vivo tumor xenograft model. Tumors were obtained by injection of 2×10^6 Gli36-luc cells suspended in 200 μ L of DMEM into the left flank region. After a 1-week period for xenograft implantation, mice were ranked according to light emission of the tumors and then distributed into the experimental groups to ensure equal average tumor volumes between the groups. Tumors were then injected with 10^9 lentiviral particles and subjected to the indicated nutritional

conditions. After a 1-week period for xenograft implantation, tumors were injected with 10^9 lentiviral particles and subjected to the indicated nutritional conditions. The sizes of the resultant tumors were measured weekly with a bioluminescence imaging system (IVIS spectrum, PerkinElmer). At the endpoint, mice were killed and the tumors were collected surgically, weighed, photographed and flash-frozen for subsequent protein analysis.

Plasma amino acid analysis. Blood samples were drawn from the aorta of anesthetized mice. Plasma amino acids were purified, i.e., 100 μ L of plasma was added to 30 μ L of sulfosalicylic acid solution (1 mol/L in ethanol with 0.5 mol/L thiodiglycol), which was previously evaporated. We added norleucine as an internal standard to evaluate sample treatment efficiency, which was then used to correct the raw values. Amino acid concentrations were determined using an L8900 amino acid analyzer (ScienceTec, Courtabouef, France) with BTC 2410 resin (Hitachi Chemical).

Body measurements. Fat and lean masses were determined by placing restrained individual mice into the mouse EchoMRI-100 instrument (Echo Medical Systems LLC). For muscle-wasting assessment, after 24 d of the experiment, the gastrocnemius, soleus and tibialis anterior hind limb skeletal muscles were weighed. Results from mice fed EAA-deficient diets were reported relative to the control group data and expressed as a percentage.

Cell culture and lentiviral transduction. MEF, HeLa and Gli36-luc cells were cultured at 37 °C in Dulbecco's modified Eagle's medium F12 (DMEM F12) (Sigma) containing 10% FBS. When indicated, DMEM F12 lacking leucine (DMEM F12 base) (Sigma) was used. In all experiments involving amino acid starvation, 10% dialyzed calf serum was used. Gli36-Luc cells were a gift of K. Shah (Harvard Medical School)³⁹. *GCN2*^{-/-} and *PERK*^{-/-} MEFs were given by D. Ron and H. Harding (Institute of Metabolic Science, Cambridge, UK)^{40,41}. *PKR*^{-/-} MEFs were from J.C. Bell (Ottawa health research institute, Canada)⁴². Knockout MEFs were validated by PCR and western blot analyses, and Gli36-Luc cells by luciferase assays. All the cell lines were mycoplasma-free. Gli36-luc cells were transduced with either the LV-AAARE-eGFP or LV-AAARE-TRAIL vectors by using a multiplicity of infection of 10, in the presence of polybrene (5 μ g/mL). 48 h after infections, cells were transferred to 10-cm dishes and maintained for experimental purposes.

Immunoblot analysis and antibodies. Western blots were performed as previously described⁴³. Primary antibodies used were: anti-phospho-eIF2 α (Abcam, ab32157), anti-ATF4 (Santa Cruz, sc-200), anti-actin (Santa Cruz, sc-1616R), anti-cleaved PARP (Cell signaling tech., 5625) and anti-TRAIL (Cell signaling tech., 3219).

Transient transfection and luciferase assays. Cells were plated in 24-well plates and transfected by the calcium phosphate coprecipitation method, as described previously¹⁰. For all transfection experiments, plasmid pCMV- β GAL was used as an internal control. Relative luciferase activity was given as the ratio of relative luciferase unit/relative β -Gal units. All values are the means calculated from the results of three independent experiments (three samples per group).

Plasmid and lentivirus constructions. 2XAARE TRB3-Tk-LUC, 2XAARE CHOP-Tk-LUC and 2XAARE ATF3-Tk-LUC plasmids were constructed by inserting SacI-XhoI double-stranded oligonucleotides containing two copies of the different AARE sequence into the pcDNA3-TK-Luc plasmid. The 2XAARE TRB3- β -globin-LUC construct was obtained by replacing the *TK* minimal promoter sequence flanked by the XhoI and HindIII restriction sites with a double-stranded sequence corresponding to the various AARE sequences (see **Supplementary Fig. 1a**). 2XAARE TRB3-Tk-eGFP and 2XAARE TRB3-Tk-TRAIL lentiviruses were obtained by synthesizing cDNA sequences encoding eGFP and the human TRAIL (GeneCust) flanked by NcoI and XbaI restriction sites. DNA cassettes were then inserted in an HIV-INS vector containing two copies of the AAREs from the *Trib3* gene. 2XAARE TRB3-Tk-eGFP and 2XAARE TRB3-Tk-TRAIL lentiviruses were produced in the Vectorology facility (ICM, Paris).

Cell survival, apoptosis and ELISA assays. The viability of the cells was measured with the XTT cell viability kit (Cell signaling tech., 9095). Apoptosis was evaluated by flow cytometry analysis with the ANXA5/PE/7-AAD Apoptosis detection kit (BD Biosciences, 559763) following the manufacturer's instructions. Regarding ELISA assays, 16 h after treatment media were collected and used for TRAIL protein determination with the Human TRAIL/TNFSF10 Quantikine ELISA kit (R&D systems, DTRL00).

Statistics. Each cellular experiment was repeated three times. All animal experimental groups were composed of 6 mice or rats. All statistical analyses were generated using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software) and all data are expressed as means \pm s.e.m. For the comparison between two or more experimental groups, statistical significance was assessed via Student's *t*-test or two-way ANOVA (followed by Bonferroni's *post-hoc* test adjusting

the pair-wise comparison *P* value) with an alpha level of 0.05. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001.

39. Shah, K., Tang, Y., Breakefield, X. & Weissleder, R. Real-time imaging of TRAIL-induced apoptosis of glioma tumors in vivo. *Oncogene* **22**, 6865–6872 (2003).
40. Harding, H.P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H. & Ron, D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol. Cell* **5**, 897–904 (2000).
41. Harding, H.P. *et al.* Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* **6**, 1099–1108 (2000).
42. Abraham, N. *et al.* Characterization of transgenic mice with targeted disruption of the catalytic domain of the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *J. Biol. Chem.* **274**, 5953–5962 (1999).
43. Maurin, A.C. *et al.* Hypothalamic eIF2 α signaling regulates food intake. *Cell Rep.* **6**, 438–444 (2014).



Résumé

Le développement anarchique de tumeur peut conduire à la formation de régions hypoxiques carencées en nutriments. A cause de l'instabilité génétique des cellules cancéreuses, certaines peuvent développer des résistances à ces conditions proapoptotiques. Parmi ces mécanismes de résistance, ceux impliqués dans la survie des cellules face à la carence prolongée en acides aminés n'ont pas été élucidés. La carence en acides aminés est particulièrement délétère pour les cellules de par leur importance dans le métabolisme cellulaire et l'impossibilité pour 9 d'entre eux d'être synthétisée *de novo*.

L'objectif de ce travail était de déterminer les mécanismes permettant aux cellules cancéreuses de survivre face à la carence prolongée en acides aminés. Pour cela, nous avons développé un outil cellulaire par génétique fonctionnelle. Des fibroblastes embryonnaires de souris ont été soumis à une pression de sélection en les cultivant dans un milieu fortement carencé en acides aminés pendant plusieurs mois. Des clones capables de survivre et de proliférer dans ce milieu ont été générés. Le travail de thèse a d'abord consisté à caractériser la résistance de plusieurs clones à la carence en acides aminés et notamment, les voies de signalisation régulées par cette situation. Parmi ces dernières, nous avons pu observer que les clones par rapport aux cellules parentales présentaient altération de la voie GCN2, et plus précisément, une sous-expression d'un des acteurs majeurs de cette voie, la protéine ATF4. Par des expériences de shRNA, nous avons pu mettre en évidence que cette sous-expression favorisait la survie des clones en milieu carencé en acides aminés. L'association entre survie et sous-expression d'ATF4 a également pu être faite dans une lignée de cancer du pancréas, BxPC-3. En rétablissant l'expression d'ATF4, les cellules résistantes redevenaient sensibles aux effets apoptotiques de la carence en acides aminés, confirmant le rôle apoptotique d'ATF4 lors de carence en acides aminés prolongée.

Nous nous sommes également intéressés aux mécanismes que les cellules utilisaient pour se fournir en acides aminés à partir des protéines du milieu extracellulaire. Nous avons pu identifier qu'une des lignées de clones présentait un fort niveau de macropinocytose et que son inhibition lors de carence en acides aminés diminuait ses capacités de survie lors de carences en acides aminés

Notre approche a ainsi pu mettre en évidence des mécanismes de résistances des cellules à la carence en acides aminés. Ces mécanismes ont ensuite pu être observés dans des lignées cancéreuses confirmant la pertinence de notre modèle pour l'identification de tels mécanismes.

Mots clé : Acides aminés, ATF4, Cancer, Résistance

Abstract

Tumor development can be characterized by the formation of hypoxic area deprived in nutrients. Due to their genetic instability, tumor cells can become resistant to this apoptotic condition. Among the resistance mechanisms, those involved in cell survival against amino acids restriction is poorly known. Amino acids deprivation is particularly deleterious as nine of them cannot be synthesized *de novo*.

The aim of this work was to identify the mechanisms by which tumor cells can survive to long-term amino acids deprivation. For that purpose, we exerted a selective pressure on mouse embryonic fibroblast by exposing them to amino acids deprivation for several months. We generated clones able to survive and proliferate in deprived amino acids medium. On a first hand, we characterized the capacity of proliferation and survival of several resistant clones in amino acid deprivation condition. On a second hand, we studied several signaling pathways which are regulated during this condition. We have found that every clones present an alteration of the GCN2 pathway, and notably, a low expression of its major actor, the protein ATF4, when compared to the parental cells. We have shown with shRNA experiment that this underexpression promotes cell survival during amino acid deprivation. The association between decreased expression of ATF4 and better survival in amino acid deprivation condition was also found in a pancreatic cancer cell line, BxPC-3. ATF4 overexpression in this resistant cell line restores the apoptotic effect of ATF4 during amino acid deprivation.

We have also studied how cells can provide themselves in amino acids from the extracellular environment. We have observed that one of the clone cell line presents a high level of macropinocytosis and that, the inhibition of this mechanism decreases its survival during amino acid deprivation.

Thanks to our approach, we were able to highlight mechanisms which confers to cell resistance to amino acid deprivation. By observing those mechanisms in cancer cell lines, we confirmed the relevance of our approach to identify such mechanisms.

Keywords: Amino acids, ATF4, cancer, resistance