



**HAL**  
open science

# MECANISMES D'ADAPTATION A LA DISPONIBILITE EN ACIDES AMINES: ROLE DES KINASES GCN2 ET mTOR

Julien Averous

► **To cite this version:**

Julien Averous. MECANISMES D'ADAPTATION A LA DISPONIBILITE EN ACIDES AMINES: ROLE DES KINASES GCN2 ET mTOR. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Clermont Auvergne (UCA), 2021. tel-04815220

**HAL Id: tel-04815220**

**<https://hal.inrae.fr/tel-04815220v1>**

Submitted on 2 Dec 2024

**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.

Mémoire en vue de l'obtention de l'  
**HABILITATION À DIRIGER DES RECHERCHES**

*soutenu le 21 juin 2021 par*

**Julien Averous**

**MECANISMES D'ADAPTATION A LA DISPONIBILITE EN  
ACIDES AMINES: ROLE DES KINASES GCN2 ET mTOR**

Devant le jury composé de

Jean-Marc Brondello	Rapporteur	Chargé de Recherche INSERM, Montpellier.
Benoit Roussel	Rapporteur	Chargé de Recherche INSERM, Caen.
Jean-Marc Lobaccaro	Rapporteur	Professeur, Université Clermont Auvergne.
Béatrice Morio	Examinatrice	Directrice de Recherche INRAE, Lyon.
Hervé Guillou	Examineur	Directeur de Recherche INRAE, Toulouse.
Pierre Fournoux	Examineur	Directeur de Recherche CNRS, Clermont-Fd



## Table des matières

Remerciements .....	3
Préambule .....	4
Bilan des travaux de recherche .....	7
Généralité.....	7
Doctorat Equipe Gènes Nutriment, Unité de Nutrition et Métabolisme Protéique (2000-2004).....	8
Régulation de l'expression des gènes par les acides aminés .....	8
Régulation de la transcription par la carence en leucine, l'exemple de CHOP. ....	8
De GCN4 à l'Integrated Stress Response (ISR) .....	10
Régulation de la stabilité d'un messager par la carence en leucine, l'exemple d'IGFBP1. ....	12
Post-doctorat (2004-2005).....	14
Régulation de la traduction par les acides aminés : Etude de la kinase mTOR.....	14
De mTOR à mTORC1.....	14
Projet de recherche et résultats.....	15
Chargé de recherche INRAE Equipe NSP (2006-2009) .....	17
Impact de la carence en acides aminés sur la différenciation des cellules satellites musculaires	17
Projets en collaboration (2006-2009). ....	18
Bilan de la période 2006-2009 .....	19
Chargé de Recherche INRAE Equipe Proteostasis (2009-présent).....	19
Régulation du gène p8 par la voie GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4 lors d'une carence en un acide aminé .....	20
Identification des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance des cellules à une carence en acides aminés.....	21
Régulation de mTORC1 par la leucine, rôle de la voie GNC2 .....	25
Régulation de la localisation de mTOR par les acides aminés et la leucine. ....	26
Rôle de GCN2 dans la régulation de mTORC1 par la leucine .....	28
Collaboration sur la période 2009-2020.....	31
Stratégie nutritionnelle d'activation de GCN2 .....	32
GCN2 et polyphénols.....	32
Projet de Recherche .....	38
Description du projet de recherche .....	41
1) Identification de protéines végétales pouvant induire la voie de signalisation GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4 .....	41
2) Mise au point d'une stratégie d'activation intermittente de la voie GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4 par une protéine végétale déficiente en un acide aminé indispensable.....	42
3) Effet préventif de l'activation intermittente de la voie GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4 par une protéine végétale déficiente en méthionine dans un modèle d'induction d'obésité .....	44



4) Identifications des fonctions biologiques affectées par des restrictions intermittentes en différents acides aminés indispensables, évaluation du rôle de GCN2 .....	45
5) Application à l'Homme.....	46
Bibliographie .....	47
Curriculum Vitae.....	60
Bilan d'activité .....	61



## Remerciements

Mes premiers remerciements vont à Pierre à qui je dois beaucoup, depuis ma thèse effectuée sous sa direction jusqu'à la rédaction de ce manuscrit. Durant mes années de thèse, au travers de son encadrement, je n'ai pu que confirmer mon souhait d'être chercheur. J'ai beaucoup appris quant à la notion d'encadrement et de ce que cela implique. Son soutien moral et scientifique a réellement contribué à mon recrutement à l'UNH. Je lui suis reconnaissant de m'avoir permis de revenir au sein de son équipe pour pouvoir développer mes projets.

Je tiens également à remercier Jean-Marc Brondello, Benoit Roussel et Jean-Marc Lobaccaro d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je vous suis reconnaissant pour le temps consacré à évaluer mes travaux dans un domaine qui ne vous est pas le plus familier. Jean-Marc L. aura la chance de se plonger une seconde fois dans le monde de mTOR ! Un grand merci également à Béatrice Morio et Hervé Guillou d'avoir accepté de compléter ce jury qui, je le regrette un peu, sera en partie dématérialisé... Il sera donc compliqué de tester l'effet d'un pot d'HDR sur la sécrétion du FGF21.

Je ne pourrai pas citer toutes les personnes de l'UNH que je tiens à remercier pour leur aide et leur conseil tout au long de ces deux décennies. J'adresserai tout de même mes remerciements à Didier Remond, notre nouveau Directeur d'Unité en lui souhaitant de la réussite dans cette tâche ardue.

Evidemment, j'adresse mes remerciements à tous les membres de l'équipe Proteostasis, de ceux qui m'ont vu grandir (scientifiquement) aux nouveaux arrivants. J'ai la chance d'évoluer dans une atmosphère de travail combinant échanges scientifiques (un peu moins en ce moment), de convivialité (beaucoup moins en ce moment) et de bonne humeur. Alors, par ordre de bureau : merci Cathy et Aurore de supporter la vue de mon bureau, merci Alain de supporter le supporteur que je suis, merci Val pour ton aide précieuse et de supporter ma capacité d'improvisation, merci Lolo de supporter mes efforts de calembours, merci Cécile C de supporter ceux de Lolo, merci Céline de supporter mon anglais dans le texte, merci Daniel pour ta zénitude. Un grand merci aussi à Daniel, Agnes, Lydie, Christiane, Etienne, Isabelle, Cyrielle, Cécile, les plus ou moins nouveaux du 4ème pour votre contribution au plaisir de travailler dans une TGE. Merci aux jeunes qui sont actuellement de passage : Aurore, Fida, Dulce, Laura, Ghita, Melodie, Audrey, Christian, Ghita, Guillaume, Martin, Maëlle, Raphaëlle pour le dynamisme qu'ils apportent ainsi que pour nos effigies.

En cette période, je n'ai pas pu bénéficier du soutien de mes parents et amis, tout a reposé sur « ma » Céline, un énorme merci pour son dévouement et pour m'avoir préservé de la difficulté d'un confinement avec nos deux chérubins Ninon et Iban pendant la rédaction de ce manuscrit.



## Préambule

Le présent manuscrit vise à exposer le bilan de mes activités de recherche depuis le début de ma carrière et de présenter un projet de recherche que je souhaite développer dans les années à venir. Depuis mon doctorat, mes travaux de recherche ont comme principal objectif la compréhension des mécanismes de régulation des fonctions cellulaires par la disponibilité en acides aminés. J'ai réalisé mon doctorat de 2001 à 2004 à l'INRA de Theix à l'Unité de Nutrition et Métabolisme Protéique au sein de l'équipe Gènes Nutriments (GN) dirigée par P. Fafournoux. Mes travaux de thèse ont contribué à caractériser le rôle de la voie de signalisation GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4 (décrite dans l'encadré ci-dessous) dans la régulation de l'expression des gènes en fonction de la disponibilité en acides aminés. Afin d'avoir une connaissance plus globale de la régulation des mécanismes moléculaires par les acides aminés, j'ai effectué mon post-doctorat dans le laboratoire de Chris Proud à l'Université de Colombie Britannique à Vancouver (Canada). La thématique de ce laboratoire était la régulation de la traduction par la voie de signalisation mTORC1 qui, outre les acides aminés, intègre de nombreux autres signaux (nutritionnels, hormonaux...). Cette voie connaissait un intérêt grandissant (qui n'a fait que se confirmer par la suite), ce choix obéissait donc en partie à la volonté d'étendre mes possibilités en terme de candidature à des postes de CR.

L'ouverture d'un poste de CR2 en 2005 à l'UNH dans l'équipe de D. Dardevet a représenté une réelle opportunité dans la mesure où peu de laboratoires abordaient la thématique des acides aminés. L'objectif de ce recrutement était de mieux comprendre l'effet signal des acides aminés sur la physiologie musculaire. Les travaux que j'ai réalisés durant cette période sur la régénération musculaire ont illustré l'importance d'approfondir la connaissance des mécanismes moléculaires régulés par les acides aminés afin de pouvoir caractériser leurs rôles au niveau physiologique. En 2009, cette connaissance était encore limitée, notamment concernant mTORC1. J'ai donc souhaité orienter mes activités de recherche vers des projets visant à mieux comprendre, au niveau moléculaire, l'effet signal des acides aminés. Dans cet objectif, j'ai fait une demande de mobilité interne au sein de l'unité pour intégrer l'équipe Gènes Nutriments (GN).

Durant la période 2009-2016, les projets que j'ai menés ont contribué à élargir les thématiques de l'équipe et en particulier, au travers de l'étude de la voie de signalisation mTORC1 et de son interaction avec la voie GCN2. Cette expertise concernant la voie mTORC1 est nécessaire dans la mesure où cette dernière est considérée comme la voie de régulation majeure des fonctions



cellulaires par la disponibilité en acides aminés. Il peut donc être important de prendre en compte la voie mTORC1 dans des projets visant à étudier le rôle de la voie GCN2 dans des situations physiologiques ou physiopathologiques.

Dans l'optique de caractériser la contribution de la voie GCN2 à des situations physiologiques/physiopathologiques, la question de la pertinence d'étudier une voie activée par un déficit en un acide aminé indispensable (AAI) était souvent avancée. Il y a encore quelques années, il était souvent considéré que cette situation ne pouvait pas être rencontrée chez l'Homme dans nos sociétés. Depuis, un nombre significatif de travaux ont montré que la voie GCN2 était impliquée dans des situations physiologiques/physiopathologiques et dans certains cas, indépendamment de tout contexte nutritionnel. Il s'avère que l'activation de la voie GCN2 présenterait, dans certaines situations, un effet bénéfique voire préventif. Cette observation m'a amené à réorienter une partie de mes activités de recherche vers l'identification d'approches nutritionnelles applicables en alimentation humaine pour moduler l'activité de GCN2. Dans cette optique, en 2017, j'ai initié un nouveau projet ayant pour but de déterminer si les polyphénols régulaient la voie GCN2. En effet, des données de la littérature m'ont permis d'émettre l'hypothèse que la voie GCN2 serait la cible de certains polyphénols. Si ce projet a pour objectif d'établir des stratégies nutritionnelles, il est également centré sur la caractérisation des mécanismes impliqués. Actuellement, je me situe dans une période charnière. Le projet concernant la régulation de la voie GCN2 par les polyphénols devrait aboutir à la publication d'au moins un article prochainement. Il pourrait être également envisagé d'approfondir certains travaux *in vitro* afin de valoriser des résultats préliminaires que nous avons obtenus. Toutefois, l'hypothèse de pouvoir moduler de manière nutritionnelle chez l'Homme la voie GCN2 pour ses aspects bénéfiques/préventifs par les polyphénols n'apparaît pas comme particulièrement prometteuse. A partir de ce constat, une autre stratégie est alors envisagée. J'ai formulé l'hypothèse que, de par leur déficit en certains AAIs, des protéines végétales permettraient de moduler de manière nutritionnelle l'activation de la voie GCN2.

La grande majorité des projets évoqués dans ce manuscrit sont de mon initiative et je les ai menés dans une relative autonomie dans le sens où j'ai bénéficié d'un soutien significatif que ce soit au niveau technique, scientifique et financier au sein de mon équipe. Je tiens à mentionner que j'ai également eu l'opportunité de co-diriger la thèse de Florent Mesclon avec Pierre Fafournoux dans le cadre d'un projet financé par l'ARC.

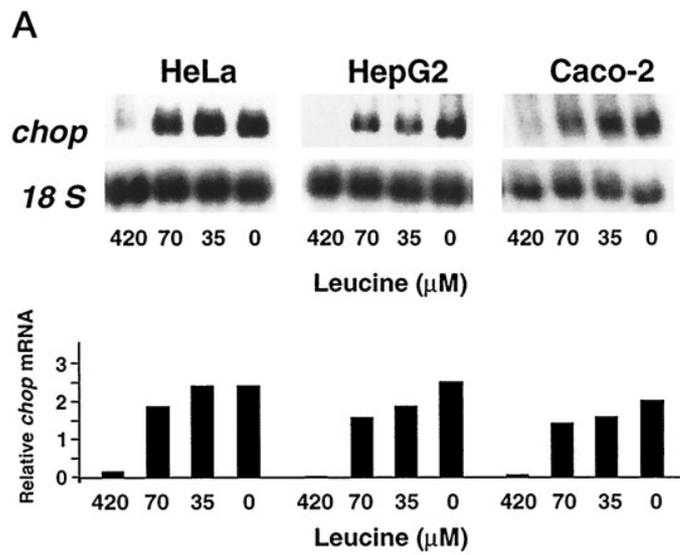
Au-delà de l'aspect scientifique de mon activité, je me suis investi dans le fonctionnement de l'unité. Je fais partie du groupe en charge de l'animation scientifique depuis mon recrutement.

En 2016, j'ai été amené à participer à la mise en place au sein de l'unité d'un groupe « matériel moyen ». Ce groupe est en charge de l'optimisation de l'utilisation et de l'achat des équipements scientifiques communs de l'unité. Je contribue également, de manière très limitée (4h/an), à un module du Master Biologie Santé de l'Université Clermont Auvergne.

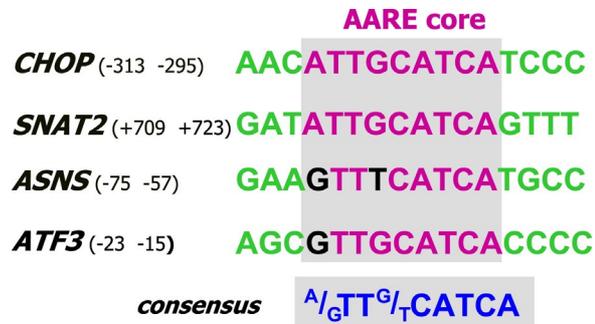
## Bilan des travaux de recherche

### Généralité

L'ensemble de mes travaux depuis mon doctorat s'attache à aborder la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans les capacités d'adaptation de l'organisme aux variations de concentrations en acides aminés. Parmi les acides aminés présents dans la nature, 20 participent à la synthèse protéique chez les eucaryotes supérieurs, il s'agit des acides alpha aminés. Ces acides aminés ne sont pas seulement des substrats de la protéosynthèse, ce sont également des intermédiaires métaboliques qui participent entre autres à la fourniture d'énergie ou à la synthèse des bases nucléiques. Ils sont également les précurseurs de nombreuses molécules telles que la sérotonine, le monoxyde d'azote ou encore le glutathion. Chez les mammifères, les acides aminés présentent deux caractéristiques cruciales, 1) il existe neuf acides aminés indispensables qui ne peuvent pas être synthétisés *de novo* par l'organisme 2) il n'existe pas de forme de stockage dédiée des acides aminés contrairement au glycogène pour les glucides ou aux triglycérides pour les lipides. Il en résulte que les acides aminés indispensables doivent être nécessairement amenés par l'alimentation afin de maintenir l'homéostasie protéique de l'organisme. En cas de déficit de l'apport en acides aminés indispensables, les protéines corporelles vont être dégradées pour fournir les acides aminés indispensables manquants et maintenir les fonctions essentielles. Cette réponse adaptative à la restriction en acides aminés indispensables ne peut être évidemment que transitoire. Il existe une régulation complexe de cette protéolyse que ce soit au niveau cellulaire (différents systèmes protéolytiques) ou de l'organisme (échanges inter-organes). L'induction de la protéolyse lors d'une restriction en acides aminés indispensables fait partie d'une réponse globale qui comprend de nombreux processus cellulaires et physiologiques. En particulier, deux mécanismes étroitement liés et au cœur du fonctionnement des êtres vivants sont impactés : la transcription et la traduction. Il est également important de prendre en compte que cette réponse adaptative ne joue pas un rôle uniquement lors d'un défaut d'apport en acides aminés indispensables : de nombreuses situations pathologiques/physiopathologiques sont associées à une altération de l'homéostasie des acides aminés. Depuis plusieurs décennies, il existe un intérêt particulier pour l'homéostasie des acides aminés dans le contexte de maintien de la masse musculaire (sarcopénie, cachexie...). Les vingt dernières années ont été marquées par un progrès considérable de la compréhension des mécanismes moléculaires régulés par les acides aminés mais aussi des méthodes d'analyses. Ces avancées ont contribué à mettre en évidence



**Figure 1:** Northern Blot illustrant que la carence en leucine de 16h entraine l'augmentation de l'ARNm de CHOP dans plusieurs type cellulaire (Issue de Bruhat et al, JBC 1997)



**Figure 2:** Comparaisons des séquences des éléments de réponse aux acides aminés des gènes CHOP, SNAT2, ASNS et ATF3. (Issue de Chaveroux et al, Biochimie 2009)

le rôle de l'homéostasie des acides aminés que ce soit dans les cancers, le diabète de type 2 ou l'obésité. Mes premiers travaux de recherche se sont inscrits dans ce contexte, ils visaient à mieux définir comment la disponibilité en acides aminés contrôlait l'expression des gènes et de ce fait, impactait des fonctions physiologiques.

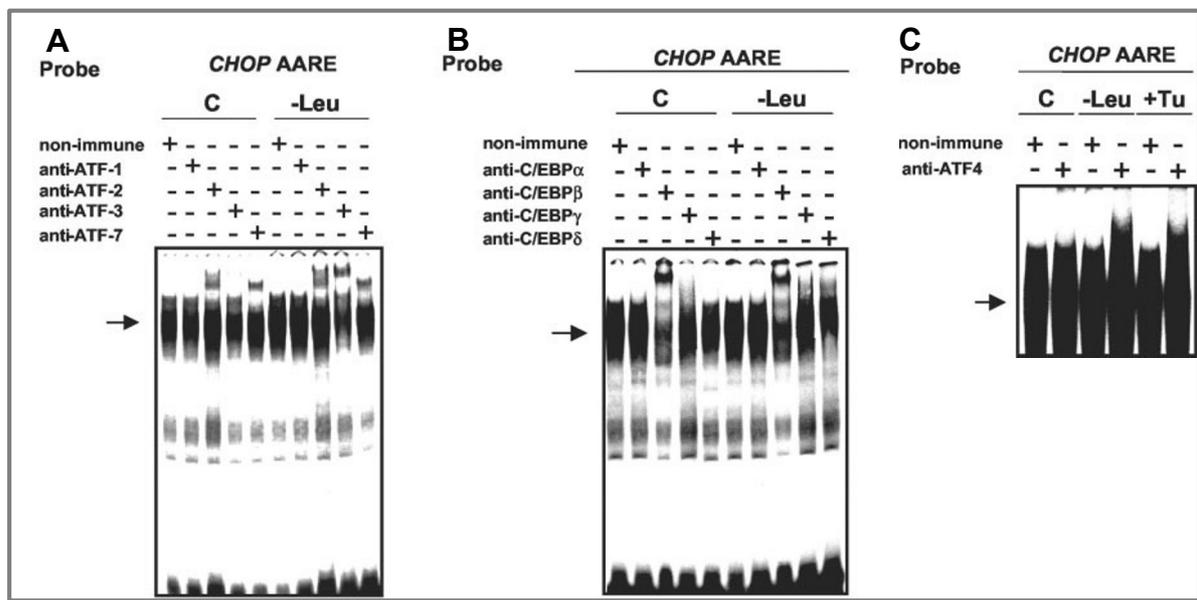
Doctorat Equipe Gènes Nutriment, Unité de Nutrition et Métabolisme Protéique  
(2000-2004)

### Régulation de l'expression des gènes par les acides aminés

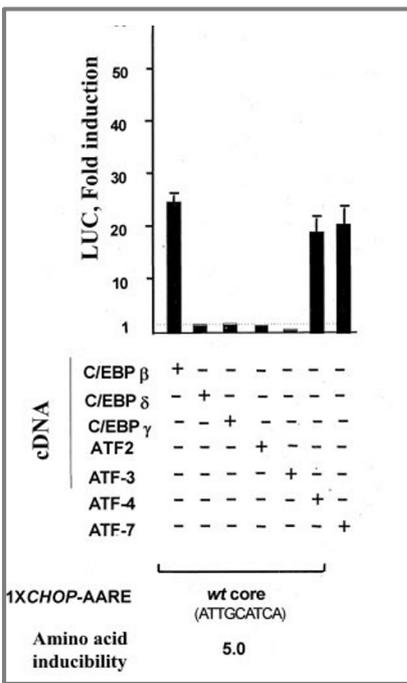
Les acides aminés, tout comme les glucides et les lipides peuvent réguler directement l'expression des gènes indépendamment de composantes nerveuses ou endocriniennes (1). Ces mécanismes de régulation permettent à l'organisme d'adapter ses fonctions biologiques à des changements d'états nutritionnels en modifiant le niveau d'expression de nombreuses enzymes, hormones, facteurs de transcription ou encore protéines de structure. A la fin du 20ème siècle, la plupart des études concernant l'implication des nutriments dans la régulation de l'expression des gènes chez les mammifères portaient sur les effets des glucides et des lipides. Toutefois, quelques équipes dont celles de Pierre Fafournoux ont entrepris de caractériser les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression des gènes par les acides aminés.

### Régulation de la transcription par la carence en leucine, l'exemple de CHOP.

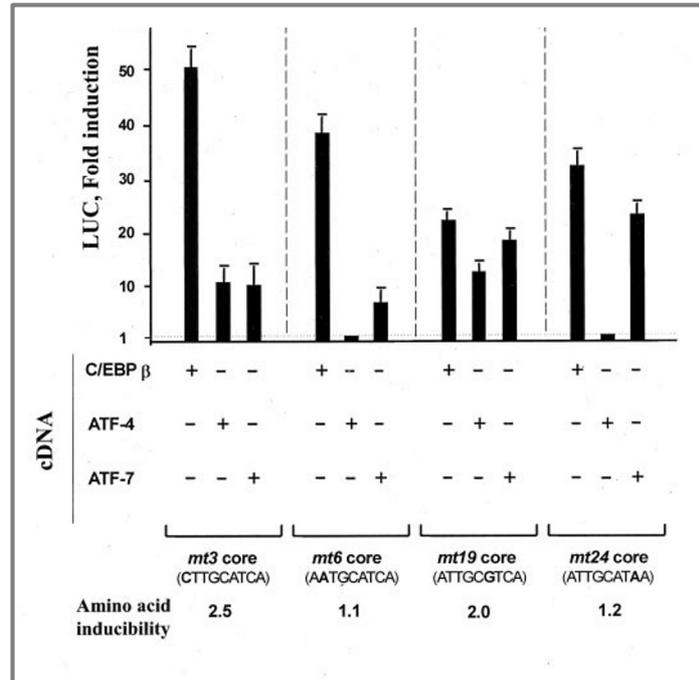
Ces travaux ont été axés principalement sur l'étude de la régulation du gène CHOP (C/EBP Homologous Protein) lors d'une carence en leucine. Le choix de la leucine se justifie du fait qu'il s'agit d'un acide aminés indispensable non métabolisé par les cellules utilisées lors de ces travaux et que son transport permet un équilibre rapide entre le milieu de culture et le milieu intracellulaire. Concernant le choix du gène CHOP, les travaux de Marten et al. venaient de mettre en évidence que parmi 19 gènes étudiés, le gène CHOP présentait la plus forte induction lors d'une carence en leucine (2). Le gène CHOP ou Gadd153 (growth arrest DNA damage) a d'abord été identifié dans des cellules CHO de hamster (3). Il a été mis en évidence parmi des clones sélectionnés lors d'un crible pour identifier des gènes induits lors d'un arrêt de croissance dû à des dommages à l'ADN. Le gène CHOP code pour un facteur de transcription de la famille des C/EBP (C/AT Enhancer Binding Protein) qui est impliqué dans les processus de différenciation, de réponse au stress et d'apoptose (4). Les travaux menés par l'équipe ont mis en évidence une composante transcriptionnelle dans l'augmentation du niveau d'expression



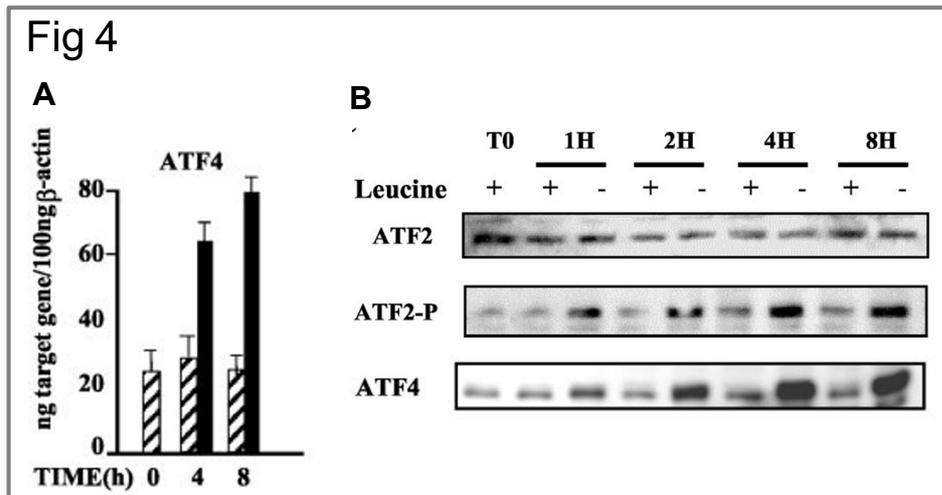
**Figure 3:** Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) using antibodies against transcription factors that belong to the ATF (A and C) or C/EBP (B) families were performed. Nuclear extracts were prepared from HeLa cells incubated for 8h in DMEM/F-12 with or without (420  $\mu$ M) leucine. In C we also used nuclear extracts from HeLa cells treated for 5 h with 5  $\mu$ g/ml tunicamycin. The 19-bp CHOP AARE radiolabeled probes carried nucleotides -313 to -295. Nuclear extracts were first incubated with 1  $\mu$ l of non-immune or immune serum, and the 19-bp CHOP AARE probes were then added.



**Figure 4:** the construct (1X CHOP AARE LUC) containing a single copy of CHOP AARE (-313 to -295) inserted 5' to the TK promoter driving LUC gene was used as reporter plasmid. Cells were transfected with a mixture containing the 1X CHOP AARE LUC (1  $\mu$ g) and an expression plasmid (1  $\mu$ g) encoding one transcription factor. Two days after transfection cells were harvested for preparation of cell extracts and determination of LUC activity. To measure the amino acid inducibility, cells were transfected with the 1X CHOP AARE LUC construct. Twenty-four hours after transfection, cells were incubated for 16 h in complete DMEM (420  $\mu$ M leucine) or in DMEM lacking leucine.



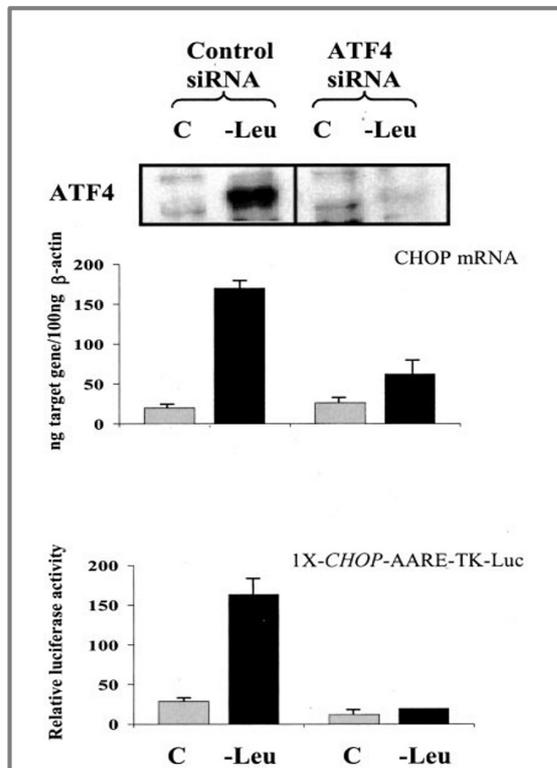
**Figure 5** same experiment than fig 4 was repeated using a reporter construct containing mutation on the CHOP AARE sequence. Mutations are indicated in boldface.



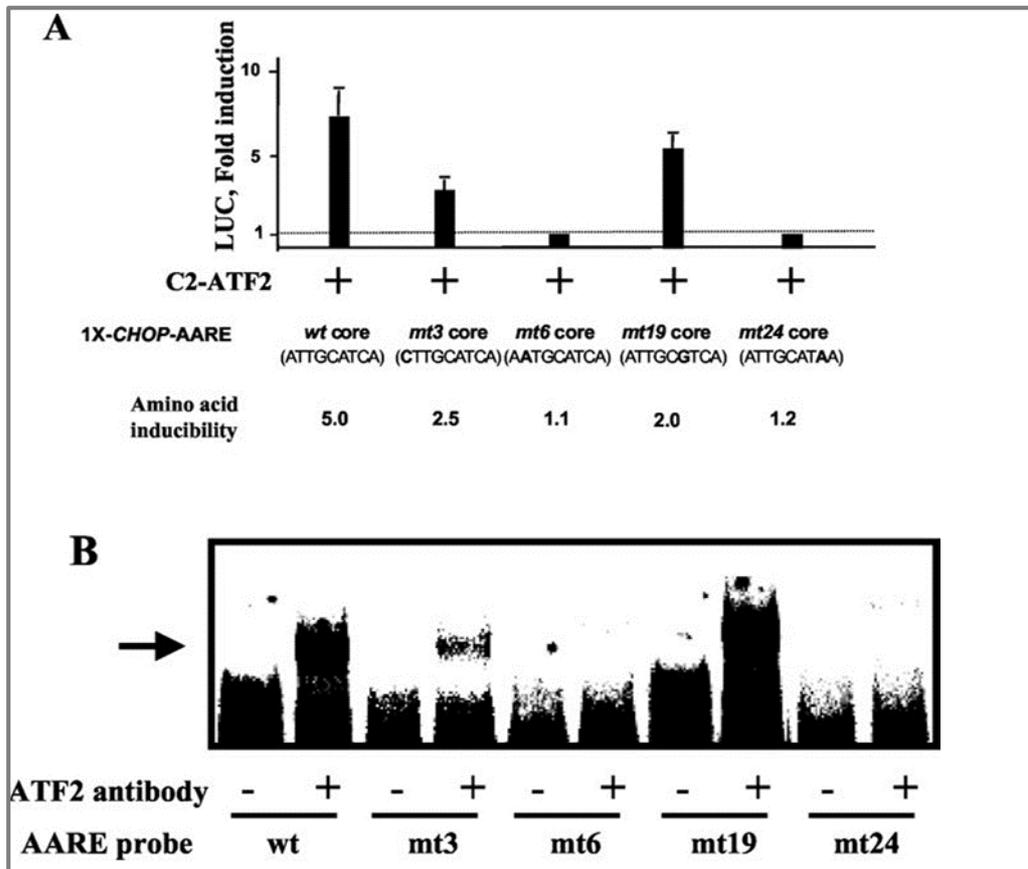
**Figure 6:** A, cells were incubated either in DMEM/F-12 or in DMEM/F-12 lacking leucine for 4 or 8 h. Total RNA were extracted, and real time RT-PCR was performed to quantify mRNAs B, immunoblot analysis of ATF2, ATF4 and ATF2 P.

de CHOP par la diminution de la concentration en leucine (à partir de 70 $\mu$ M) (Fig. 1) dans le milieu de culture (5). Il a été mis en évidence l'existence d'un élément de réponse aux acides aminés (AARE) dans la partie promotrice du gène CHOP. Il s'agit du premier élément de réponse aux acides aminés à avoir été caractérisé chez les mammifères. Par la suite, l'identification d'AARE similaire dans d'autres promoteurs a permis de définir une séquence consensus (Fig. 2). Cet élément de réponse est un site C/EBP-ATF. L'équipe avait démontré par gel shift que le facteur de transcription ATF2 se fixe à l'AARE lors d'une carence en leucine(6). L'utilisation de MEF (mouse embryonic fibroblast) invalidé pour ATF2 avait mis en évidence sa nécessité dans la régulation de la transcription du gène CHOP par la carence en leucine.

Mes travaux de thèse avaient pour objectif de caractériser les autres facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la transcription AARE dépendante. De par la nature de l'AARE (C/EBP-ATF site), nous avons testé plusieurs membres des familles de transcription C/EBP et ATF pour leur capacité à se lier à l'AARE (par gel shift) et à induire la transcription AARE dépendante dans des expériences de surexpression/gène rapporteur (la luciférase) (Fig.3 et 4). Il faut prendre en compte que ces approches peuvent présenter des limites en terme de spécificité, il est donc important d'interpréter les résultats dans leur globalité. Dans les expériences de gène rapporteur, nous avons également utilisé des mutants de l'AARE qui ont perdu leur capacité à induire l'expression du gène rapporteur lorsque les cellules sont soumises à la carence en leucine (Fig. 5). Certains des facteurs (ATF7 et C/EBP $\beta$ ) étaient capables de lier l'AARE et d'induire la transcription AARE dépendante. Toutefois, ils induisaient également la transcription via des mutants de l'AARE qui ne répondent plus à la carence en leucine suggérant que ces facteurs n'étaient pas impliqués spécifiquement dans la régulation de la transcription AARE dépendante dans le contexte de la carence en leucine. Dans notre crible, seul ATF4 présentait les critères suggérant qu'il pouvait contribuer à la régulation de la transcription AARE dépendante dans le contexte de la carence en leucine. Mes travaux ont permis de mettre en évidence que la carence en leucine entraînait une augmentation de l'expression du messenger d'ATF4 ainsi que de sa protéine (Fig. 6). A l'époque de ces travaux, la lignée MEF ATF4 KO n'était pas disponible mais en revanche, la technique knock-down par siRNA connaissait ses débuts. Ce type d'approche a permis de mettre en évidence qu'ATF4 jouait un rôle majeur dans la régulation de la transcription AARE dépendante lors d'une carence en leucine (Fig. 7).



**Figure 7:** Cells were transfected with ATF4 siRNA or control siRNA. After 1 day, cells were transfected with the 1X *CHOP* AARE LUC. Two days after siRNA transfection cells were incubated for 16 h in DMEM (C) or in DMEM lacking leucine (-Leu). ATF4 protein content was analyzed by Western blot, *CHOP* mRNA was quantified by real-time RT-PCR, and LUC activity was measured.



**Figure 8:** HeLa cells were cotransfected with 1 μg of a reporter construct (1X *CHOP* AARE LUC) wild type or mutant and an expression plasmid encoding a constitutively active mutant of ATF2 (C2-ATF2). B, supershift assays using the anti-ATF2 antibody and nuclear extract from HeLa cells were performed as described under “Materials and Methods.” Nuclear extracts were incubated with 1 μl of non-immune or anti-ATF2 serum and then incubated with the 19-bp wild-type (wt) or mutant (mt3, mt6, mt19, and mt24) *CHOP* AARE probes. Probes were diluted to obtain the same specific radioactivity.

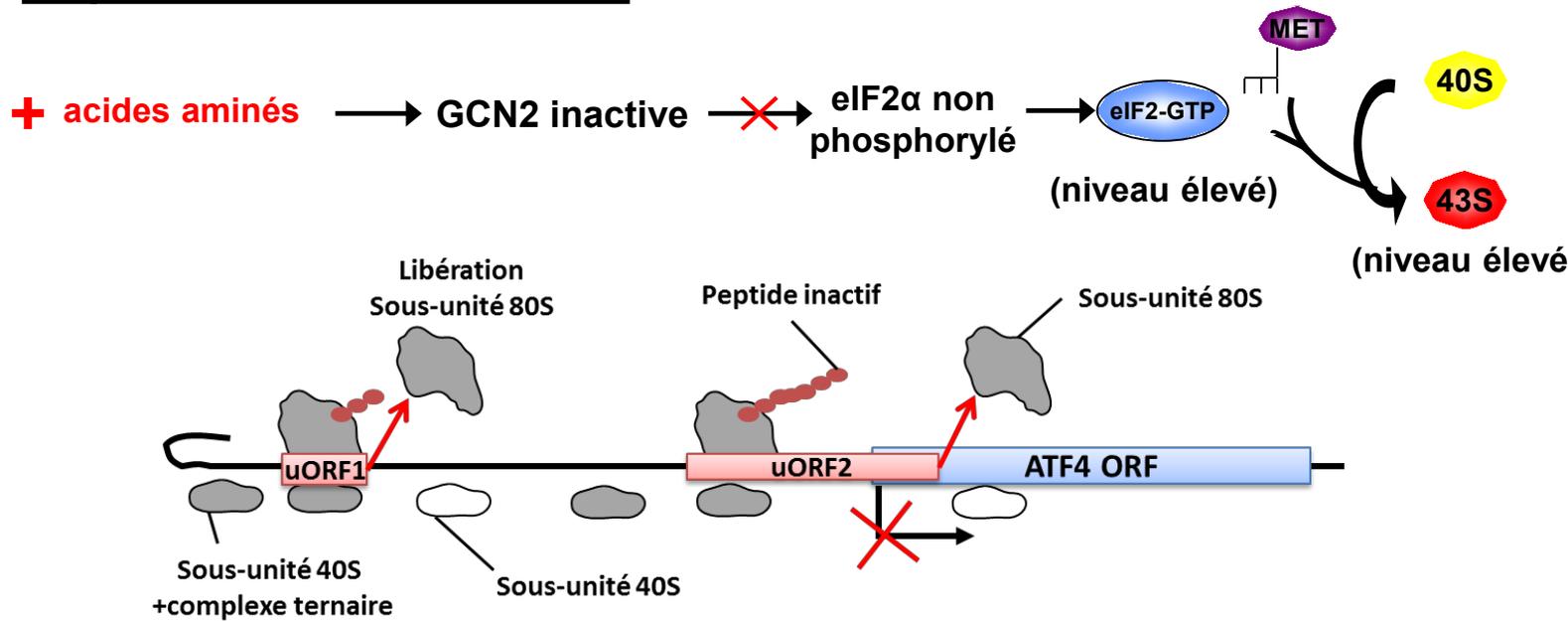
Il avait été préalablement démontré qu'ATF2 était nécessaire à la transcription AARE dépendante (6). Dans la présente étude, il a été observé que la carence en leucine entraînait la phosphorylation d'ATF2 sur la Thréonine 71 (Fig. 6), cette phosphorylation est/étant associée avec son activation (7). Cette observation peut expliquer le fait que la seule surexpression d'ATF2 ne soit pas suffisante pour induire la transcription AARE dépendante. En revanche, la surexpression d'un mutant constitutivement actif d'ATF2 (8) était suffisant pour induire la transcription AARE dépendante et non celle des mutants de l'AARE ne répondant pas à la carence en leucine (Fig. 8). De la même manière, la capacité d'ATF2 à se lier à un mutant de l'AARE dépend de sa capacité à induire la transcription lors de la carence en leucine (Fig. 8). Ce travail a également mis en évidence que la régulation de l'expression de CHOP par ATF4 et ATF2 était partagée par plusieurs gènes dont l'expression est régulée par la carence en leucine. Sur les 7 gènes étudiés, 5 montraient une dépendance partielle ou totale à ATF2 et 7 une dépendance partielle ou totale à ATF4 (JBC Fig.7).

Le rôle d'ATF2 a été par la suite étudié plus en détail par Alain Bruhat qui a mis en évidence que ce facteur jouait un rôle clé dans l'activation de la transcription AARE dépendante du gène CHOP via son activité histone acétyl-transférase (9). Il se posait également la question de la voie de signalisation impliquée dans la phosphorylation d'ATF2 en réponse à la carence en leucine. Les travaux de Cédric Chaveroux ont permis de caractériser cette voie qui implique les MAP kinase MEKK1/MKK7/JNK2 en aval des GTPase Rac1/cdc42 et de la protéine  $\alpha$ 12 (10). Toutefois, le senseur du niveau d'acides aminés impliqué dans l'activation de cette voie n'a pas été identifié. Concernant ATF4, nos travaux et ceux de M. Kilberg ont contribué à établir qu'ATF4 joue un rôle central dans la régulation de l'expression des gènes lors d'une carence en acides aminés (11). Les travaux de M. Kilberg reposaient sur l'étude de la régulation du gène asparagine synthétase par la carence en histidine. Le promoteur de ce gène comporte un élément de réponses désigné sous le terme de NSRE1 (Nutrient Sensing Response Element 1) similaire à l'AARE (Fig. 2). Ce type de séquence est également désigné sous le terme de séquence CARE (C/EBP ATF Response Element). Des travaux de l'équipe ont montrée par la suite qu'ATF4 était impliqué dans la régulation de la majorité des gènes dont l'expression est induite lors d'une carence en leucine (12).

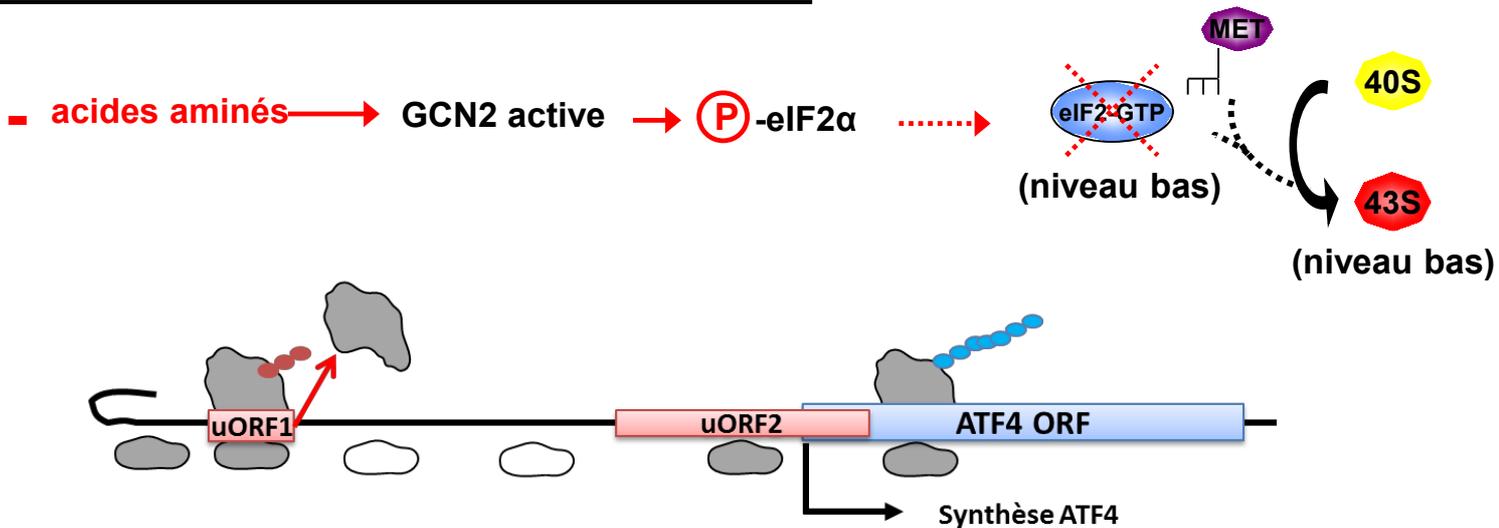
### De GCN4 à l'Integrated Stress Response (ISR)

Au-delà du contexte de la carence en acides aminés, ATF4 joue un rôle majeur dans la réponse à de nombreux type de stress (13,14). ATF4 fait partie de la famille de facteurs de

## En présence d'acides aminés:



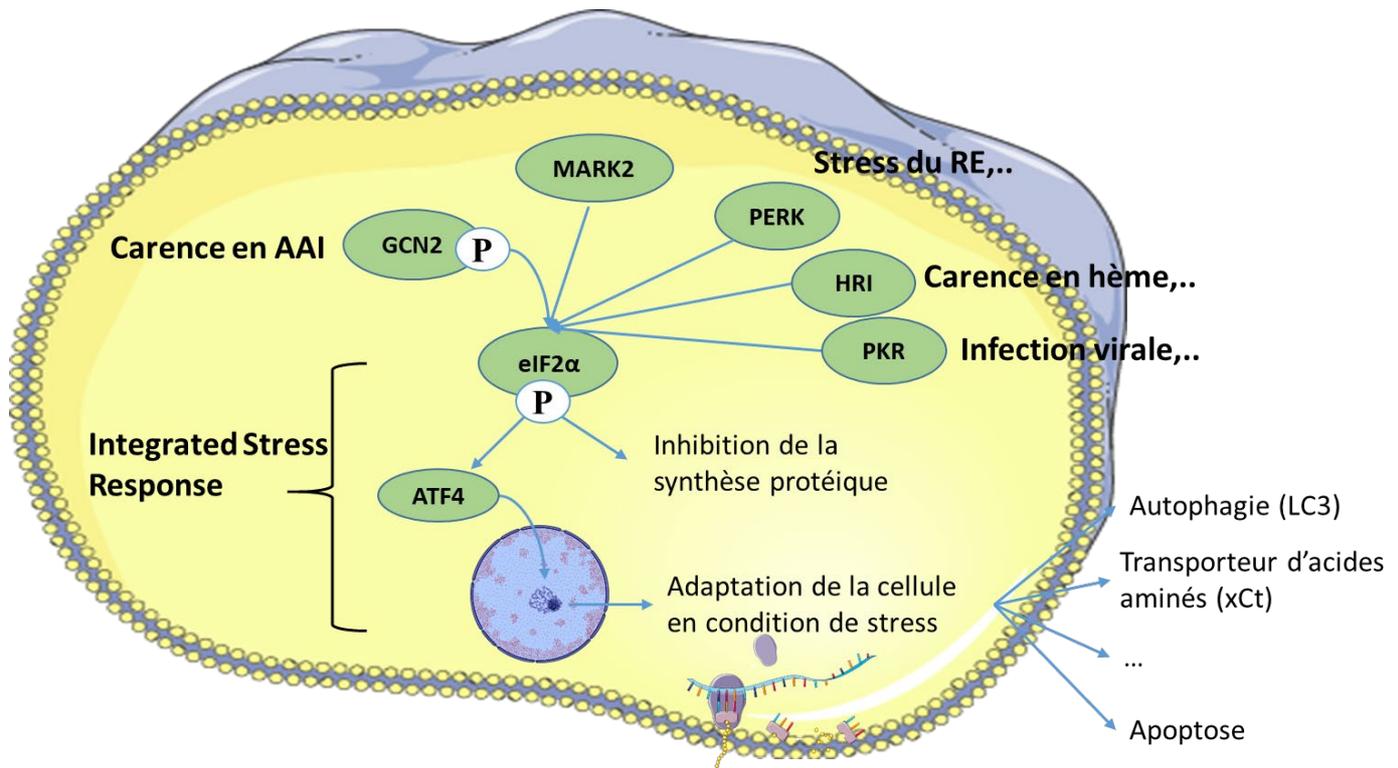
## Au cours d'une carence en acides aminés:



**Figure 9:** La régulation de la traduction d'ATF4 chez les mammifères:

En présence d'acides aminés, 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'eIF2α 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.

transcription ATF caractérisé par un domaine basic leucine zipper. Néanmoins, il se définit peut-être plus en tant qu'orthologue du facteur de transcription de levure GCN4. Ce dernier joue un rôle majeur dans l'adaptation du métabolisme des acides aminés chez la levure en fonction de la disponibilité en acides aminés (15). Il faut savoir que chez la levure, la notion d'acides aminés indispensables n'existe pas dans la mesure où elle peut synthétiser *de novo* n'importe quel acide aminé. Ces processus de synthèse sont en partie sous la dépendance de gènes régulés par GCN4 (15). Des expériences de mutagenèse aléatoire ont permis de caractériser la régulation de l'expression de GCN4. Elle implique un mécanisme traductionnel relativement complexe qui met en jeu l'inhibition de la traduction lorsqu'un acide aminé vient à être déficient. Cette régulation implique la kinase GCN2 (16) et le facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$  (17), cette régulation est conservée chez les mammifères (18). La détection du déficit en acide aminé est médiée par le niveau de charge des ARNt. En effet, lors d'un déficit en acides aminés et plus particulièrement en acides aminés indispensables chez les mammifères, le niveau d'ARNt non chargé va augmenter. Il s'avère que la kinase GCN2 possède un domaine histidyl-tRNA synthetase-related qui est capable de fixer les ARNt non chargés (19). Cette fixation va provoquer un changement de conformation de GCN2 entraînant sa dimérisation et l'induction de son activité kinase (20). Elle va phosphoryler sa cible, la sous unité alpha du facteur d'initiation eIF2 sur la sérine 51. Cette phosphorylation va aboutir à l'inhibition de l'activité GTPase d'eIF2B entraînant l'inhibition du recyclage du GDP en GTP au niveau du facteur eIF2 (14). Sous sa forme GDP, eIF2 ne peut plus promouvoir la formation du complexe ternaire de l'initiation et il s'en suit une inhibition de la synthèse protéique. Cette inhibition va également entraîner la traduction spécifique de certains ARNm et en particulier, celui codant pour GCN4 chez la levure (21) et ATF4 chez les mammifères (22). Pour ce dernier, cette régulation implique deux uORFs dont le second est chevauchant avec le cadre de lecture codant pour ATF4, le mécanisme est décrit dans la Figure 9. Chez la levure, il n'existe qu'une kinase capable de phosphoryler eIF2 $\alpha$  (GCN2) mais en revanche, d'autres kinases capables de phosphoryler eIF2 $\alpha$  sont apparues au cours de l'évolution. Chez les mammifères, on compte 3 autres kinases capables de phosphoryler eIF2 $\alpha$  et d'entraîner ainsi la traduction d'ATF4, il s'agit de PERK, PKR et HRI. Cette dernière a été caractérisée comme induisant la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  lors d'un déficit en hème (23). La kinase PKR a été identifiée à la même époque comme une kinase d'eIF2 $\alpha$  activée par l'interféron ou les ARN double brin (24). En 1999, PERK a été clonée comme étant la kinase impliquée dans la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  lors d'un stress du réticulum endoplasmique par le laboratoire de David Ron (25). Cette même équipe a mis en évidence et caractérisé la régulation traductionnelle d'ATF4 via la

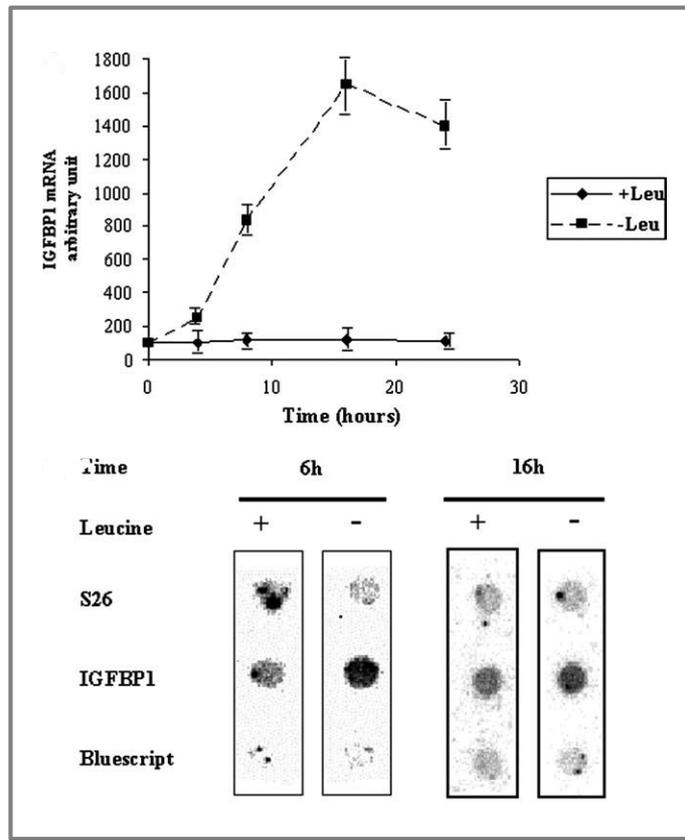


**Figure 10:** l'ISR et les 5 kinases pouvant phosphoryler eIF2α  
 concernant MARK2 une seule publication a démontré qu'elle était capable de phosphoryler eIF2α

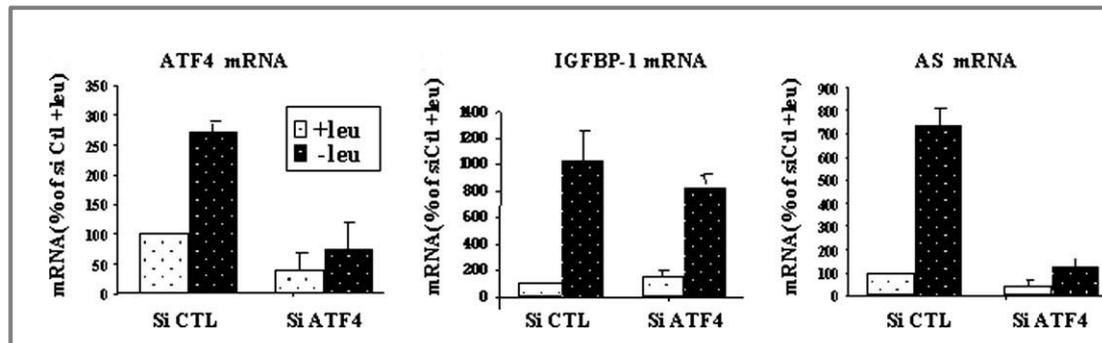
phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  par les kinases PERK et GCN2(18,22). De par la variété des types de stress pouvant conduire à la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et de par l'importance d'ATF4 dans l'adaptation à ces stress, ils ont nommé cette voie Integrated Stress Response (ISR) (13) (Fig. 10). Cette voie de réponse au stress inclue également d'autres facteurs dont l'ARNm présentent la même régulation qu'ATF4 (14) . Toutefois, la plupart des études se concentrent sur le rôle d'ATF4, ce dernier régule l'expression de gènes qui sont en faveur de la survie cellulaire mais également des gènes qui vont favoriser l'apoptose. Parmi les gènes régulés par ATF4, GADD34 a un rôle bien spécifique, il code pour une phosphatase d'eIF2 $\alpha$  qui va permettre un rétrocontrôle négatif de la voie en levant l'inhibition de la synthèse protéique (26). Théoriquement, la balance survie/apoptose va dépendre de la durée et de l'intensité du stress. L'ISR est impliquée dans un grand nombre de fonctions physiologiques et de situations pathologiques dont l'immunité, la plasticité synaptique, le diabète ou encore le cancer (14,27). Si l'étude de PERK et du stress du réticulum endoplasmique constitue la grande majorité des travaux, d'autres études définissent de nouveaux aspects majeurs de l'ISR. En particulier, il peut être citée l'identification d'une 5<sup>ème</sup> kinase capable de phosphoryler eIF2 $\alpha$  : MARK2 (28). Cette kinase est connue pour son rôle dans la stabilité des microtubules (29). Les auteurs ont identifié MARK2 comme une kinase d'eIF2 $\alpha$  dans le contexte d'un stress protéotoxique consécutif à une inhibition du protéasome par du MG132. Pour valider leur résultat, ils ont notamment utilisé une lignée de MEF invalidé pour les 4 kinases (GCN2, PERK, HRI et PKR) dans laquelle ils ont invalidé MARK2. Il peut être également mentionné les études simultanées de Guo *et al* (30) et Fessler *et al* (31) qui ont démontré que la kinase HRI contribuait à activer l'ISR dans le contexte d'un stress mitochondrial.

### Régulation de la stabilité d'un messager par la carence en leucine, l'exemple d'IGFBP1.

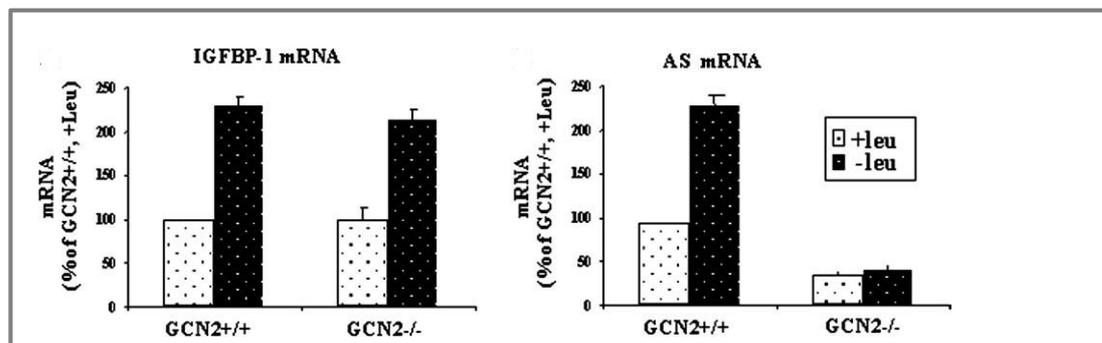
L'autre partie de mes travaux était consacrée à l'étude des mécanismes de régulation de l'expression du gène IGFBP-1 par la carence en acides aminés. Le choix d'étude de ce gène se justifie du fait de son rôle physiologique lors d'une sous-nutrition protéique. Chez l'individu jeune soumis à une carence prolongée en protéines, une diminution de la concentration en acides aminés plasmatiques est observée. Dans ces conditions, il a été montré une très forte surexpression d'IGFBP-1 conduisant à un retard de croissance (32). IGFBP-1, membre de la famille des IGFBPs, est exprimée chez l'adulte au niveau des cellules hépatiques ainsi qu'au niveau du rein. Une fois exprimée, la protéine IGFBP-1 peut se lier aux IGFs (Insulin like Growth Factor) et de ce fait, inhiber leurs effets trophiques et métaboliques (33). IGFBP-1 est



**Figure 11:** Induction of IGFBP-1 expression by leucine starvation. HepG2 cells were incubated in DMEM or in DMEM lacking leucine and harvested for RNA isolation after the indicated incubation time. Quantitative RTPCR analysis were performed. Effect of leucine starvation on IGFBP-1 transcription. Nuclear run-on analysis of IGFBP-1 transcription: HepG2 cells were incubated for 6 and 16 h in DMEM control medium or in DMEM lacking leucine. Then nuclei were isolated and run-on experiments were performed. <sup>32</sup>P-labeled RNA isolated from HepG2 cells were hybridized to filter-bound DNAs encoding ribosomal S26, IGFBP-1 and bluescript vector.



**Figure 12:** HepG2 cells were transfected with ATF4 siRNA (siATF4) or control siRNA (siCTL). Two days after siRNA transfection, cells were incubated for 16 h in DMEM (+leu) or in DMEM lacking leucine (leu) and then harvested. RNA were then extracted. mRNA levels were quantified by real-time RT-PCR.

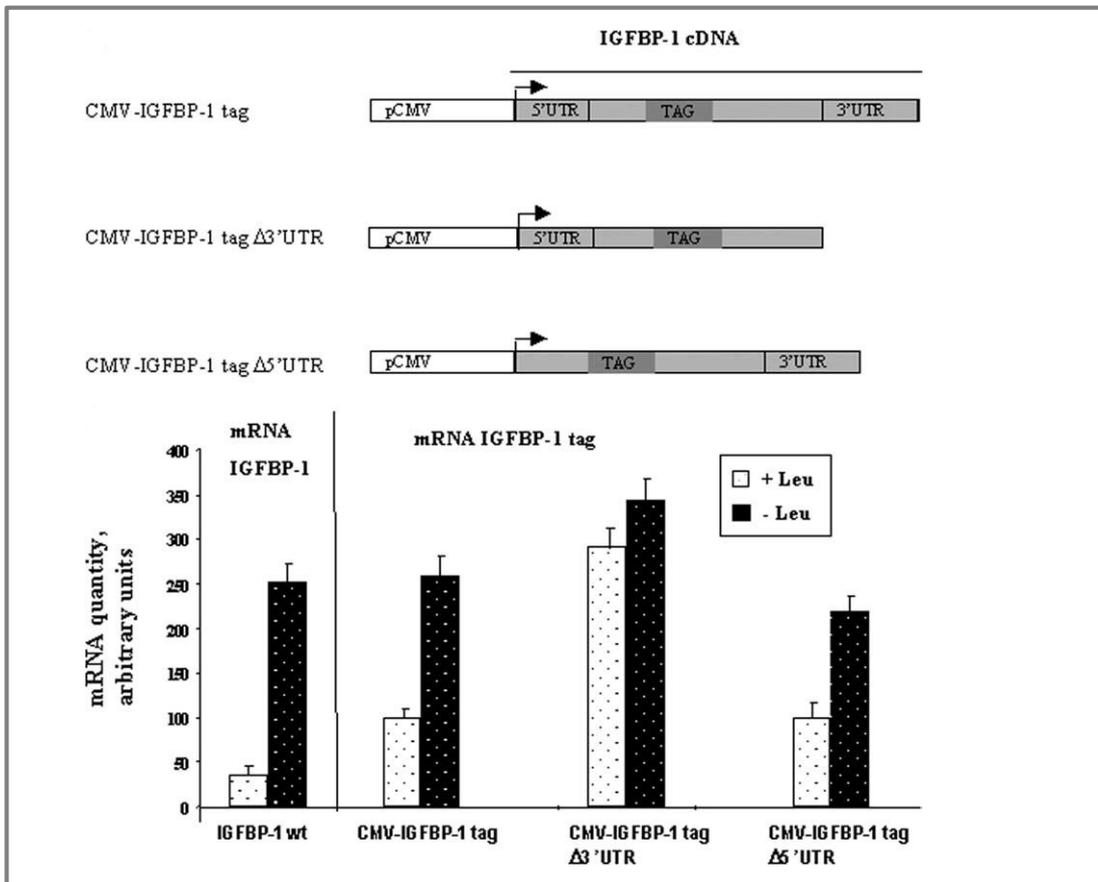


**Figure 13:** Primary culture of isolated hepatocytes from GCN2<sup>-/-</sup> and <sup>+/+</sup> mice were used. After isolation, cells were plated in 6 cm dishes and cultured for 2 days. Then, cells were incubated for 16 h in DMEM (+leu) or in DMEM lacking leucine (leu) and harvested for mRNA determination

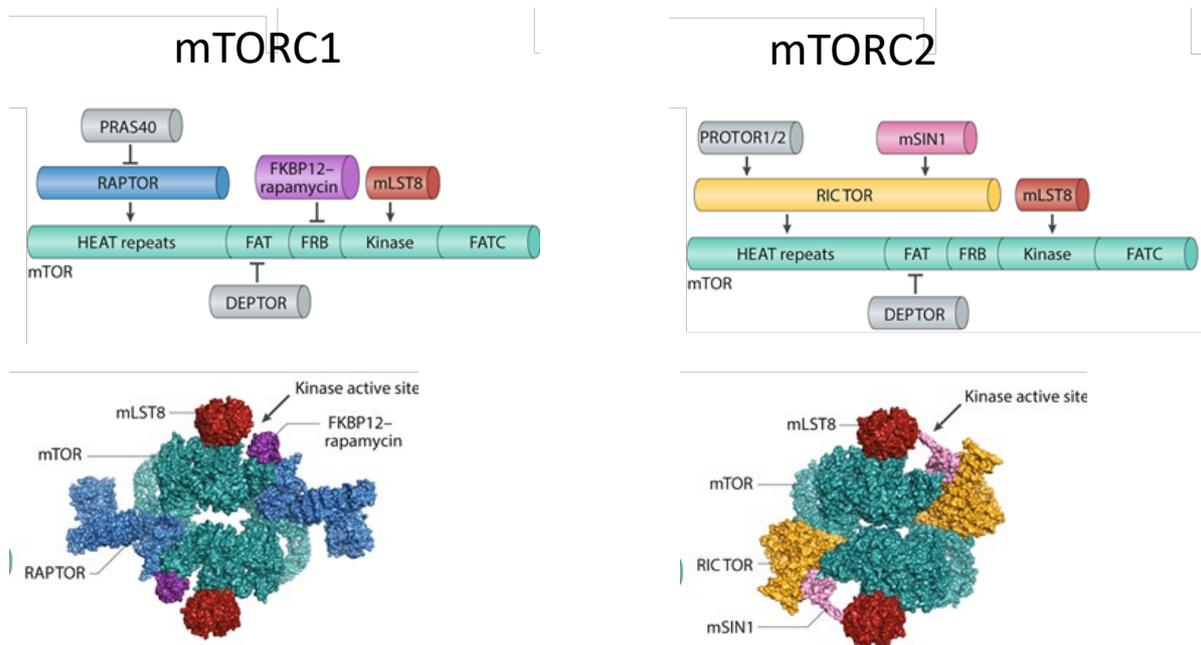
notamment régulée par l'hormone de croissance et l'insuline et son expression varie très rapidement en fonction de l'état nutritionnel.

Nous avons pu mettre en évidence dans des cellules hepG2 une forte induction du niveau d'ARNm d'Igfbp-1 lors d'une carence totale en leucine dès 4 heures (Fig. 11). Cette augmentation du niveau d'ARNm est en partie attribuable à une augmentation modérée de la transcription qui a pu être observée par run-on après 6 heures de carence (Fig. 11). Nous avons testé également différents fragments de promoteurs clonés en amont du gène rapporteur luciférase. Aucun de ces fragments n'a conféré une régulation de l'expression de la luciférase par la carence en leucine (non publié). Cette augmentation de la transcription n'implique pas ATF4. En effet, l'augmentation de la quantité d'ARNm d'IGFBP-1 est toujours observée dans des cellules Hepg2 transfectées avec des siRNA dirigés contre ATF4 (Fig. 12). Nous avons également testé si la kinase GCN2 était impliquée dans la régulation d'IGFBP-1. Des hépatocytes isolés ont été réalisés à partir de souris sauvages et de souris GCN2 KO qui nous avait été procurées par David Ron à la fin de ma thèse. De manière cohérente, GCN2 n'est pas impliquée dans l'augmentation du message d'IGFBP-1 contrairement à celui d'Asns (Fig. 13). L'augmentation relativement faible de la transcription a conduit à formuler l'hypothèse qu'un mécanisme de stabilisation pourrait être impliqué dans l'augmentation de la quantité d'ARNm d'Igfbp-1. Pour cela, différents fragments de l'ARNm d'IGFBP-1 tagué ont été clonés en aval d'un promoteur CMV dont l'activité n'est pas impactée par la carence en leucine. Ces constructions ont permis de mettre en évidence que la carence en leucine augmentait la stabilité de l'ARNm d'Igfbp-1 par un mécanisme impliquant la région 3'UTR (untranslated region) (Fig 14). Cette dernière comporte plusieurs ARE (AU rich Element), ce type de séquence joue un rôle majeur dans la régulation de la stabilité des ARNm en étant le site d'interaction avec des protéines impliquées dans la dégradation des ARNm. Nous n'avons pas été en mesure de caractériser l'ARE impliqué dans la régulation de la stabilité de l'ARNm d'Igfbp-1 par la carence en leucine. Les résultats de mes travaux ont permis de conclure que la carence en acides aminés affectait principalement le niveau d'expression d'IGFBP-1 via la stabilisation de son ARNm.

A la suite de mes travaux, une équipe a mis en évidence dans le promoteur d'Igfbp1 la présence (-6682/-6384) d'un élément de réponse de type ATF composite (34). Cet élément est impliqué dans l'induction de la transcription d'Igfbp1 en réponse à un stress du réticulum endoplasmique. Ils ont également démontré qu'ATF4 était impliqué dans cette régulation. Durant mes travaux, cette partie du promoteur n'a pas été testée. En revanche, nos données obtenues avec les siRNA d'ATF4 et les hépatocytes primaires de souris GCN2 KO suggèrent



**Figure 14:** Schematic representation of the cDNAs used to study mRNA stability. The arrow indicates the start site for transcription. The tag is represented by a shaded box. HepG2 cells were transiently transfected with the constructs described in (A). Twenty four hours after transfection, cells were incubated for 8 h in DMEM medium (+leu) or in DMEM lacking leucine (-leu) and then harvested for RNA extraction. The endogenous and tagged IGFBP-1 mRNA levels were quantified by real-time RT-PCR using the appropriate primers.



**Figure 15:** Représentation Schématique des complexes mTORC1 et mTORC2 (Liu et al Nat Rev Mol Cell Biol. 2020)

que l'élément de réponse identifié ne contribue pas à la régulation d'Igfbp1 dans le contexte de la carence en leucine. Depuis, la régulation d'IGFBP-1 par la carence en acides aminés n'a toujours pas été élucidée.

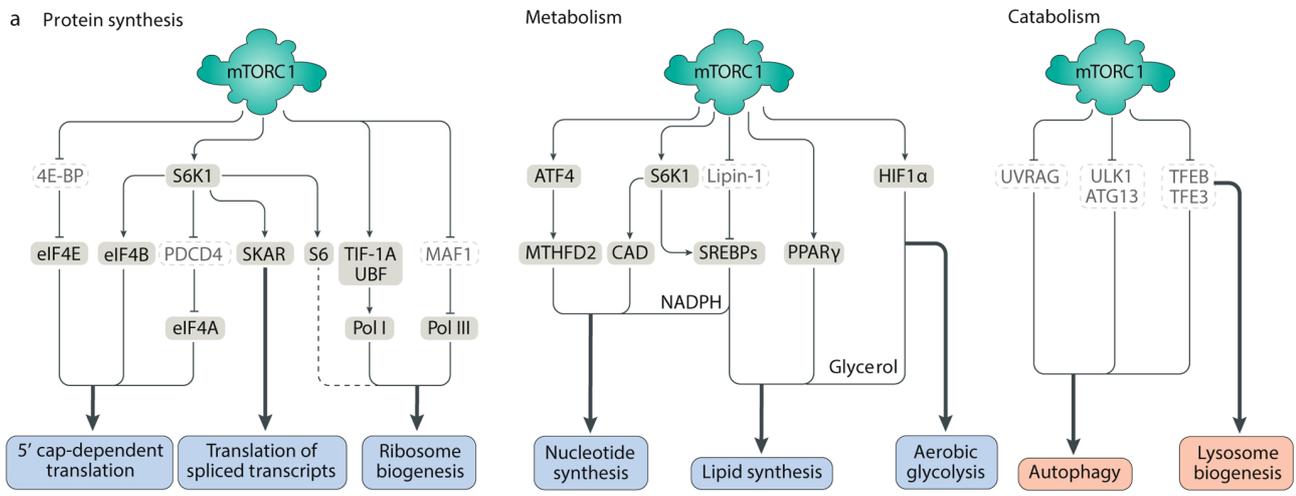
## Post-doctorat (2004-2005)

### Régulation de la traduction par les acides aminés : Etude de la kinase mTOR

J'ai effectué mon post-doctorat dans le laboratoire du Pr Christopher Proud à l'Université de Colombie Britannique à Vancouver (Canada). La thématique de ce laboratoire est centrée sur l'étude de la régulation de la traduction. Il s'agissait donc d'avoir une formation complémentaire aux niveaux techniques et thématiques (transcription et traduction) tout en gardant un point commun qui est l'effet des acides aminés comme molécule "signal". En effet, une partie des recherches de ce groupe est focalisée sur la protéine mTOR (mammalian Target Of Rapamycin). Cette protéine kinase majeure, régulée par les acides aminés et par l'insuline, est impliquée dans la régulation de la synthèse protéique, de la croissance et de la prolifération cellulaire (35).

### De mTOR à mTORC1

La protéine mTOR a été clonée en 1994 par plusieurs laboratoires (36,37). Il a été mis en évidence qu'elle jouait un rôle majeur dans la régulation de la traduction en phosphorylant les protéines S6K1 et 4E-BP1 en fonction des niveaux d'acides aminés et de facteurs de croissance. Tout comme son homologue chez la levure, mTOR peut participer à deux complexes protéiques différents : mTORC1 (mTOR complexe 1) et mTORC2 (mTOR complexe 2) (Fig. 15). Communément, lorsqu'il est fait mention de l'activité de mTOR sans autres précisions, il s'agit de l'activité de mTORC1. Cette dernière est sensible à la rapamycine, cette sensibilité lui est conférée par la protéine RAPTOR dont l'identification a permis de définir le complexe 1 (38). Les autres protéines participant au complexe sont PRAS40 DEPTOR et mLST8 (35). Le complexe 2 a été caractérisé grâce à l'identification de RICTOR (39). Les autres partenaires sont mSIN1, DEPTOR, PROTOR et mLST8. L'activité de mTORC2 est insensible à la rapamycine. La première cible du complexe 2 qui a été identifiée est la sérine 473 d'Akt (39), l'activité kinase pour ce site avait été longtemps recherchée. mTORC2 a également été impliqué dans la régulation du cytosquelette (40). Concernant mTORC1, de nombreuses nouvelles cibles ont été identifiées depuis sa caractérisation et de très nombreuses fonctions cellulaires et physiologiques sont contrôlées par son activité (41) (Fig. 16).



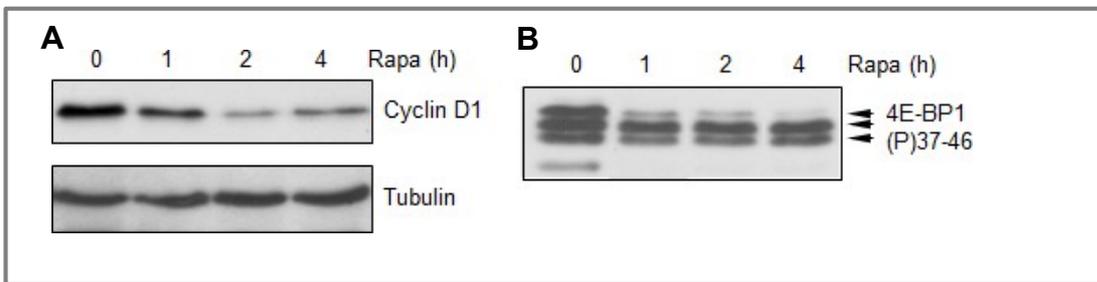
**Figure 16:** Cibles et fonctions mTORC1 (Liu et al Nat Rev Mol Cell Biol. 2020)

C'est le rôle de mTORC1 dans la régulation de la synthèse protéique qui a été initialement le mieux caractérisé (42). mTORC1 joue un rôle prépondérant dans l'étape d'initiation de la traduction et dans la biogénèse des protéines ribosomales. Ces effets sont en partie médiés par deux cibles de mTOR : S6K1 (S6 Kinase 1) et 4E-BP1 (Eukaryotic initiation Factor 4E Binding Protein-1) (43). S6K1 était communément décrite comme étant impliquée dans la traduction des 5'-TOP (5' terminal oligopyrimidine tract) mRNA qui codent pour des protéines ribosomales et des facteurs d'élongation (44). Ce postulat s'est révélé inexact par la suite (45). D'autres études ont démontré que S6K1 possédait d'autres substrats tel que IRS-1 (46) ou eIF4B (47). La protéine 4E-BP1 séquestre le facteur d'initiation de la traduction eIF4E, l'empêchant ainsi de former le complexe d'initiation de la traduction eIF4F (48). Il a été démontré que la traduction de certains ARNm est hautement dépendante de ce complexe. Une partie de ces ARNm code pour des oncogènes, cela expliquant le fait que la surexpression d'eIF4E peut induire la transformation cellulaire (49). L'expression de ces ARNm est donc fortement voire totalement inhibée lorsque 4E-BP1 séquestre eIF4E. Ce phénomène expliquait en partie l'intérêt croissant pour les inhibiteurs de mTORC1 dans la lutte contre le cancer dans le milieu des années 2000. Néanmoins, il existait encore des lacunes dans la connaissance des mécanismes de la régulation de 4E-BP1 par mTORC1. Un certain nombre d'évidences suggèrent qu'il existerait une protéine kinase, autre que mTOR, capable de réguler l'activité de 4E-BP1. Une telle protéine kinase pouvait non seulement constituer une nouvelle cible thérapeutique dans le cadre de la lutte contre le cancer mais aussi une autre cible potentielle des nutriments et hormones pour la régulation de la protéosynthèse.

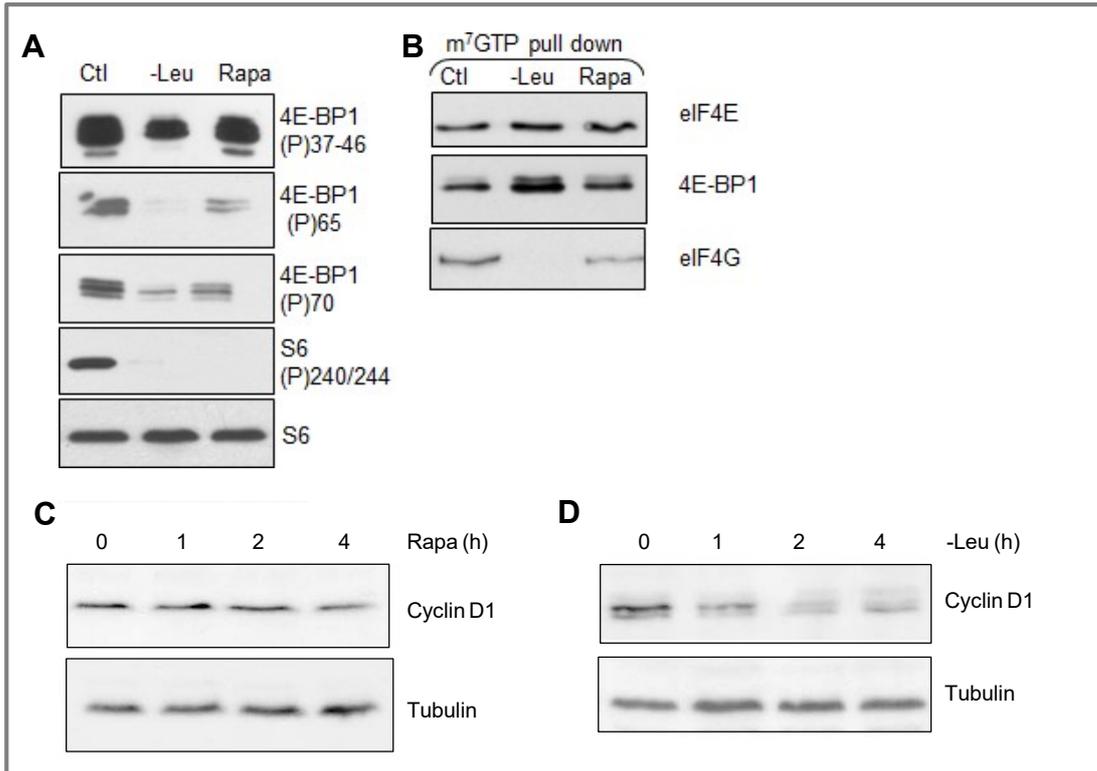
### Projet de recherche et résultats

Mon principal projet de recherche a donc consisté à identifier une nouvelle kinase impliquée dans la régulation de 4E-BP1. Ce projet faisait appel à des techniques de biochimie et de purification par chromatographie. Des premiers résultats encourageant ont été obtenus, montrant qu'une activité kinase autre que celle de mTOR était capable de phosphoryler 4E-BP1 *in vitro*. Toutefois, je n'ai pas eu le temps de procéder à l'identification puis à la caractérisation de cette activité. En effet ce genre d'approche est relativement longue à mettre en place et à aboutir (2 à 3 ans) et l'obtention du concours de Chargé de Recherche après 9 mois de post-doctorat a donc modifié les priorités de recherche en conséquence.

Durant les quelques mois qu'il me restait, j'ai initié un autre projet de recherche. Plusieurs études avait mis en évidence l'importance de l'activité de mTOR dans la régulation de l'expression de la cycline D1. Il avait été notamment démontré que le traitement à la

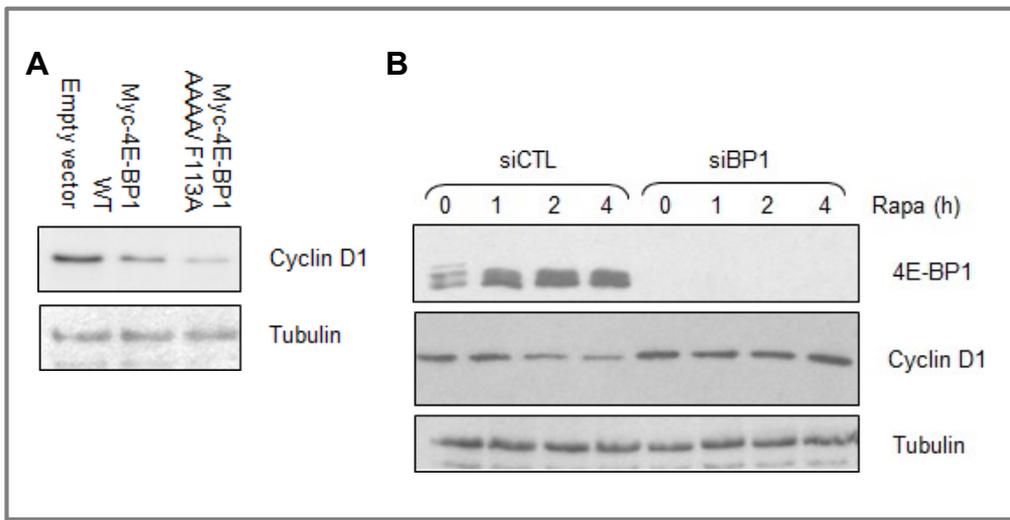


**Figure 17:** (A) MCF7 cells were treated with 100 nM rapamycin for the indicated times. Cell lysates were analysed by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE)/western blotting using antisera for cyclin D1 and tubulin (as loading control). (B) As shown in (a), western blotting using antisera for phospho-4E-BP1 (Thr37/46). 4E-BP1 runs as several distinct bands (a–g; indicated by arrowheads), the fastest moving one (a) being the least phosphorylated.

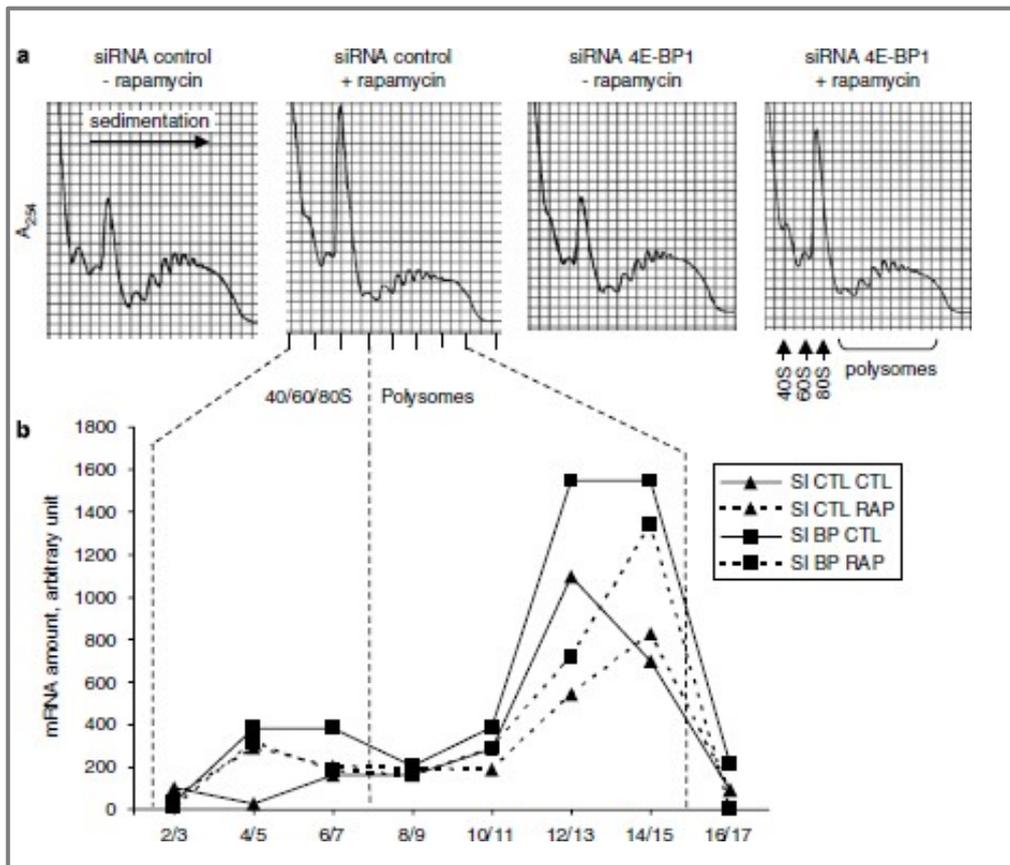


**Figure 18:** (A) HEK293 cells were starved of leucine or treated with 100 nM rapamycin for 2 h. Samples of total protein extract (30 mg) were analysed by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE)/western blotting using the indicated antisera. Arrows labeled a–g denote differentially phosphorylated forms of 4E-BP1, while the starred arrow indicates 4E-BP2, which cross-reacts with the (P)Thr37/46 antibody. (B) As shown in (A). Proteins isolated on  $m^7$ GTP-Sepharose were analysed by SDS–PAGE/western blotting using the indicated antisera. Quantification of the data is presented below, normalized to the signal for eIF4E (arbitrary units,  $t_0 \frac{1}{4} 100$ ). (c, d) HEK293 cells were treated with 100 nM rapamycin (C) or starved of leucine (D) for the times indicated. Total protein (30 mg) was analysed by SDS–PAGE/western blotting for cyclin D1 and tubulin (loading control).

rapamycine induisait une diminution de l'expression de cette cycline et cela, en accord avec l'arrêt en G1/S observé lors d'un tel traitement (50). Par ailleurs, une étude avait également mis en évidence que la surexpression d'eIF4e entraînait la surexpression de la cycline D1 (51). Cet effet reposerait sur le fait que la région 5'UTR de la cycline D1 présente une structure relativement complexe qui nécessiterait un haut niveau d'initiation pour permettre sa traduction. Ces observations m'ont conduit à formuler l'hypothèse que la protéine 4E-BP1 jouait un rôle majeur dans la régulation de la cycline D1 par l'activité de mTORC1. Dans des cellules tumorales mammaires MCF7, j'ai confirmé que le traitement à la rapamycine inhibait l'expression protéique de la cycline D1 et la phosphorylation de 4E-BP1 (Fig. 17) sans affecter le niveau d'ARNm. Dans les cellules HEK 293, il s'avère que la rapamycine n'exerce qu'un effet partiel sur la phosphorylation de 4E-BP1, les sites thr37/46 n'étant que faiblement affectés, tandis que la phosphorylation de S6K1 est efficacement inhibée comme en témoigne l'absence de phosphorylation de la protéine S6 (Fig. 18). En revanche, la carence en leucine entraîne une inhibition plus importante de la phosphorylation de 4E-BP1. Cette différence d'effet entre la rapamycine et la carence en leucine se traduit en terme de fonctionnalité de 4E-BP1, à savoir la formation du complexe d'initiation eIF4F. En effet, des expériences de m7GTP pull down (le m7GTP a la propriété de se lier à eIF4E) montrent que la leucine favorise l'interaction d'eIF4e avec 4E-BP1 au détriment de la fixation avec eIF4G, un des constituant du complexe eIF4F. De manière intéressante, cet effet moindre de la rapamycine sur 4E-BP1 dans ce type cellulaire est associé à une absence d'effet de cette drogue sur le niveau d'expression de la cycline D1, tandis que la carence en leucine inhibe l'expression de la cycline D1 (Fig. 18). Ces résultats montrent bien une association entre le niveau de phosphorylation de 4E-BP1 et le niveau de cycline D1. Afin de déterminer si 4E-BP1 était impliquée dans la régulation de l'expression de la cycline D1, nous avons procédé à des expériences de surexpression et de knock-down. La surexpression de 4E-BP1 ou d'un mutant non phosphorylable a entraîné une diminution du niveau de cycline D1. Réciproquement, le knock-down de 4E-BP1 a aboli la régulation de l'expression de la cycline D1 par la rapamycine (Fig. 19). Dans cette même expérience, l'association de l'ARNm de la cycline D1 avec les polysomes a été étudiée (Fig. 20). Le knock-down de 4E-BP1 entraîne une augmentation de la quantité d'ARNm de la cycline D1 associée au polysome que ce soit en condition contrôle ou lors du traitement à la rapamycine. Ce résultat confirme l'importance de 4E-BP1 dans la traduction de la cycline D1.



**Figure 19:** (A) HEK293 cells were transfected with the indicated vectors (AAAA/F113A mutant of 4E-BP1 lacks regulatory motifs essential for its phosphorylation). Cells were harvested, 24 h later. Samples of total protein (30 mg) were analysed by SDS-PAGE/western blotting for cyclin D1 and tubulin. (B) MCF7 cells were transfected with control siRNA or siRNA directed against 4E-BP1. Cells were treated with 100 nM rapamycin for the indicated times. Total protein (30 mg) was analysed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)/western blotting for 4E-BP1.



**Figure 20:** MCF7 cells, or MCF7 cells in which 4E-BP1 had been knocked down by siRNA, were treated with rapamycin where indicated (100 nM, 2 h). (a) Cell lysates were subjected to sucrose density centrifugation. Absorbance (254 nm) of the displaced gradient was monitored and fractions were collected. Positions of 40, 60 and 80S ribosomal particles and polysomes are indicated. (b) Fractions (paired as indicated) were analysed by real-time RT-PCR for cyclin D1 mRNA.

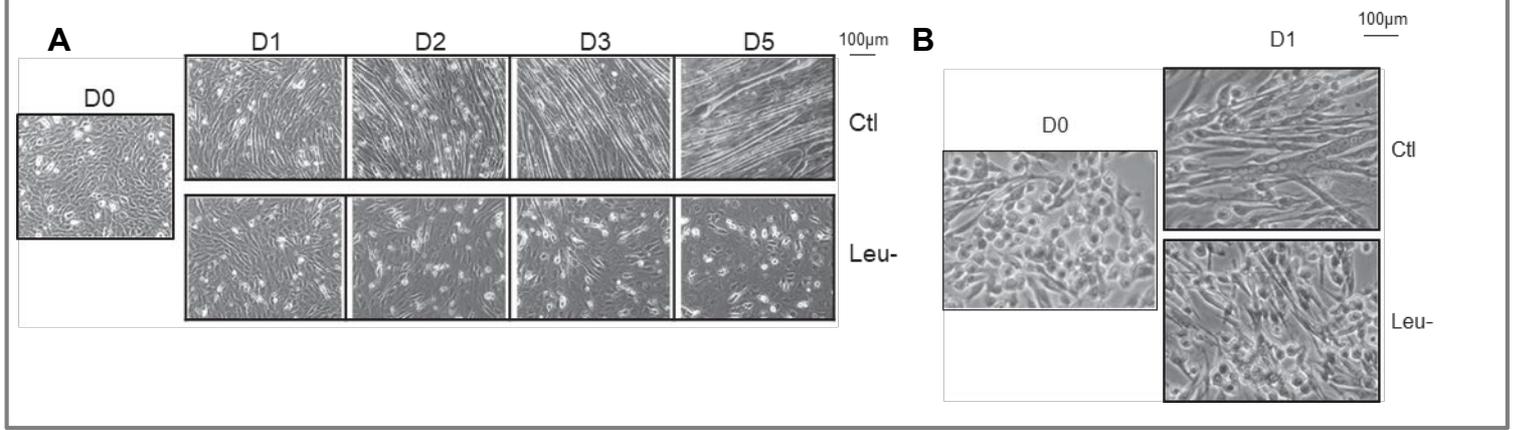
Le rôle de mTORC1 dans la traduction d'ARNm spécifiques a été par la suite déterminé plus précisément. La traduction des TOP mRNA a plus particulièrement été étudiée. Il a été mis en évidence que la protéine LARP1, une cible directe de mTOR, jouait un rôle majeur dans cette régulation (52,53). Ce mécanisme explique la très forte inhibition de la synthèse de ces TOP mRNA lors d'un traitement à la rapamycine, alors que la synthèse protéique générale n'est inhibée que partiellement. En revanche, la notion que la traduction des ARNm présentant une 5'UTR longue et structurée soit dépendante de mTOR a été débattue (54,55). Toutefois, les travaux de Gandin *et al* ont permis de confirmer cette hypothèse (56).

### Chargé de recherche INRAE Equipe NSP (2006-2009)

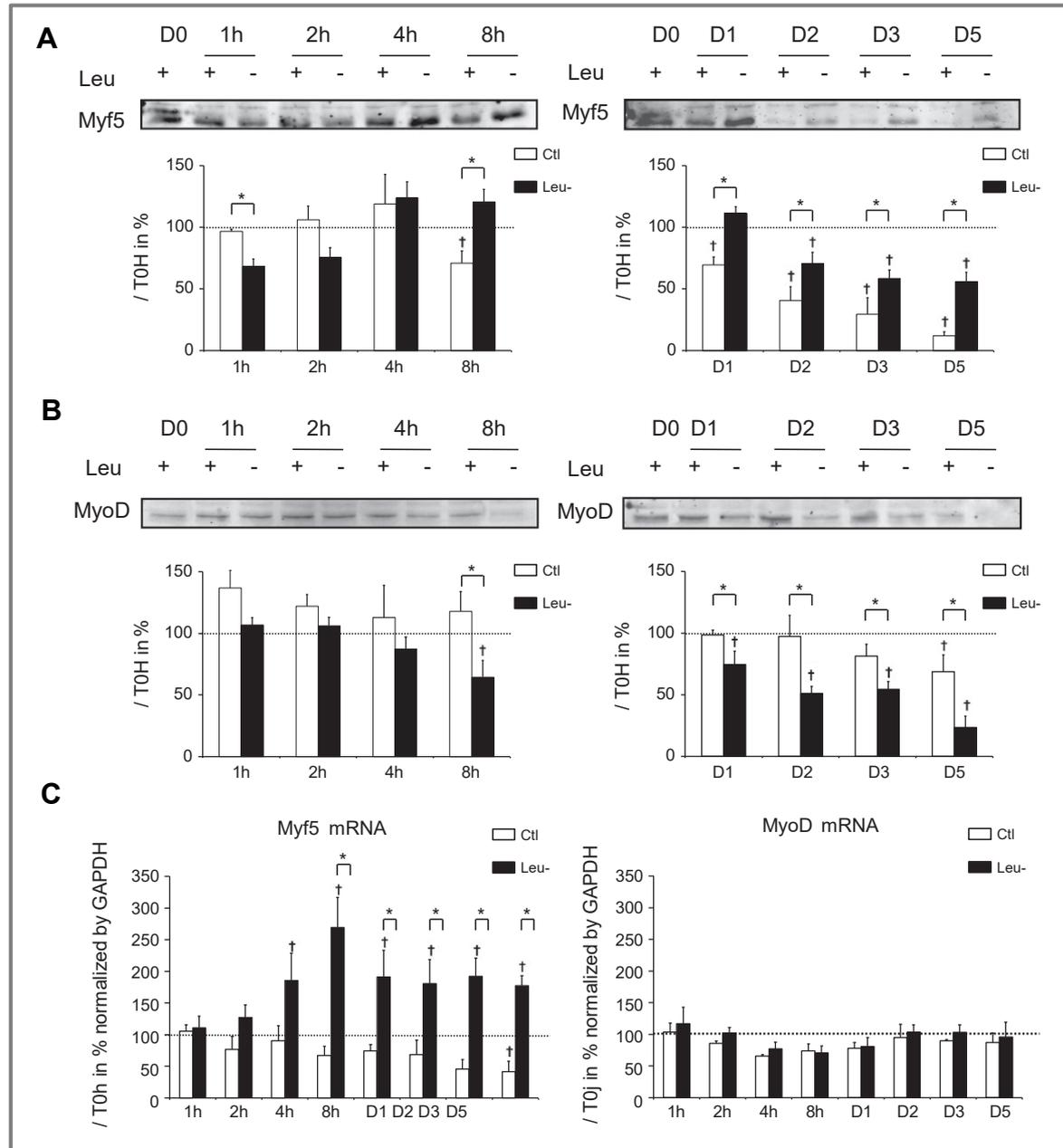
Mon profil m'a permis de concourir à un poste de CR2 INRA au sein de l'Unité de Nutrition Humaine (UNH) en 2005. Suite à l'obtention du poste, j'ai pris mes fonctions en 2006. Ce poste était rattaché à l'équipe Nutrition et Signaux Protéique (NSP) dirigée par D. Dardevet. La thématique de cette équipe était centrée sur le rôle du métabolisme protéique dans la régulation de la masse musculaire. L'un des objectifs était de caractériser les mécanismes impliqués dans la fonte musculaire liée au vieillissement, la sarcopénie, et de proposer des stratégies nutritionnelles de prévention (57). Dans cet objectif, j'ai initié un projet de recherche s'intéressant à l'impact des acides aminés sur la différenciation musculaire.

### Impact de la carence en acides aminés sur la différenciation des cellules satellites musculaires

J'ai initié ce projet en 2007. Il s'inscrit dans la compréhension de l'effet signal des acides aminés dans le maintien et la régulation de la masse musculaire. Ce projet a permis d'établir une collaboration avec Jean-Charles Gabillard (LPGP, INRAE) et Iban Seilliez (NuMeA, INRAE). Ce projet abordait cette problématique sous un angle nouveau. En effet, les travaux de l'équipe ainsi que de nombreux autres laboratoires, se sont intéressés à l'effet signal des acides aminés, en particulier la leucine, sur la régulation de la synthèse protéique musculaire, notamment via la voie mTOR (58,59). Cependant, il est important de considérer que d'autres mécanismes cellulaires participent à la régulation et au maintien de la masse musculaire. Parmi eux, la régénération musculaire joue un rôle prépondérant, elle permet le renouvellement des fibres endommagées ou atrophiées à la suite d'une lésion ou d'un épisode catabolique (60). Ce processus implique un type cellulaire particulier : les cellules satellites. Il s'agit de cellules mononuclées et quiescentes, situées en périphérie des fibres musculaires, sous la lame basale. Lors du processus de régénération, les cellules satellites activées vont proliférer puis s'engager dans le programme de différenciation conduisant à la fusion des cellules satellites entre elles ou



**Figure 21:** Contrast phase microscopy. (A) Confluent C2C12 myoblasts were cultured in differentiation media (DM) containing 2% of horse serum in the presence (Ctl) or absence (Leu-) of leucine for 0, 1, 2, 3 and 5 days of differentiation. (B) Satellite cells were cultured in DM in presence or absence of leucine for 0, 2, 8 and 24 h of differentiation.



**Figure 22:** Confluent C2C12 myoblasts were cultured in differentiation media (DM) containing 2% of horse serum in the presence (Ctl) or absence (Leu-) of leucine for 0, 1, 2, 4, 8 h and 1, 2, 3 and 5 days of differentiation. A) The level of myf5 was measured by western blot analysis from total protein extract resolved on SDS PAGE and transferred on nitrocellulose membrane. For western blot quantification (n=3), data were normalized to the value of a distinct Ponceau-stained band and expressed in % of the time 0 h. B) The level of myoD was measured by western blot analysis from total protein extract resolved on SDS PAGE and transferred on nitrocellulose membrane. For western blot quantification (n=3), data were normalized to the value of a distinct Ponceau-stained band and expressed in % of the time 0 h. C) The mRNA levels of myf5 and myoD were measured by real time PCR. The results were normalized by GAPDH mRNA levels and are expressed in % of the time 0 h. 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 ( $P < 0.05$ ). Differences between a condition and time 0 h were assessed by 1-way ANOVA. Bars with (†) are significantly different from time 0 h ( $P < 0.05$ ).

à leur intégration dans une fibre déjà existante. Le programme de différenciation met en jeu une cascade d'événements moléculaires régulés principalement par une famille de facteurs de transcription, les MRFs (Myogenic Regulatory Factors) (61). L'expression de ces facteurs de transcription est induite de manière séquentielle au cours de la différenciation, il s'agit respectivement de Myf5, MyoD, Myogénine et MRF4. Si l'effet des acides aminés sur la masse musculaire est bien établi, il n'existait pas de travaux sur l'effet des acides aminés sur les capacités de régénération des cellules satellites. J'avais émis l'hypothèse que les voies de signalisation régulées par les acides aminés pourraient participer à la régulation de la différenciation des cellules satellites musculaires. Cette étude a été réalisée sur des cultures primaires de cellules satellites de souris ainsi que sur la lignée myoblastique C2C12. Il a été choisi d'étudier les effets de la carence en leucine. Cet acide aminé régule la voie GCN2 et surtout, il est celui qui module le plus efficacement la voie mTOR. La différenciation a été induite en présence ou en absence de leucine.

La carence en leucine entraîne une inhibition de la différenciation dans les deux modèles d'étude (Fig. 21). Cette inhibition est associée à une modification de l'expression de deux facteurs de transcription jouant un rôle clé dans la différenciation : myf5 et myoD (Fig. 22). Myf5 est considéré comme un marqueur de la cellule satellite quiescente alors que l'expression de myoD est associée à un engagement de la cellule vers la différenciation. La carence en leucine induit une augmentation du niveau d'ARNm de Myf5. Cette observation illustre bien que le myoblaste engage des processus spécifiques et adaptatifs en réponse à la carence en leucine. Concernant myoD, la carence entraîne une diminution de son niveau protéique alors que le niveau d'ARNm reste constant. Les modifications des niveaux d'expression de myf5 et myoD sont en accord avec l'inhibition de la différenciation observée. En revanche, il apparaît qu'aucune des deux voies de signalisation, GCN2 et mTOR, connues comme étant régulées par la leucine, n'est impliquée dans la régulation de myf5 et myoD. Ce résultat illustre bien l'existence d'autres voies de signalisation régulées par les acides aminés et ceci, dans le cadre de la différenciation musculaire. Toutefois, ces résultats n'excluent pas un rôle de mTOR ou de GCN2 dans l'inhibition de la différenciation lors d'une carence en acides aminés.

#### [Projets en collaboration \(2006-2009\).](#)

Durant cette période, mes compétences (voie mTORC1 et cellules satellites) m'ont permis de contribuer à différents projets menés au sein de l'équipe NSP et de l'équipe Protéolyse. Un projet mené par Dominique Dardevet concernait les effets de l'inflammation à bas bruit sur la régulation de la synthèse protéique postprandial chez le rat âgé. Les travaux



menés ont permis de mettre en évidence que le défaut de stimulation de la synthèse protéique à l'état postprandial n'était présent que chez les rats présentant une inflammation à bas bruit. Ce défaut de stimulation a pu être corrigé par un traitement anti-inflammatoire chronique. Par contre, si une étude avait montré un défaut d'activation de la S6K1 lors du repas chez l'individu âgé (62), cette absence de stimulation de la S6K1 ne semble pas être impliquée dans le défaut de stimulation de la synthèse protéique chez le vieux rat enflammé (63,64)

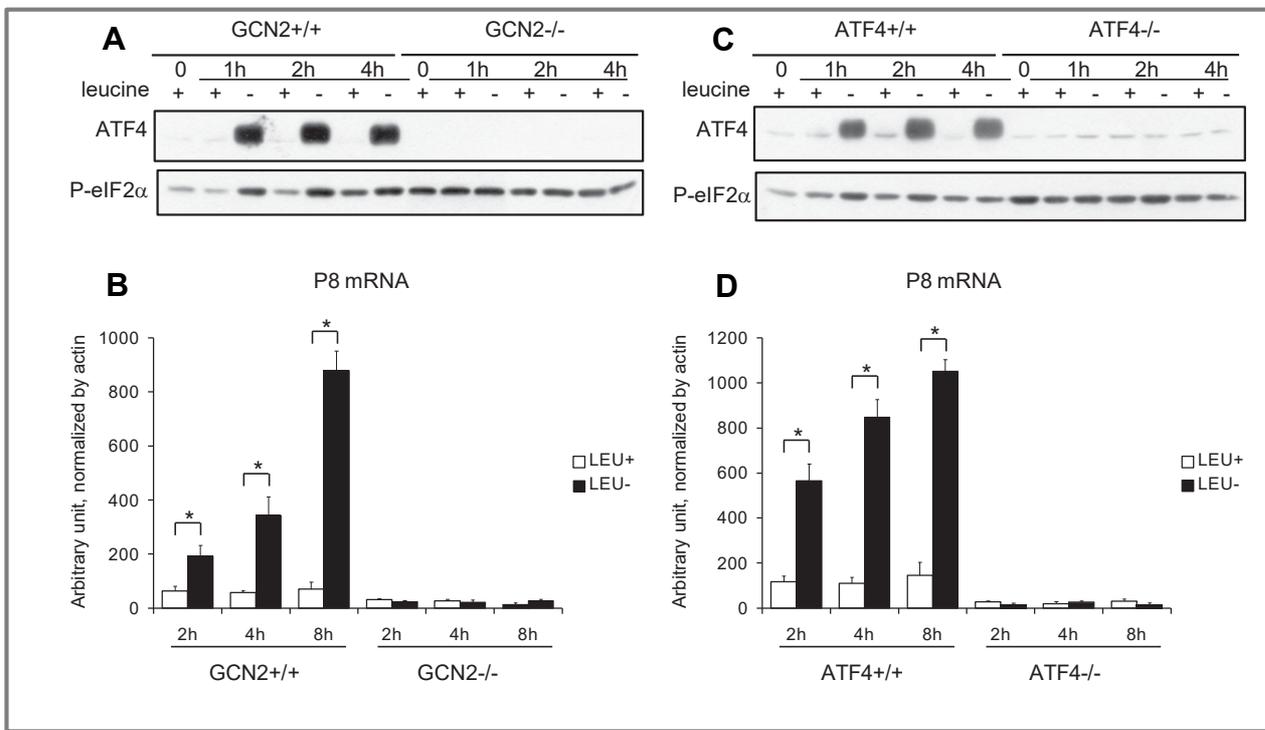
J'ai également contribué à un projet développé par Lydie Combaret (Equipe Protéolyse, UNH) en collaboration avec l'équipe NSP. Cette étude, effectuée chez le rat, était centrée sur la caractérisation des mécanismes protéolytiques et apoptotiques engagés lors de la récupération musculaire suite à une atrophie causée par une immobilisation (plâtrage). Dans ce projet, j'ai pu apporter mon expertise sur les cellules satellites. Les résultats obtenus suggèrent une profonde modification de la balance apoptose/régénération au cours des phases d'atrophie et de récupération (65).

#### Bilan de la période 2006-2009

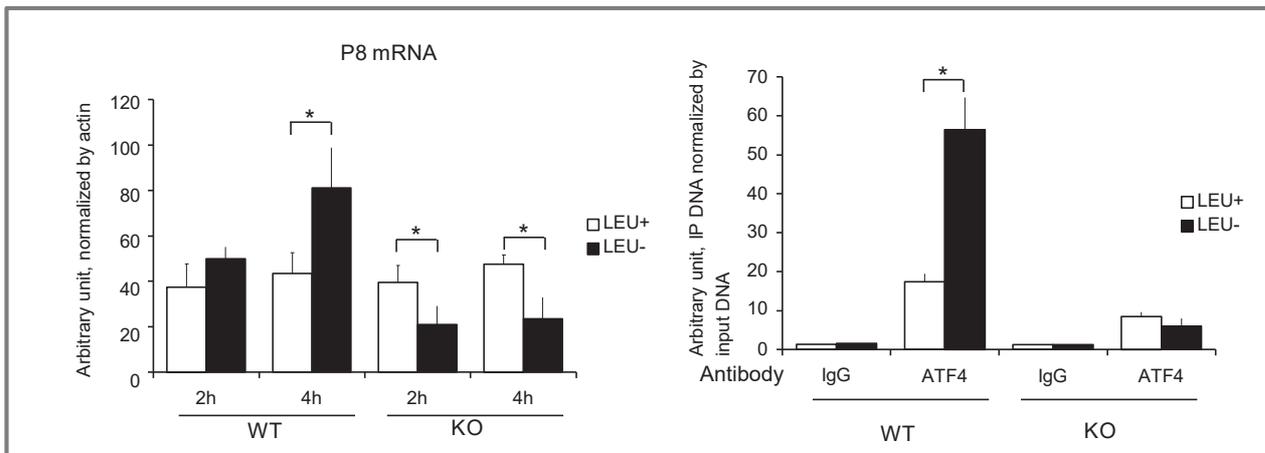
Les travaux réalisés sur la différenciation des cellules satellites ont illustré l'importance de mieux caractériser des mécanismes moléculaires régulés par les acides aminés afin de pouvoir caractériser leurs rôles au niveau physiologique. En 2009, cette connaissance était encore limitée, notamment concernant mTORC1 et la leucine. J'ai donc souhaité orienter mes activités de recherche vers des projets visant à mieux comprendre l'effet signal des acides aminés au niveau moléculaire. Dans cet objectif, j'ai fait une demande de mobilité interne au sein de l'Unité pour réintégrer l'équipe Gènes Nutriments (maintenant Proteostasis) dont l'une des thématiques est la caractérisation et la compréhension des mécanismes moléculaires régulés par les acides aminés.

#### Chargé de Recherche INRAE Equipe Proteostasis (2009-présent)

Afin d'approfondir mes travaux sur les mécanismes moléculaires régulés par les acides aminés, j'ai rejoint l'équipe GN en 2009. Les thématiques de recherche de l'équipe GN (Responsable d'équipe : Pierre Fafournoux) s'articulent autour d'une question : les acides aminés peuvent-ils, au travers de la régulation de l'expression des gènes, réguler des fonctions physiologiques ? Les travaux de l'équipe Proteostasis ont permis de caractériser l'une des principales voies de signalisation impliquée dans la régulation de l'expression des gènes par la disponibilité en acides aminés : la voie GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4. La finalité des travaux de l'équipe est de déterminer le rôle de ces mécanismes dans le contrôle de fonctions physiologiques lors de différentes situations nutritionnelles ou pathologiques. L'un des objectifs de l'équipe



**Figure 23:** Western blot analysis of Pser51-eIF2 $\alpha$  and ATF4 from total protein extract of control and leucine starved GCN2 $^{+/+}$  and GCN2 $^{-/-}$  cells. (B) The mRNA levels of p8 were measured in GCN2 $^{+/+}$  and GCN2 $^{-/-}$  cells by real-time PCR, results were normalized by actin mRNA levels and were expressed in% of the time 0 h. (C) Same experiments than a, with ATF4 $^{+/+}$  and ATF4 $^{-/-}$  cells. (D) Same experiments than b, with ATF4 $^{+/+}$  and ATF4 $^{-/-}$  cells.



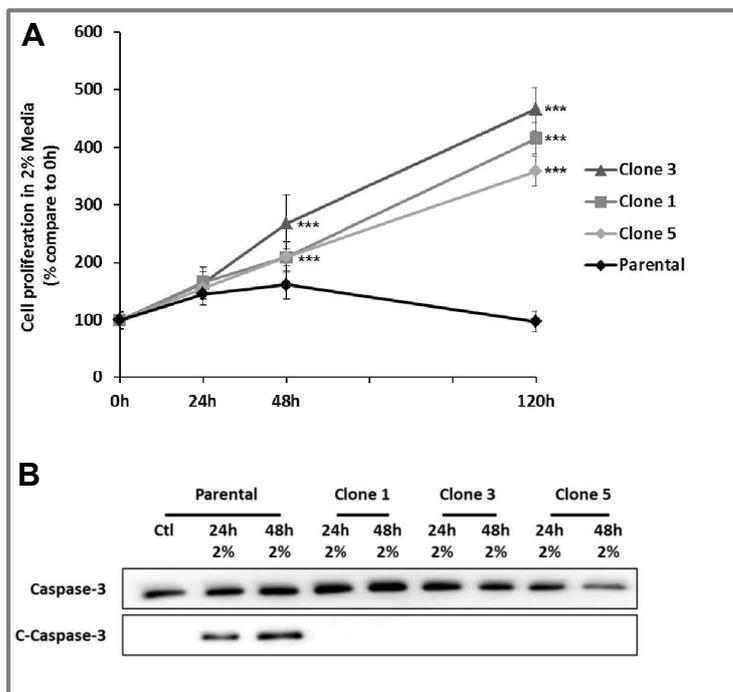
**Figure 24:** Overnight starved mice were fed for 2 and 4 h either with a control (Leu+) or a leucine-deficient (Leu-) diet. (A) The mRNA levels of p8 were measured in total hepatic RNA by real time PCR, the results were normalized by actin mRNA levels and were expressed in% of the time 0 h. (B) ChIP analysis were performed on DNA from liver nuclear extract using an antibody specific for ATF4 or a non-specific antibody control (IgG). The amount of PCR product obtained with immunoprecipitated DNA (IP) were normalized with the product obtained with input DNA. Differences between mice fed with control diet and mice fed with leucine diet were assessed by Student's test. Bars with ( $\sphericalangle$ ) are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ).

demeure de caractériser plus précisément les mécanismes par lesquels les acides aminés contrôlent les fonctions cellulaires que ce soit par la régulation de l'expression des gènes ou de voies de signalisation. Les projets que j'ai développés durant cette période s'inscrivent dans cet objectif.

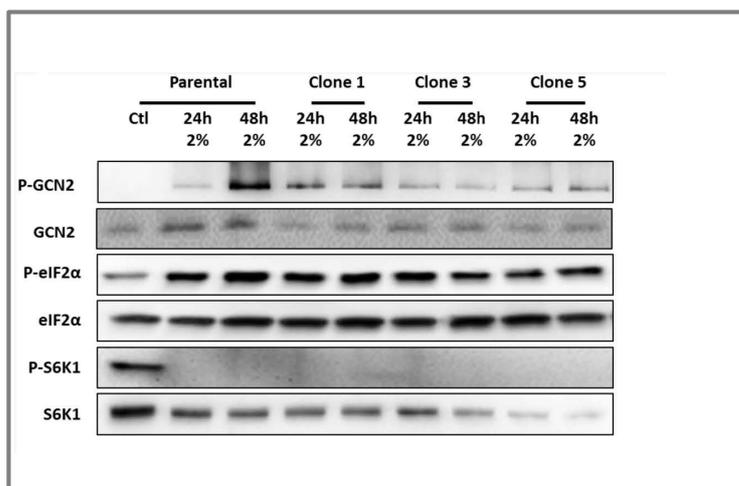
### Régulation du gène p8 par la voie GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4 lors d'une carence en un acide aminé

Lors de mon intégration dans l'équipe Proteostasis, un des objectifs était de mieux caractériser la régulation de la voie GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4. Une publication récente avait identifié la protéine p8 (ou NUPR1) comme un activateur potentiel d'ATF4 (66). La protéine p8 est un cofacteur capable d'agir sur l'architecture chromatinienne, elle est particulièrement étudiée dans le contexte de la tumorigenèse de par son rôle dans la balance survie/apoptose (67). J'ai pu identifier un élément de réponse aux acides aminés (AARE) dans le promoteur du gène codant pour la protéine p8. Ainsi, p8 était susceptible d'être régulée par la voie GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4 et de participer à une boucle de rétrocontrôle positive de l'activité d'ATF4. Les travaux menés ont permis de confirmer que la carence en leucine régule l'expression du gène p8 de manière GCN2 et ATF4 dépendante (Fig. 23). Cette régulation implique l'élément de réponse identifié dans le promoteur de p8. Des expériences *in vivo* ont également été réalisées. Des souris sauvages et invalidées pour GCN2 ont été soumises à un régime contrôle ou à un régime dépourvu en leucine. L'analyse au niveau hépatique du niveau d'ARNm de p8 a permis de confirmer que GCN2 était nécessaire à sa régulation dans le contexte de la carence en leucine (Fig. 23). De plus des analyses d'immunoprécipitation de la chromatine sur des extraits de foie ont confirmé la liaison d'ATF4 à la région du promoteur comprenant l'AARE (Fig 23).

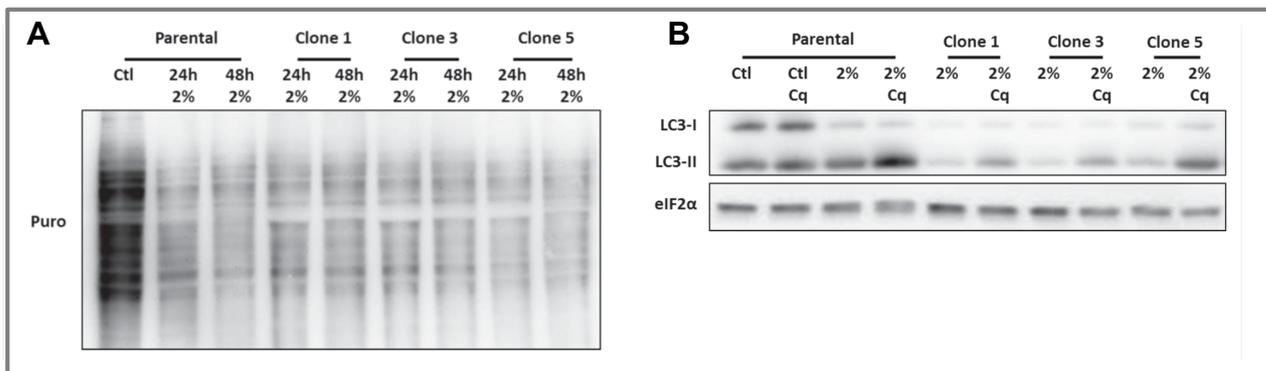
Toutefois, des expériences menées sur des MEFs p8 KO et des cellules HeLa transfectées avec des siRNA dirigés contre p8 n'ont pas permis de mettre en évidence un rôle de p8 dans la régulation de la transcription ATF4 dépendante lors de la carence en leucine (non publiée). Récemment, des travaux chez la souris ont mis en évidence que lors d'un régime high fat p8 contribuait au maintien de l'activation de l'ISR au niveau hépatique et protégeait de la lipotoxicité (68). Les souris p8 KO présentent un défaut d'induction de l'expression d'ATF4 par PERK au niveau hépatique après 15 semaines de régime high fat. Toutefois, les auteurs n'ont pas avancé d'hypothèse quant au mécanisme impliqué dans la diminution de l'activation de PERK et de l'expression d'ATF4.



**Figure 25:** (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) 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.



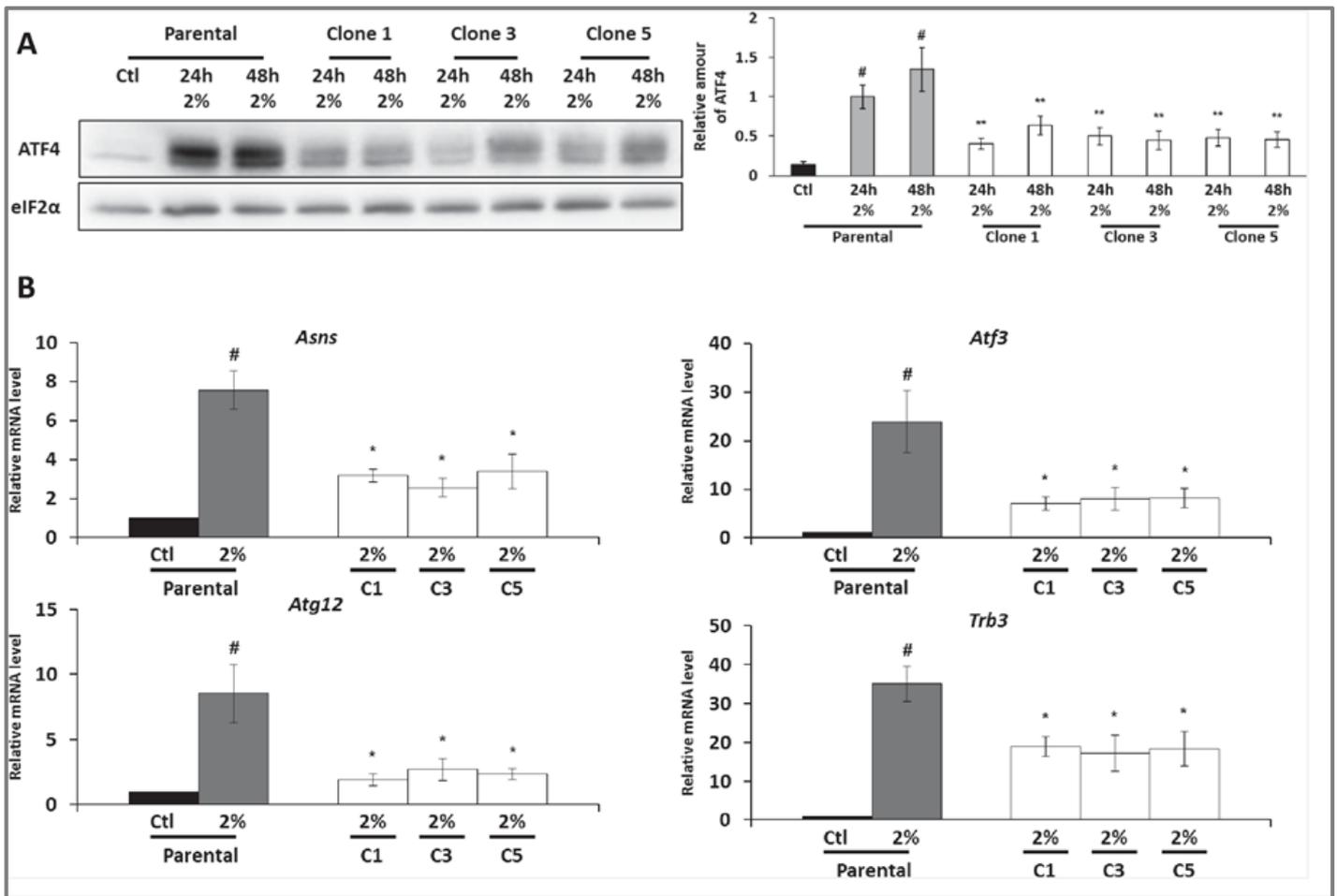
**Figure 26:** Parental cells (Parental) and AADR clones (Clone 1, 3, 5) were cultured in control medium (Ctl) or in 2% medium (2%) for 24h and 48h, Immunoblot analyses of GCN2, eIF2 $\alpha$ , S6K1 and their phosphorylated form were performed.



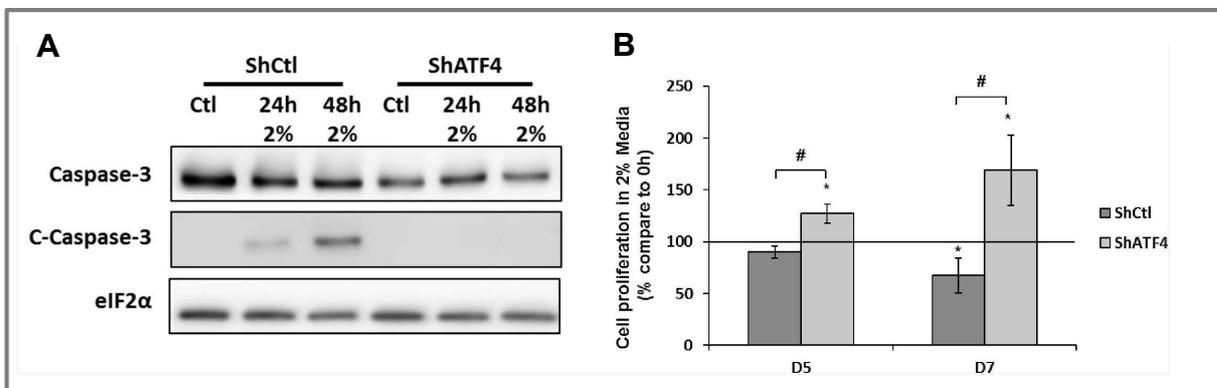
**Figure 27:** (A) Parental cells (Parental) and AADR clones (Clone 1, 3, 5) were cultured in control medium (Ctl) or in 2% medium (2%) for 24h and 48h. Protein synthesis was measured by SUnSet method, immunoblot analyses of puromycin incorporation into proteins were performed. (B) Parental cells and AADR clones were cultured for 24h in control medium or in 2% medium. When indicated, 20 $\mu$ M of chloroquine (Cq) was added during the last hour of treatment. (Upper panel) Immunoblot analyses of eIF2 $\alpha$  and LC3B processing (LC3-I and LC3-II) were performed.

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

Ce projet a fait l'objet d'une collaboration avec J. Pouyssegur (Centre Scientifique de Monaco) et a été en partie financé par l'ARC. Une post doctorante, Sarah Lambert-Langlais, et un doctorant, Florent Mesclon, que j'ai encadré, ont participé à ce projet. Son objectif initial était de caractériser de nouveaux mécanismes d'adaptation des cellules aux variations de disponibilité en acides aminés. Il est intéressant de noter que certaines cellules cancéreuses présentes au cœur de tumeurs solides possèdent une capacité de survie accrue malgré une faible vascularisation entraînant de faibles apports en oxygène et nutriments dont les acides aminés (69). Il est donc clair que certaines cellules soumises à une forte pression de sélection sont capables de survivre en développant des mécanismes d'adaptation (70). Ce phénomène implique une sélection génétique des cellules les plus résistantes. Partant de ce principe, nous avons mis au point un modèle cellulaire original par une approche de génétique fonctionnelle. Nous avons appliqué une très forte pression de sélection sur des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) en les cultivant plusieurs mois dans un milieu contenant 2% d'acides aminés par rapport à du DMEM (milieu 2% AA). Une majorité des cellules sont mortes mais quelques-unes ont survécu et formé des clones que nous avons isolés (clones -AAr). Trois de ces clones ont été étudiés. La figure 25 illustre leur capacité de prolifération dans le milieu 2% AA. Contrairement aux cellules parentales, les clones ne présentent pas de clivage de la caspase 3 lorsqu'ils sont cultivés dans du milieu 2% AA. Nous avons ensuite étudié le niveau d'activation des voies GCN2 et mTORC1 (Fig. 26). Dans les cellules parentales cultivées dans du milieu 2% AA, l'inhibition de la phosphorylation de S6K1 témoigne d'une diminution de l'activité de la voie mTORC1 tandis que la phosphorylation de GCN2 et d'eIF2 $\alpha$  indique une activation de la kinase GCN2. Dans les clones cultivés en milieu 2% AA, nous retrouvons le même profil de phosphorylation des cibles étudiées. Le niveau de synthèse protéique des clones déterminé par la technique de SUnSET (surface sensing of translation) (71). Cette technique repose sur l'utilisation de puromycine qui s'intègre dans les chaînes polypeptidiques en élongation entraînant l'arrêt de leur synthèse. La mesure du niveau d'intégration dans les protéines naissantes par Western Blot permet d'évaluer le niveau de synthèse protéique. De manière cohérente le niveau de synthèse protéique des clones apparaît comme similaire à celui des cellules parentales cultivées dans le milieu 2% AA (Fig. 27). En revanche, l'étude de la lipidation de LC3, un marqueur d'induction de l'autophagie, a mis en évidence que le niveau de LC3 lipidé était diminué dans les clones suggérant une diminution du flux d'autophagie



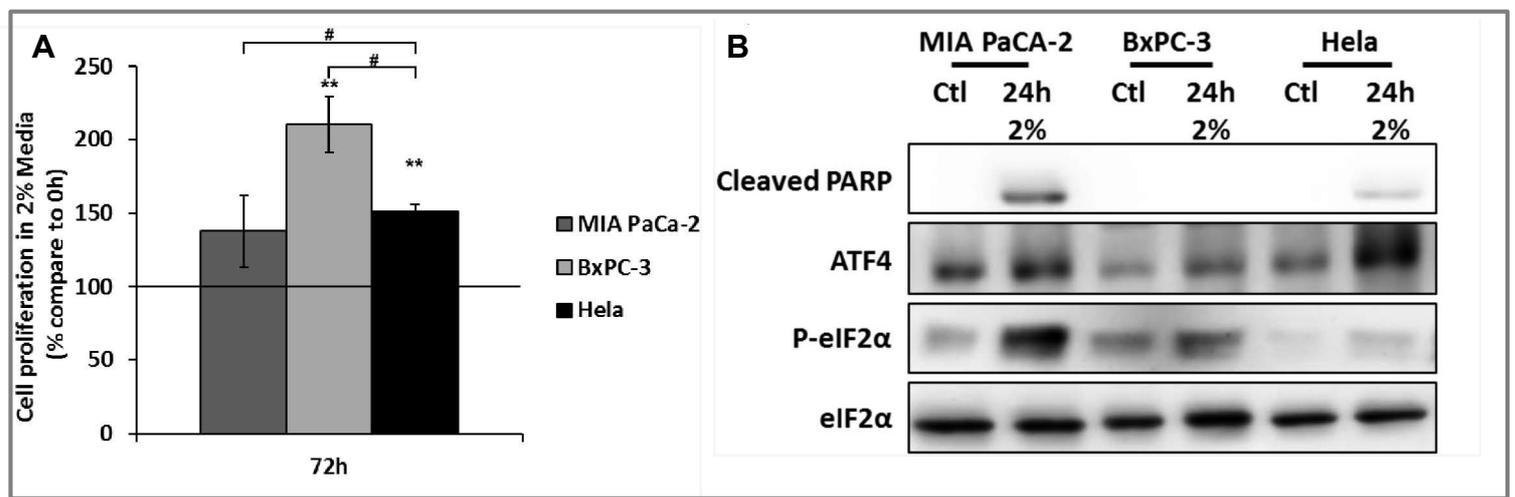
**Figure 28:** Parental cells (Parental) and AADR clones (Clone 1, 2, 3) were cultured in control medium (Ctl) or in 2% medium (2%) for 24h and 48h. (A) (Left panel) Immunoblot analyses of ATF4 and eIF2α were performed. (Right panel) ATF4 level was determined by densitometry analysis. Graph shows means ± 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  $\beta$ -actin mRNA, results are expressed relative to the value observed in parental cells in control medium. Graph show means ± 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.



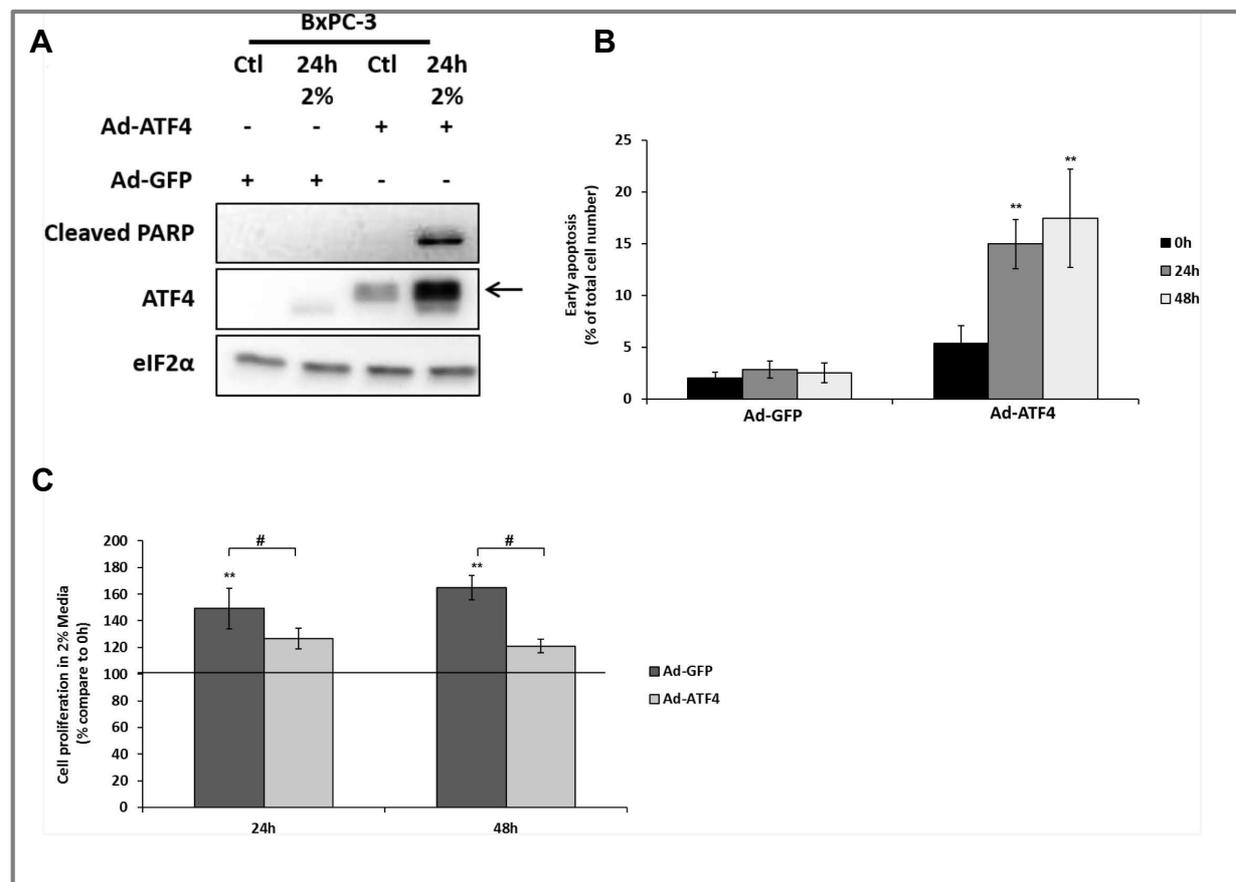
**Figure 29:** MEFs were infected with a lentivirus expressing either a ShRNA control (ShCtl) or a ShRNA targeting ATF4 (ShATF4). (A) ShCtl cells and ShATF4 cells were cultured in control medium or in 2%medium for 24 and 48 hours. Immunoblot analyses of caspase 3 cleavage were performed. (B) ShCtl cells 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 ± 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

comparativement aux cellules parentales cultivées dans le milieu 2% AA (Fig. 27). Ce résultat pouvait paraître surprenant dans la mesure où l'inhibition de mTORC1 et l'activation de GCN2 contribuent à l'initiation et au maintien de l'autophagie. Toutefois, la seule mesure du niveau de lipodation de LC3 ne permet pas de conclure sur le flux d'autophagie. Néanmoins, considérant que les clones présentent une protéosynthèse diminuée mais sont capables de proliférer et donc de présenter une balance protéique positive, il apparaît cohérent que le niveau d'autophagie et de manière générale, le niveau de protéolyse, soit diminué dans les clones.

Un étude transcriptomique a également été réalisée (données non publiées). Un point commun entre les 3 clones s'est dégagé, ils présentaient tous une diminution des gènes cibles d'ATF4 comparativement aux cellules parentales cultivées dans le milieu 2% AA. Ce résultat a été confirmé par qPCR en étudiant les ARNm de 4 de ces gènes : *Asns*, *Atf3*, *trb3* et *Atg12*. Chacun de ces gènes présente un niveau de messenger significativement plus faible dans les clones cultivés en 2% AA comparativement aux cellules parentales cultivées dans le même milieu (Fig. 28). Ces résultats indiquent une diminution du niveau de transcription ATF4 dépendant dans les clones. Conformément à cette hypothèse, il a pu être observé une diminution du niveau de protéine d'ATF4 dans les clones cultivés en 2% AA comparativement aux cellules parentales cultivées pendant 24 heures dans du milieu 2% AA (Fig. 28). Même si ATF4 est la cible de modifications post-traductionnelles (72), les données de la littérature et les travaux de l'équipe tendent à montrer que le niveau d'activité d'ATF4 peut être directement relié à son niveau d'expression. Afin de déterminer si cette baisse de l'expression d'ATF4 était l'une des caractéristiques permettant la survie des clones en milieu 2% AA, le knock-down d'ATF4 a été réalisé dans les cellules parentales par shRNA. Les MEFs infectées avec le lentivirus exprimant le shRNA dirigé contre l'ARNm d'ATF4 ne présentaient pas de clivage de la caspase 3 en milieu 2% AA contrairement aux cellules infectées avec le lentivirus témoin. De plus, la diminution du niveau d'expression d'ATF4 a conféré aux cellules la capacité de proliférer dans le milieu 2% après 7 jours de culture (Fig. 29). Réciproquement, ATF4 a été surexprimé par adenovirus dans les clones. Le niveau de surexpression obtenu s'est avéré modérée et relativement hétérogène entre les clones. Toutefois, cette surexpression a entraîné en milieu 2% AA une diminution de leur capacité à proliférer et le clivage de la caspase 3 a été observé. L'ensemble de ces résultats démontrent le rôle majeur joué par la sous-expression d'ATF4 dans la capacité des clones à survivre et proliférer dans un milieu appauvri en acides aminés. Nous avons ensuite tenté de déterminer si cette caractéristique pouvait être partagée par des cellules tumorales. Plusieurs lignées de tumeurs pancréatiques ont été étudiées. En effet, ces tumeurs présentent un stroma très dense entraînant une moindre vascularisation et donc un apport en



**Figure 30:** (A) 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. (B) MIA PaCa-2, BxPC-3 and HeLa cells were cultured control medium or 2% medium for 24 hours. Immunoblot analyses of ATF4, eIF2 $\alpha$  and its phosphorylated form and the cleaved form of PARP were performed.



**Figure 31:** 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 $\alpha$  and the cleaved form of PARP were performed. The arrow indicates the mouse form of ATF4. (B) Early apoptosis detection using hoechst 33342 labelling in cells infected with either Ad-GFP or Ad-ATF4 cultured in 2% medium for 24 and 48 hours. 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 ( $p < 0,01$ ) between compared to 0h. (C) 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.

nutriments et oxygène diminué. La lignée HeLa a été utilisée comme témoin. Pour rappel, c'est dans cette lignée issue de métastases d'un cancer de l'utérus que nous avons caractérisé la régulation de la transcription ATF4 dépendante par la carence en leucine. Parmi les lignées pancréatiques testées, la lignée BXPC3 est celle qui présentait à la fois un faible niveau d'expression d'ATF4, une absence du marqueur d'apoptose PARP clivé et une capacité de prolifération en milieu 2% AA (Fig. 30). La surexpression d'ATF4 dans cette lignée a conduit à l'induction de l'apoptose et à un arrêt de la croissance lorsque ces cellules étaient cultivées en milieu 2% (Fig. 31).

Grace au modèle des clones, nous avons pu mettre en évidence qu'une modification de la régulation de l'expression d'ATF4 et de ses gènes cibles pouvait constituer un mécanisme d'adaptation conférant une résistance à la carence en acides aminés. Il faut souligner que cette modification était présente dans la grande majorité des clones que nous avons testée. En revanche, nous n'avons pas été en mesure d'identifier les causes de la sous-expression d'ATF4. Dans la littérature, il n'existe pas de consensus quant au rôle d'ATF4 dans les cellules tumorales. Il peut être décrit comme un facteur permettant la survie des cellules tumorales en permettant d'induire la vascularisation des tumeurs ou la synthèse d'acides aminés nécessaires au métabolisme des cellules tumorales (73,74). Il est également décrit comme un facteur pouvant entraîner l'apoptose de cellules cancéreuses (75,76). Il est important de considérer que dans ce processus de sélection aucun des clones testés n'a montré de diminution de l'activation de GCN2 et de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ . Nous pouvons donc faire l'hypothèse que cette partie de la voie de signalisation peut contribuer à la survie des cellules lors de la carence en acides aminés indépendamment de l'induction de l'expression d'ATF4. Cette hypothèse est corroborée par les travaux de Han et al., qui ont mis en évidence que dans le contexte du stress du réticulum endoplasmique, ATF4 contribue à l'apoptose alors que la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  contribue à la survie (77). L'inhibition de la synthèse protéique en soit peut jouer un rôle clé dans la survie des cellules face à la restriction en acides aminés. Cette notion de rôle clé du niveau de synthèse protéique dans la survie des cellules tumorales dans des conditions adverses est clairement illustrée par les travaux de Leprivier *et al.* qui ont montré l'importance de l'activité d'eEF2K dans ce phénomène. eEF2K est une kinase qui, en phosphorylant le facteur d'élongation de la traduction eEF2, va inhiber son activité (78). L'élongation des protéines est l'un des processus cellulaires très coûteux en terme de consommation d'ATP. Nos résultats montrant une potentielle diminution de l'autophagie dans les clones permettant de conserver une balance protéique positive malgré un faible niveau de synthèse protéique est cohérent par



rapport à cette étude. Les clones présentent donc à la fois une modification de la réponse apoptotique et une adaptation de la balance protéique.

Cette modification du métabolisme protéique ne semblait pas pouvoir expliquer à elle seule la capacité des clones à soutenir un anabolisme protéique suffisant. En effet, sur 3 jours de culture sans changement de milieu, la quantité d'acides aminés présente n'est théoriquement pas suffisante pour soutenir la prolifération observée. Cette constatation nous a conduit à nous poser la question de la capacité des clones à utiliser les protéines du milieu de culture comme source d'acides aminés. Nous avons donc testé l'impact d'un milieu dépourvu de leucine et contenant 2% des autres acides aminés (milieu 2% AA –leu). Cette condition fortement délétère pour les cellules parentales n'a pas impacté significativement la prolifération des clones sur 3 jours. Ce résultat démontre clairement que les clones ont la capacité d'obtenir de la leucine indépendamment de celle présente sous forme libre dans le milieu de culture. Si on ne peut pas exclure que les clones aient acquis la capacité à synthétiser de la leucine, il apparaît plus probable que les clones aient acquis la capacité à utiliser les protéines du sérum de veau fœtal présent à hauteur de 10% dans le milieu de culture. Nous avons donc cultivé les clones en absence de sérum, ce qui a entraîné un arrêt de leur prolifération. L'ajout d'albumine a été suffisant pour restaurer la prolifération chez les clones indiquant que l'arrêt de la prolifération observé en absence de sérum n'était pas dû à l'absence de facteurs de croissance mais bien à l'absence de protéines. Des travaux ont mis en évidence que des cellules tumorales ou transformées avec KRAS avaient acquis la capacité à utiliser les protéines du milieu par un mécanisme de macropinocytose (79,80). Les expériences préliminaires que nous avons menées suggèrent que seul un des clones présentait de la macropinocytose permettant l'utilisation des protéines du milieu de culture. Nous aurions souhaité que cette caractéristique soit partagée par tous les clones afin de pouvoir identifier grâce à l'analyse transcriptomiques des gènes potentiellement impliqués dans l'apparition de ce processus dans les clones. Les investigations n'ont pas été poussées plus loin.

L'objectif initial de ce projet était d'identifier des voies de signalisations contrôlées par la disponibilité en acides aminés. L'étude transcriptomique nous a ramené à ATF4, il aurait été intéressant d'aborder également des aspects plus en lien avec le métabolisme cellulaire des clones. Le début des années 2010 a été marqué par un intérêt particulier pour le métabolisme des acides aminés dans les cellules tumorales (81,82). Dans la plupart de ces travaux, les acides aminés sont étudiés pour leur rôle d'intermédiaires métaboliques. Un intérêt particulier est porté aux acides aminés non indispensables telle que la glutamine et l'asparagine pour leur rôle dans le cycle de Krebs (83) ou la serine pour son rôle dans le « one carbon metabolism » (84). Il s'est

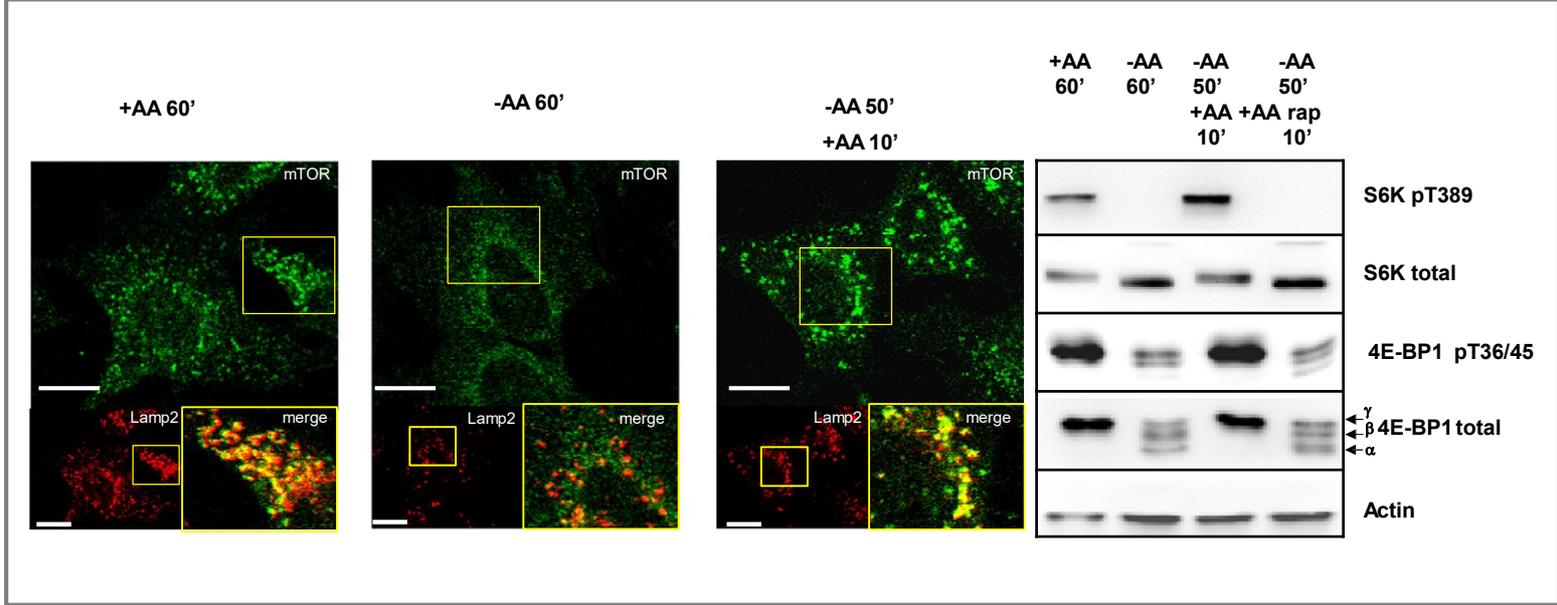


posé la question de la dépendance de certaines tumeurs à ces acides aminés jouant un rôle clé dans le métabolisme tumoral. Dans notre processus de sélection, il faut prendre en compte que la pression la plus importante était probablement exercée par la diminution d'acides aminés indispensables. Il n'est donc pas certain que les clones soient le modèle le plus pertinent pour étudier les modifications métaboliques des cellules tumorales en lien avec les acides aminés non indispensables. Une autre limite inhérente aux clones est que l'approche utilisée ne permet pas la sélection de cellules présentant des caractères d'agressivité tumorale. En revanche, il peut être envisagé que ce modèle soit relativement intéressant pour aborder la problématique des cellules cancéreuse quiescentes/dormantes. Si la question de l'aspect transposable des mécanismes identifiés dans les clones dans le contexte tumoral est légitime, il n'en demeure pas moins que nous n'avons pas exploité toutes les possibilités de ce modèle. Une nouvelle analyse des données transcriptomiques pourrait constituer un point de départ, notamment pour identifier des voies de signalisation ou des facteurs de transcription interagissant avec ATF4.

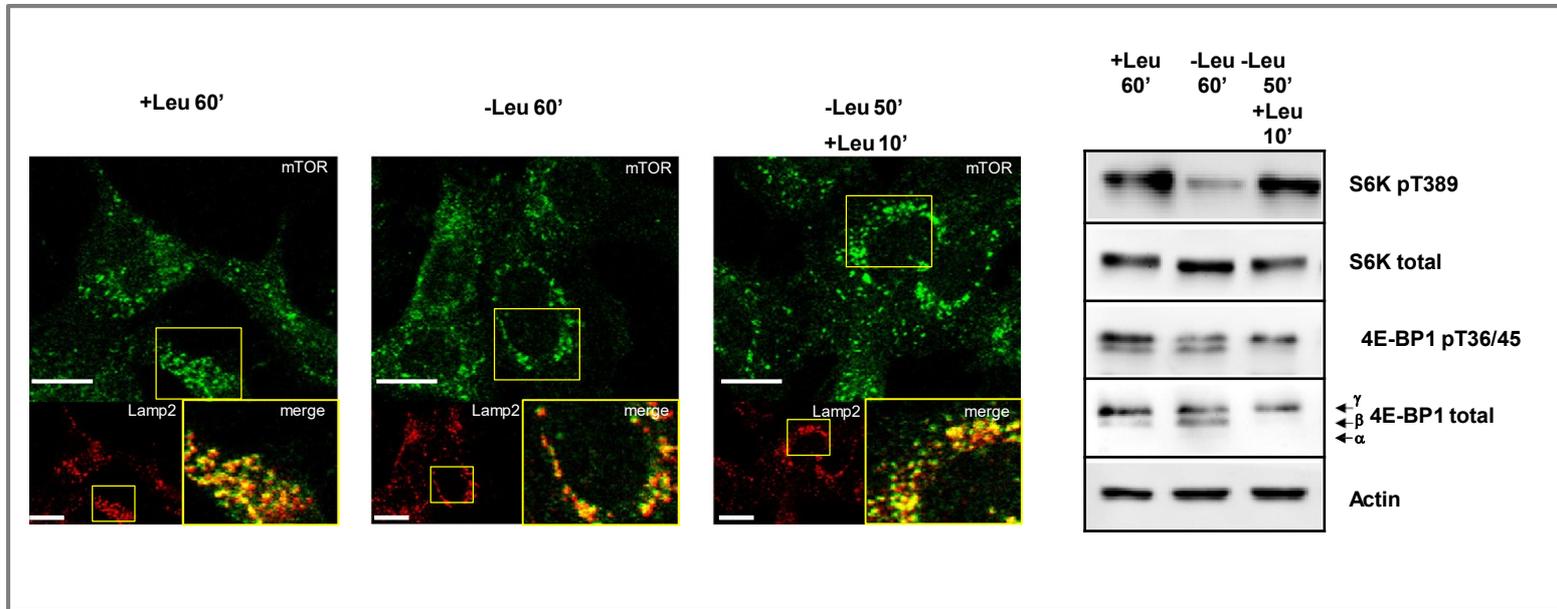
### Régulation de mTORC1 par la leucine, rôle de la voie GNC2

En 2011, au début du post doctorat de Sarah Lambert-Langlais, des MEFs ATF4 KO ont été utilisées dans le cadre du projet sur les clones résistant à la carence en acides aminés. Sarah a pu observer une moindre inhibition de la voie mTORC1 dans ces cellules lorsqu'elles étaient cultivées dans le milieu 2% AA. La première hypothèse que nous avons faite était que l'absence d'ATF4 entraînait la sous-expression des gènes codant pour REDD1 et TRB3, deux protéines ayant été décrites comme inhibant l'activité de mTORC1(85,86). Afin de valider les résultats obtenus avec les MEF ATF4 KO, des expériences similaires ont été réalisées dans des MEF GCN2 KO dans un contexte de carence en acides aminés totale mais également de carence en leucine. Les premiers résultats obtenus ont mis en évidence d'une part, un rôle de GCN2 dans la régulation de mTORC1 par la leucine sur des temps courts et d'autre part, que les mécanismes impliqués dans la régulation de mTORC1 par une carence totale en acides aminés ou une carence uniquement en leucine présentent des différences.

Au début de ce projet, les connaissances de la régulation de l'activité de mTORC1 par les acides aminés venaient de faire une avancée majeure avec la caractérisation des protéines Rags et du complexe ragulator (87,88). Ces travaux avaient mis en évidence que la présence d'acides aminés entraînait la localisation de mTOR au niveau du lysosome où se trouve également localisée la protéine Rheb, une GTPase indispensable à l'activation de mTORC1 (89,90). Cette localisation de mTOR au niveau du lysosome dépend de plusieurs complexes



**Figure 32:** MEFs were cultured with serum in the presence or in the absence of AA for 60 min; or in the absence of AA for 50 min prior to addition of AA for 10 min. Immunostaining of mTOR (green) and lamp2 (red) was performed; colocalization was determined by confocal microscopy. Bars: 10  $\mu$ m. Immunoblot analyses were performed.



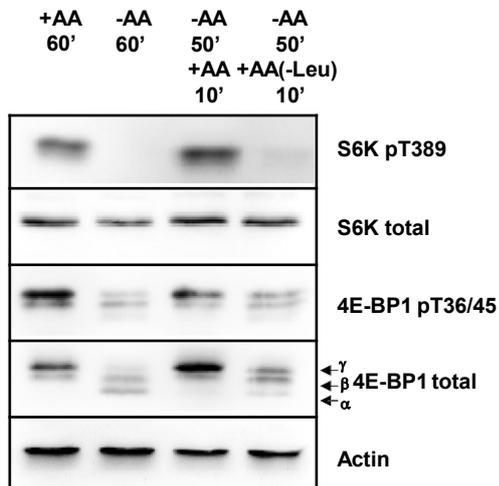
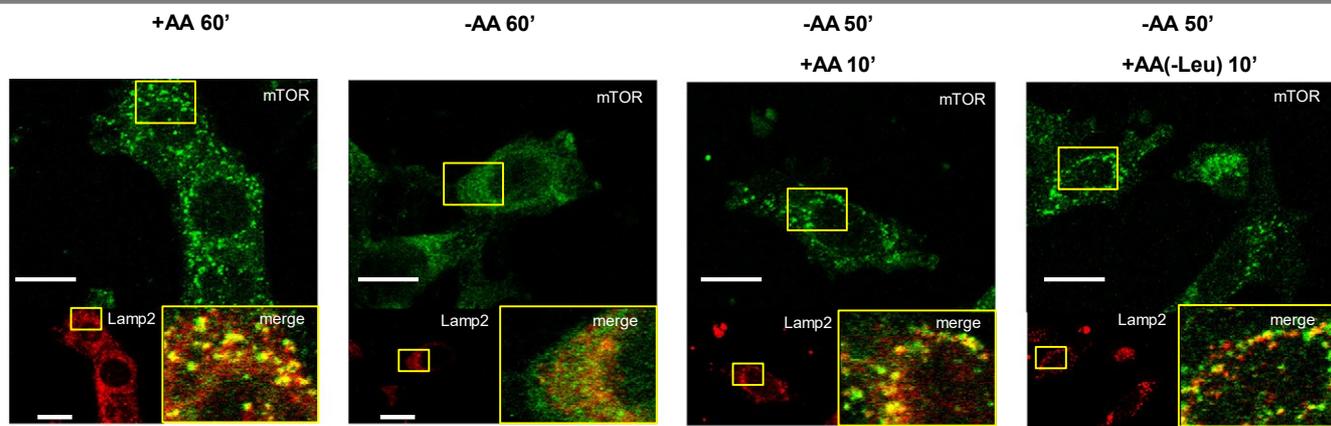
**Figure 33:** MEFs were cultured in the presence of serum. For each condition, cells were cultured in the presence (+Leu) or in the absence of leucine (-Leu) for 60 min, or in the absence of leucine for 50 min prior to a 10 min leucine stimulation. Immunostaining for mTOR (green) and lamp2 (red) was performed; colocalization was determined by confocal microscopy. Bars: 10  $\mu$ m. Immunoblot analyses were performed.

protéiques et notamment des protéines Rags qui agissent en hétérodimères (RagA ou B interagit avec RagC ou D). Les travaux de l'équipe de Davis Sabatini avaient démontré 1) que la présence des Rags était nécessaire pour la localisation lysosomale de mTOR 2) que la localisation de mTOR dépendait spécifiquement de la présence des acides aminés 3) que la localisation de mTOR au lysosome était nécessaire pour l'induction de son activité (87).

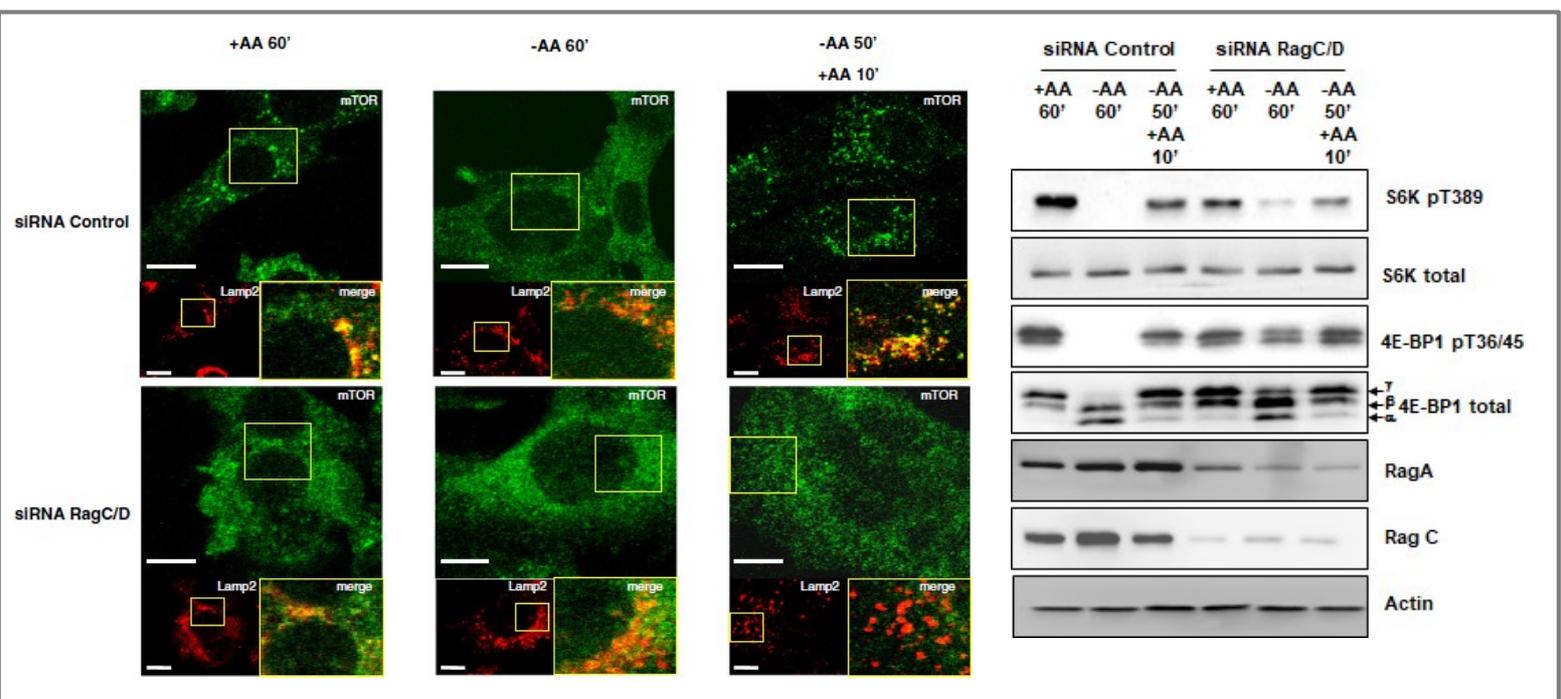
### Régulation de la localisation de mTOR par les acides aminés et la leucine.

Dans le cadre de l'étude du rôle de GNC2 dans la régulation de l'activité de mTORC1, nous avons été amenés à étudier la régulation de la localisation de mTOR par la carence en leucine dans des MEFs. Les résultats obtenus (décrits ci-dessous) vont à l'encontre du modèle établi par David Sabatini sans pour autant le remettre en cause. Il est important de prendre en compte que les mécanismes impliqués peuvent être différents suivant les types cellulaires. En particulier, de nombreux travaux ont été réalisés avec des cellules HEK293T. Dans cette lignée, en absence de sérum, l'activité de mTORC1 reste relativement élevée. L'objectif de ces études était d'étudier la régulation de mTORC1 indépendamment de la contribution des facteurs de croissance. En revanche, dans des fibroblastes embryonnaires de souris, en absence de sérum, l'activité de mTORC1 est fortement réduite et la capacité des acides aminés à stimuler l'activité de mTORC1 est également largement impactée (Averous et al, Scientific Reports 2016) . Au final, cette situation est plus représentative des schémas de régulation de mTORC1 tels qu'ils sont connus aujourd'hui. Souhaitant utiliser des modèles de MEFs invalidés, nous avons fait le choix de conserver ce type cellulaire pour étudier la régulation de mTORC1 par la leucine et les acides aminés. Ce choix impliquait d'utiliser du sérum dialysé dans nos expériences afin de maintenir l'activité Akt et permettre de conserver Rheb sous sa forme GTP. De manière concomitante à nos travaux, ce type d'approche a été plus largement utilisée dans les études de la régulation de mTORC1 par les acides aminés.

Dans des MEFs, nous avons pu observer, conformément aux données de la littérature, que la carence totale en acides aminés entraîne une forte diminution de la co-localisation de mTOR avec la protéine lysosomale lamp2 (Fig. 32). L'ajout d'acides aminés pendant 10 minutes dans le milieu carencé est suffisant pour relocaliser mTOR au lysosome. Ces modifications de la localisation de mTOR sont corrélées à l'activité de mTORC1, comme en témoigne les variations de phosphorylation de S6K1 et de 4E-BP1. En revanche, dans le contexte de la carence/restimulation en leucine nous n'avons pas observé de modifications majeures de la localisation de mTOR au niveau du lysosome et cela, malgré le fait que l'activité

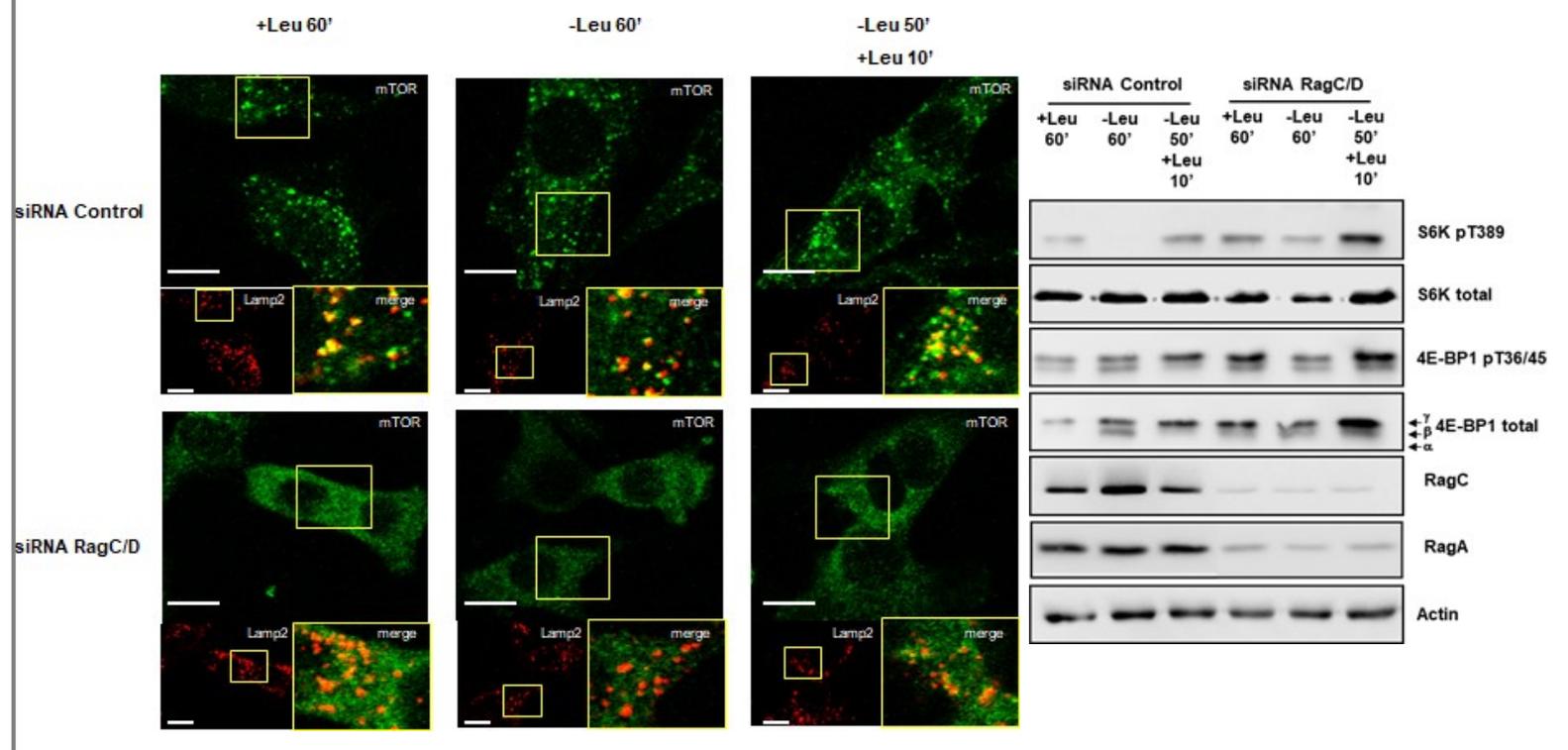


**Figure 34:** The localization of mTOR to the lysosome is not sufficient to induce mTORC1 activity. MEFs were cultured with serum in the presence or absence of AA for 60 min; or in the absence of AA for 50 min prior to addition of AA for 10 min or a medium containing all AA except leucine (+AA - Leu). (A) Immunostaining for mTOR (green) and lamp2 (red); colocalization was examined by confocal microscopy. Bars: 10 μm. (B) Immunoblot analyses were performed to measure the amount of the indicated proteins and their level of phosphorylation.

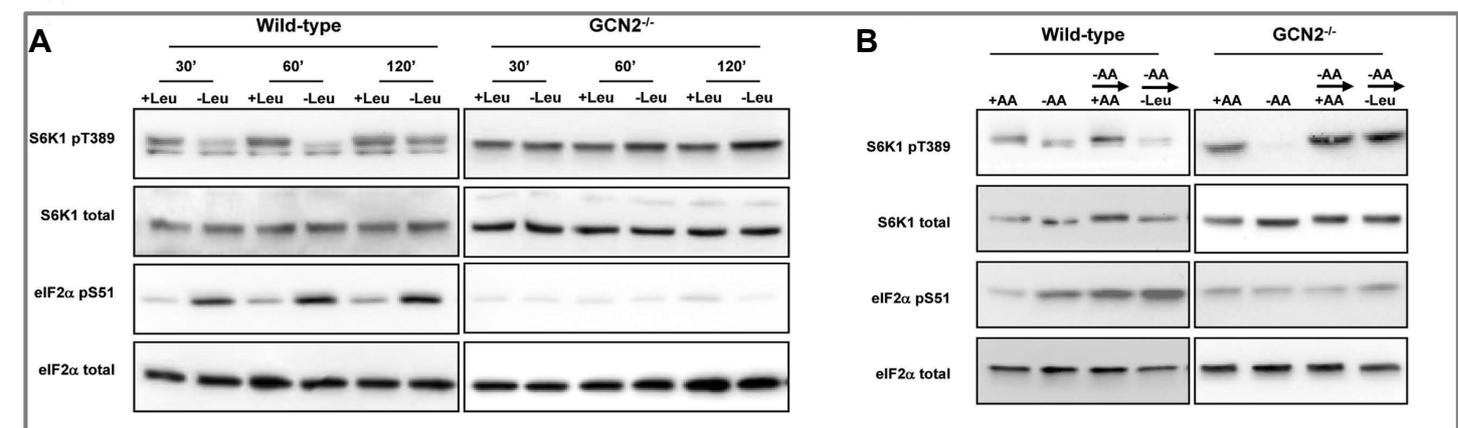


**Figure 35:** MEFs were transfected with non-targeting negative control siRNA (siRNA control) or with siRNAs targeting the sequences of RagC and RagD mRNAs (siRNA RagC/D). Cells were cultured with serum in the presence (+AA) or in the absence (-AA) of AA for 60 min, or in the absence of AA for 50 min prior to addition of AA for 10 min. Immunostaining of mTOR (green) and lamp2 (red) was performed; colocalization was determined by confocal microscopy. Bars: 10 μm. Immunoblot analyses were performed to assess the amount of the indicated proteins and their level of phosphorylation.

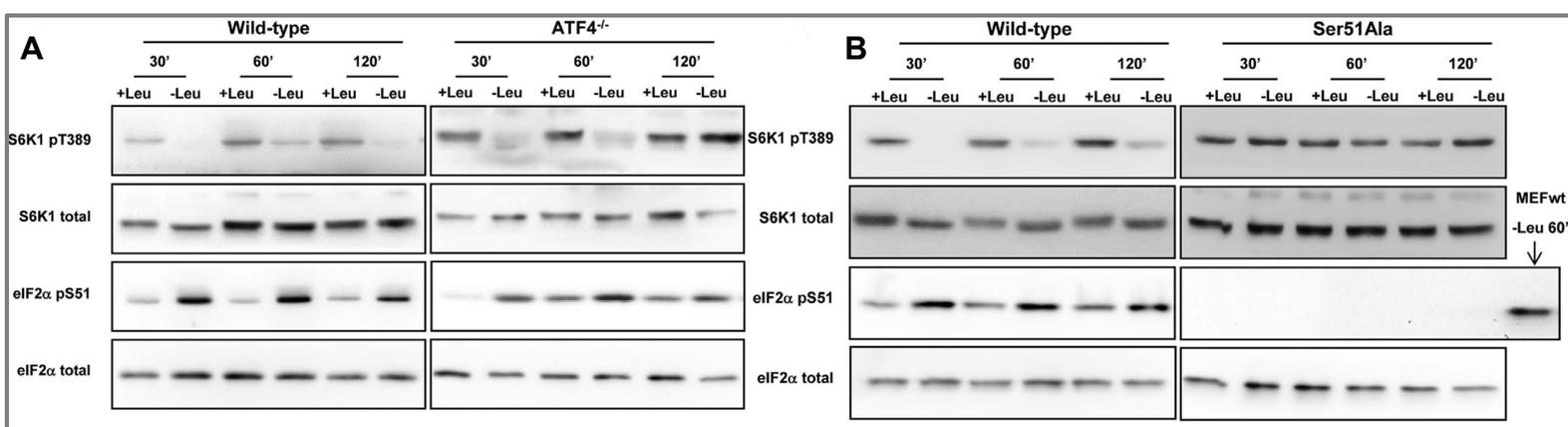
de mTORC1 soit réduite par la carence en leucine puis restimulée par l'ajout de leucine (Fig. 33). L'une des caractéristiques du modèle de régulation proposé en 2008 par David Sabatini était que la relocalisation (par un mutant de ragB) de mTOR du cytoplasme au lysosome était suffisante pour activer mTORC1 et ce, même en absence d'acides aminés. Le rôle des acides aminés était donc de permettre la relocalisation de mTOR au niveau du lysosome et non son activation. Nos données ne semblaient pas corroborer ce principe, nous avons donc testé l'effet d'un milieu carencé en leucine sur des cellules qui avait été préalablement carencées en tous les acides aminés. Ce protocole a clairement montré que la relocalisation de mTOR au niveau du lysosome n'est pas suffisante pour induire l'activité de mTORC1 du moins dans les MEFs (Fig. 34). Nous avons donc ensuite procédé au knock-down de RagC/RagD et nous avons pu valider l'efficacité du knock-down de RagC par western blot et qPCR et celle de RagD par qPCR uniquement. L'étude de la localisation de mTOR a validé fonctionnellement le knock-down de Rag C/D, que ce soit en condition contrôle ou après une stimulation par les acides aminés, nous n'observons pas de colocalisation entre mTOR et lamp2 (Fig. 35 et 36). De manière surprenante, nous avons observé une activité significative de mTORC1 en condition contrôle mais surtout, la stimulation avec la leucine ou les acides aminés était toujours capable d'induire l'activité de mTORC1. Du fait que l'inactivation des Rags ne soit que partielle, il peut être avancé que l'étude de la localisation de mTOR ne soit pas assez fine pour détecter une présence résiduelle de mTOR au lysosome qui serait suffisante pour induire l'activité de mTORC1. Nous avons donc également procédé au triple KD RagA/C/D (RagB n'est pas détectable en qPCR dans les MEFs), les mêmes résultats ont été obtenus. De manière surprenante, nous avons observé une moindre inhibition de l'activité mTORC1 dans les contextes de la carence en leucine et en acides aminés dans les cellules transfectées avec les siRNA. Il ne s'agit pas d'un effet off-target des siRNA dans la mesure où d'autres couples de siRNA ciblant RagC/D présentaient les mêmes effets. Dans l'ensemble, nos résultats démontrent que 1) les mécanismes de régulation de mTORC1 par la carence en leucine ou en acides aminés sont en partie différents : l'inhibition de mTORC1 par la carence en leucine n'implique pas la délocalisation de mTOR du lysosome, 2) la localisation de mTOR au lysosome n'est pas suffisante pour induire l'activité de mTORC1, 3) l'activité de mTORC1 peut être induite indépendamment de la localisation au lysosome 4) la localisation de mTOR au lysosome semble jouer un rôle dans l'inhibition de l'activité de mTORC1 par la carence en leucine ou en tous les acides aminés. Différentes études sont venues corroborer ces conclusions, il a notamment été mis en évidence que mTORC1 pouvait être activé par Rheb au niveau de l'appareil de Golgi. Concernant le rôle de l'inhibition de mTORC1 au niveau du



**Figure 36:** MEFs were transfected with non-targeting negative control siRNA (siRNA control) or with a couple of siRNA targeting the sequences of RagC and RagD mRNAs (siRNA RagC/D). Cells were cultured with serum in the presence (+Leu) or absence of leucine (-Leu) for 60 min; or in the absence of leucine for 50 min prior to a 10 min leucine stimulation. Immunostaining of mTOR (green) and lamp2 (red); colocalization was determined by confocal microscopy. Bars: 10  $\mu$ m Immunoblot analyses were performed to measure the amount of the indicated proteins and their level of phosphorylation.



**Figure 37:** (A) WT or GCN2-KO (-/-) MEFs were maintained in all amino acids including or excluding leucine (Leu) for the times indicated. Immunoblot analyses were performed on the resulting cell lysates using the indicated antibodies. (B) WT and GCN2<sup>-/-</sup> 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). immunoblot analyses were performed on the resulting cell lysates using the indicated antibodies.

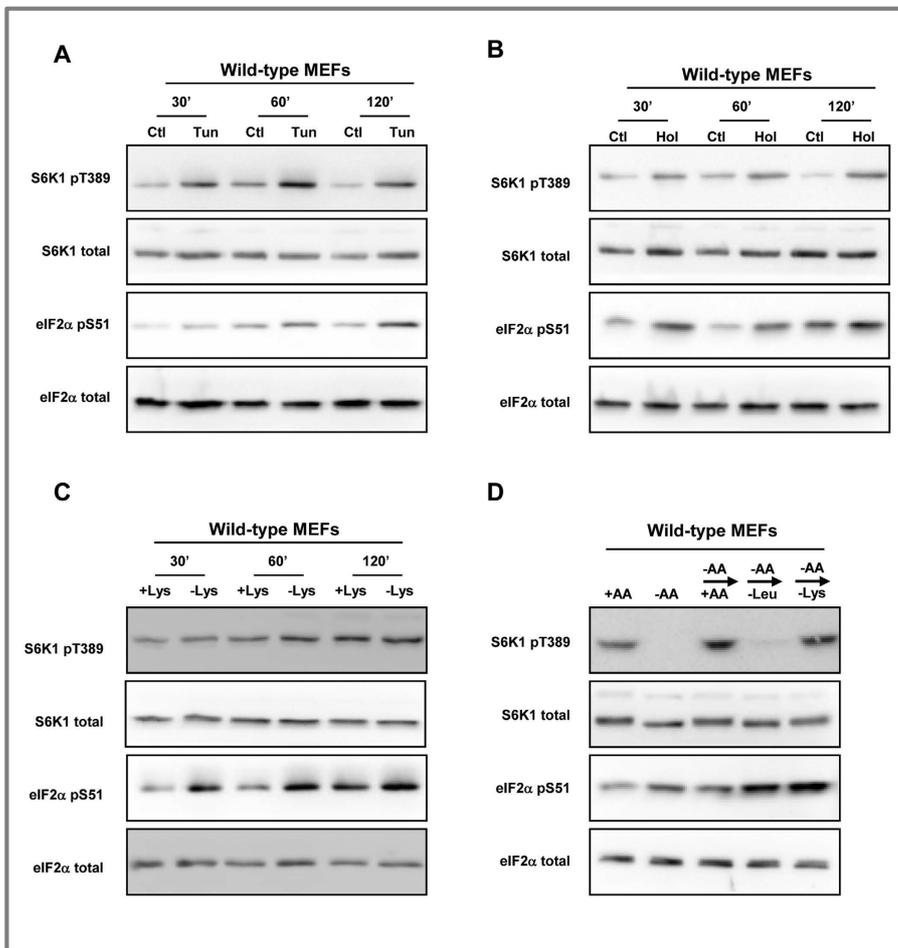


**Figure 38:** (A) WT or ATF4<sup>-/-</sup> MEFs were cultured in presence or in absence of leucine (Leu) with all the other AAs for 30 min, 60 min or 120 min. immunoblot analyses were performed on the resulting cell lysates using the indicated antibodies. (B) WT or Ser51Ala MEFs were cultured in presence or in absence of leucine (Leu) with all the other AAs for 30 min, 60 min or 120 min. immunoblot analyses were performed on the resulting cell lysates using the indicated antibodies

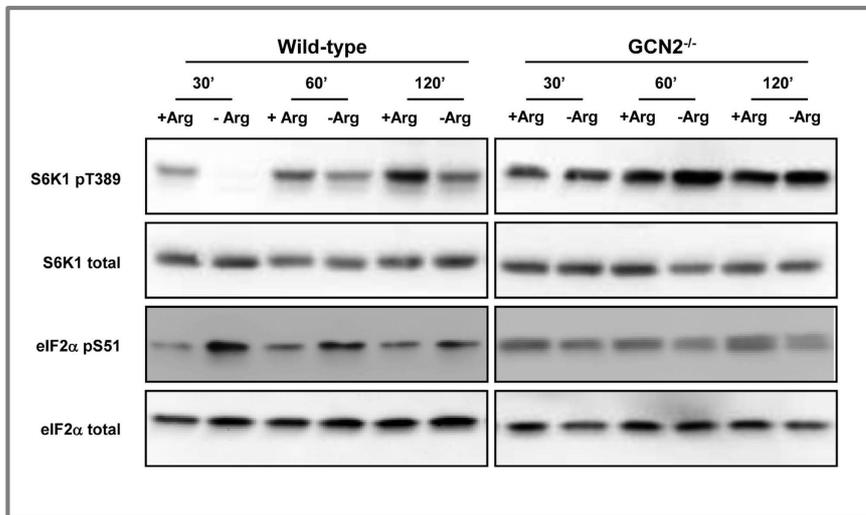
lysosome, l'étude de Demétriades et al. a démontré que la carence en acides aminés entraînait la localisation de TSC2 au lysosome entraînant l'inhibition de Rheb et donc de mTORC1 (91). Plusieurs études sont venues par la suite confirmer le rôle du complexe TSC1/TSC2 dans l'inhibition de mTORC1 au niveau du lysosome par les acides aminés (92,93). Nous avons tenté de déterminer si la leucine pouvait contrôler la localisation de TSC2 au niveau du lysosome, nous n'avons pas été en mesure de caractériser précisément la localisation de TSC2.

### Rôle de GCN2 dans la régulation de mTORC1 par la leucine

Il est important de considérer que les mécanismes de régulation de mTORC1 par la leucine diffèrent de ceux exercés par l'ensemble des acides aminés. Des données de la littérature et nos propres observations ont permis de faire l'hypothèse que l'activation de GCN2, suite à une carence en leucine, pourrait participer à l'inhibition de mTORC1. S'il était probable que la régulation de gènes telle que REDD1 pouvait participer au contrôle de l'activité de mTORC1 lors d'une carence en leucine, nos premiers résultats nous ont orientés vers l'existence d'un rôle non transcriptionnel de GCN2 dans cette régulation. En effet, l'inhibition de mTORC1 par la carence en leucine est détectée dès 30 minutes, cette régulation est perdue dans les MEF GCN2 KO (Fig. 37). De même, après avoir inhibé l'activité mTORC1 par une carence totale en acides aminés, l'ajout d'un milieu carencé uniquement en leucine n'a aucun effet sur l'activité mTORC1 dans les MEF WT alors que dans les cellules GCN2 KO, une induction de l'activité mTORC1 est observée (Fig. 37). L'utilisation de MEFs invalidées pour ATF4 a permis de conclure que son activité transcriptionnelle n'est pas impliquée dans l'inhibition précoce de l'activité de mTORC1 (Fig. 38). En revanche, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  est nécessaire à cette régulation, tout comme dans les MEFs GCN2 KO (Fig. 38). La régulation de mTORC1 par la leucine est perdue dans la lignée exprimant un mutant non phosphorylable d'eIF2 $\alpha$ . En revanche, si cette phosphorylation est nécessaire pour la régulation de mTORC1 par la leucine elle n'est pas suffisante. En effet, l'induction de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  par l'histidinol (un activateur de GCN2) ou la tunicamycine (un activateur de PERK) n'entraîne pas d'inhibition de l'activité mTORC1 (Fig. 39). Nous avons également testé la carence en un autre acide aminé indispensable, la lysine. Cette situation entraîne bien la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  mais n'induit pas l'inhibition de mTORC1 sur un temps court (entre 30' et 120') (Fig. 39). Il est important de souligner que si de nombreuses études se sont intéressées aux effets de la leucine sur la régulation de mTORC1, il n'existait que des données limitées concernant les autres acides aminés. Néanmoins, plusieurs études ont rapporté un effet significatif de la glutamine et de l'arginine sur l'activité mTORC1. L'effet de la glutamine est à mettre en relation avec son rôle



**Figure 39:** (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 → +AA) or a medium containing all AA except leucine (-AA → -Leu) or lysine (-AA → -Lys). Immunoblot analyses were performed to measure the amounts of the indicated proteins and their levels of phosphorylation.

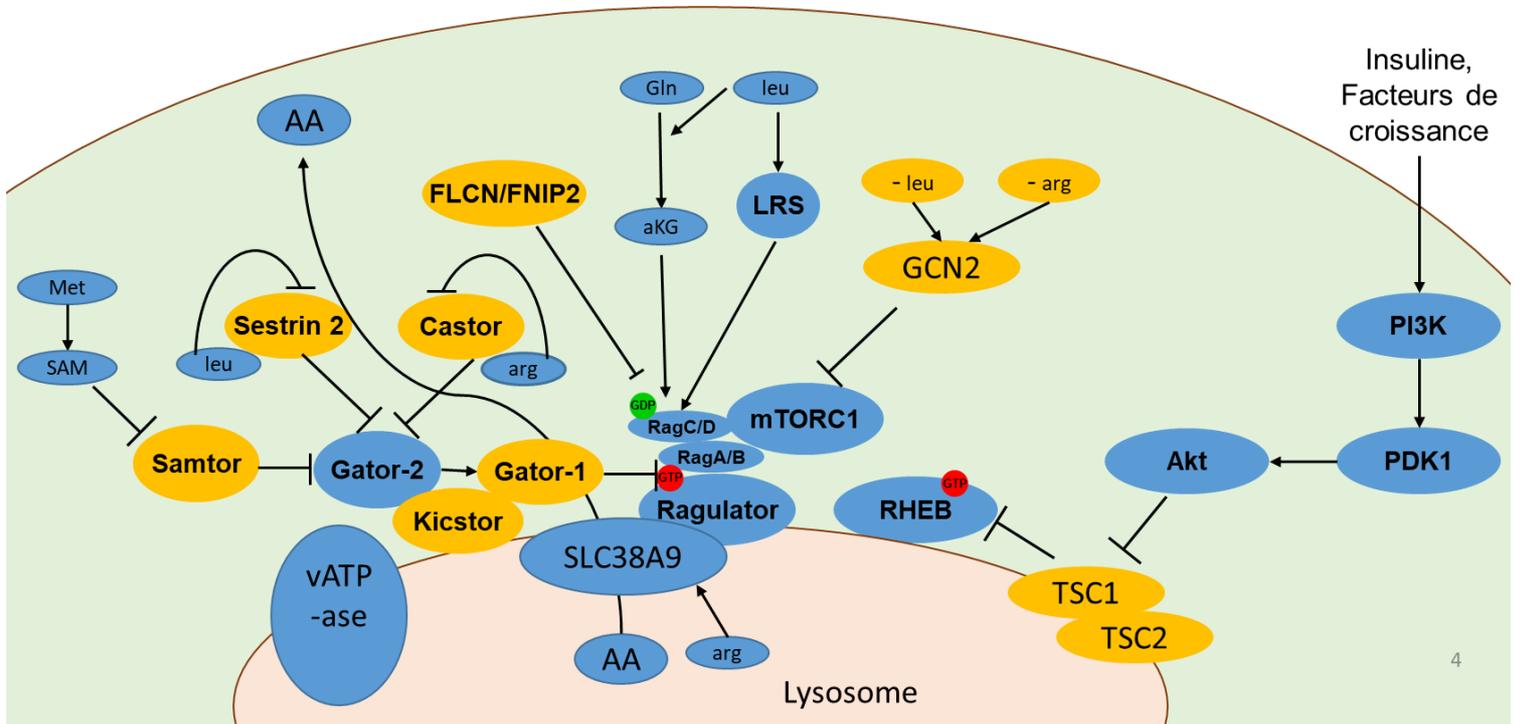


**Figure 40:** WT or GCN2<sup>-/-</sup> MEFs were cultured in presence or in absence of arginine (Arg) with all the other AAs for 30, 60 or 120 min. Immunoblot analyses were performed to assess the amounts of the indicated proteins and their levels of phosphorylation.

de substrat énergétique. Si l'arginine ne fait pas partie des acides aminés indispensables, il est considéré comme un conditionnellement indispensable et la carence en arginine peut induire l'activité de GCN2 (94). Nous avons donc testé cet acide aminé dans notre modèle expérimental. La carence en arginine entraîne bien la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et l'inhibition de l'activité de mTORC1 dès 30 minutes de carence. Comme pour la carence en leucine, cette régulation de l'activité mTORC1 est perdue dans les cellules invalidées pour GCN2 (Fig. 40). Ces travaux ont mis en évidence que l'activité de GCN2 était nécessaire à l'inhibition de mTORC1 lors d'une carence en leucine ou en arginine. En revanche la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  n'est pas suffisante pour inhiber l'activité de mTORC1. Il existe donc d'autres mécanismes impliqués dans la régulation de mTORC1 par la carence en leucine et en arginine.

Durant ces travaux et par la suite, différentes études ont décrit des mécanismes impliqués dans la régulation de mTORC1 par ces deux acides aminés. Toutefois, ces études étudiaient la régulation de mTORC1 au travers de la régulation de la localisation de mTOR. En particulier, les sestrins ont été identifiés comme un senseur cytoplasmique du niveau de leucine. En 2008, la sestrin2 avait été caractérisée comme une cible transcriptionnelle de p53 impliquée dans l'inhibition de mTORC1 lors d'un stress oxydant (95). En 2015, il a été mis en évidence que la sestrin2 pouvait lier la leucine et que cette liaison diminue son activité inhibitrice sur mTORC1 en jouant sur la localisation de mTOR au lysosome (96). Cette découverte constitue une étape majeure dans la compréhension de la régulation de mTORC1 en définissant l'acteur moléculaire responsable de l'effet spécifique de la leucine. Il s'avère que l'expression de la sestrin2 est également régulée par la voie GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4. Les travaux de Ye et al. ont démontré que cette régulation contribue à maintenir l'inhibition de mTORC1 lors d'une carence en leucine (97). Indépendamment de la sestrin2, il a été mis en évidence que la leucyl-tRNA synthétase était elle-même impliquée dans la régulation de l'activité de mTORC1 en régulant l'activité de RagD (98). Schématiquement, en présence de leucine, la leucyl tRNA synthetase exercerait un rôle activateur sur les Rags et en absence de leucine, c'est la sestrin2 qui exercerait son rôle inhibiteur (99). Toutefois, cette dualité dans la régulation de mTORC1 n'est pas totalement admise. Ainsi, dans une de ses dernières revues datant de 2020, David Sabatini ne mentionne pas la leucyl tRNA synthétase (41).

Concernant l'arginine, sur le même principe que les sestrins, le complexe Castor a été identifié comme étant capable de lier l'arginine et de réguler la liaison de mTOR au complexe Ragulator en conséquence (100). Il a été également proposé, toujours par le groupe de David Sabatini, que le transporteur d'acides aminés SLC38A9 localisé au niveau du lysosome jouait également un rôle clé dans la régulation de mTORC1 par les acides aminés. Il régule mTORC1



**Figure 41** : La régulation de mTORC1 par les acides aminés et l'insuline

Les régulateurs négatifs sont représenté en orange. L'aKG (alpha cetoglutarate) est issue de la glutaminolyse. LRS (leucyl-tRNA- synthetase). SAM (s-adenosylmethionine)

en fonction du niveau d'arginine au niveau du lysosome mais également en permettant l'efflux de leucine vers le cytoplasme(101,102). Il existe de nombreux autres travaux ayant mis en évidence des mécanismes de régulation de mTORC1 par les acides aminés. Le complexe SAMTOR a été identifié comme régulant l'activité de mTORC1 en fonction du niveau de S-Adenosyl méthionine qui est corrélé à la disponibilité en méthionine (103). Le laboratoire de M Hall, qui a identifié TOR chez la levure (104), a mis en évidence que le métabolisme de la glutamine régulait l'activité de mTORC1 de manière leucine dépendante (105). L'ensemble de ces mécanismes de détection des acides aminés converge au niveau du lysosome par un jeu complexe de signalisation entre différents complexes multi-protéiques décrits ci-dessous.

#### *La régulation de mTORC1 par les acides aminés, une histoire de complexes.*

Depuis la caractérisation des Rags en 2008, la caractérisation de la régulation de mTORC1 par les acides aminés a progressé de manière très significative (87). Plusieurs complexes multi-protéiques ont été successivement identifiés. Le premier à avoir été caractérisé est le complexe Ragulator qui, en se liant aux Rags et en régulant leurs niveaux de GTP/GDP, permet d'ancrer mTOR au lysosome (88). Il a été proposé initialement que l'activité de la VATPase, le complexe permettant le flux de proton entre le cytoplasme et le lysosome, régulait l'activité du complexe Ragulator en fonction de la disponibilité en acides aminés (106). Toutefois, il s'avère que le rôle de la VATPase n'est pas encore clairement défini. C'est également le cas du complexe folliculin dont la localisation est régulée par la présence d'acides aminés (107). Les complexes GATOR1 et 2 ont également été identifiés comme étant impliqués dans la régulation de mTORC1 par les acides aminés (108). Tout comme le complexe Ragulator, ces complexes agissent sur les niveaux GTP/GDP des rags. Ce sont ces deux complexes qui transmettent le signal des protéines sestrins et castors qui sont impliquées dans la détection de la leucine et de l'arginine (Fig.41).

La régulation de mTORC1 par la leucine est un phénomène complexe mettant en jeu différents processus. La multiplicité des modèles cellulaires et des protocoles expérimentaux contribue à la difficulté à établir un schéma unifié de cette régulation. Il est certain qu'actuellement le modèle proposé par David Sabatini prévaut. Nos travaux *in vitro* apparaissent comme relativement contradictoires avec certaines données de la littérature (97). Dans certains cas, il est important de prendre en compte les différences existantes entre les modèles expérimentaux (109). Néanmoins, *in vivo* que ce soit nos données (non publiées) ou



celles de la littérature, il existe bien un rôle de GCN2 dans la régulation de mTORC1 par la restriction en leucine (110,111).

#### Collaboration sur la période 2009-2020

Le fonctionnement de l'équipe Proteostasis, et anciennement GN, implique de nombreuses interactions entre les différents scientifiques de l'équipe. Ce fonctionnement m'a permis de contribuer de manière plus ou moins importante à plusieurs travaux de l'équipe. De par la proximité thématique que nous avons avec l'équipe dirigée par Dalilla Azzout-Marniche (Equipe ApreM, UMR 914), nous entretenons des échanges réguliers. Durant cette période, j'ai participé à un de ses projets de recherche au travers de l'interprétation de données d'une étude qui a démontré le rôle de GCN2 au niveau hépatique sur la production de FGF21 dans un contexte de régime pauvre en protéines (112). Au niveau national, j'ai également collaborer avec Vincent Ollendorff à qui j'ai apporté ma contribution scientifique et technique dans le domaine de la régulation de mTORC1 par les acides aminés. Leurs travaux ont consisté à mettre au point un outil moléculaire, un biosenseur, permettant de mesure l'activité de mTORC1 dans des cellules en cultures vivantes (113).

Au niveau international, j'ai continué à collaborer avec Chris Proud (Université d'Adelaïde, Australie). J'ai participé à un de leur projet visant à étudier la relation existant entre la production de protéines ribosomales et la régulation de la voie mTORC1 (114). Il a été observé qu'un défaut du mécanisme de synthèse des ARN ribosomaux entraînait une activation constitutive de mTORC1 potentiellement pour compenser la baisse de production des ribosomes. J'ai apporté mon expertise scientifique et technique dans l'étude de la localisation de la protéine mTOR. Plus récemment, nous avons mené un projet de recherche visant à déterminer si l'ISR pouvait être activée par deux immunosuppresseurs, la cyclosporine A et le FK506. Des éléments de la littérature ont amené l'équipe de Chris Proud à faire l'hypothèse que la voie GCN2/eIF2 $\alpha$  pourrait être activée par ces immunosuppresseurs. Nous avons pu mettre en évidence que seul la cyclosporine A induisait l'ISR via l'activation de GCN2 mais également via l'activation de PERK (115). Le mécanisme par lequel la cyclosporine A active GCN2 reste à identifier. Cette étude ouvre des perspectives intéressantes quant au rôle que GCN2 pourrait jouer dans les effets de la cyclosporine A, que ce soit dans les aspects d'immunosuppression ou d'un de ses effets secondaires, la néphrotoxicité. De manière intéressante, il a été mis en évidence que l'induction de l'expression de p8 au niveau du rein par la cyclosporine A contribue à diminuer la néphrotoxicité (68).



## Stratégie nutritionnelle d'activation de GCN2

La caractérisation du rôle de GCN2 dans des situations physiologiques ou pathologiques font partie des objectifs de l'équipe. Plusieurs études ont montré l'importance de GCN2 face à des situations physiologiques ou physiopathologiques conduisant à des perturbations de la disponibilité en acides aminés. Nous avons notamment démontré que lors de la consommation d'un régime carencé en un acide aminé indispensable, GCN2 était nécessaire pour réduire la prise alimentaire d'un tel régime qui s'avère délétère pour l'organisme (116). Plusieurs études dans des modèles animaux ont également montré qu'une activation préalable de la voie GCN2 pouvait exercer un effet protecteur dans différentes situations (pathologiques, stress) comme lors d'un épisode inflammatoire ou en amont d'une intervention chirurgicale (117,118). Dans ces travaux, l'activation de GCN2 est réalisée de manière soit pharmacologique soit nutritionnelle. Dans ce dernier cas, les régimes utilisés reposent sur l'utilisation d'acides aminés libres et non de protéines. Si ce type de régime permet de contrôler précisément les apports en acides aminés, il est difficilement envisageable de les utiliser dans le cadre d'approches nutritionnelles préventives chez l'homme. Il est donc nécessaire de définir des stratégies nutritionnelles pouvant activer GCN2 sur le long terme. L'une des stratégies serait d'identifier des composés nutritionnels capables d'induire l'activité de GCN2 indépendamment d'une restriction en acides aminés indispensables.

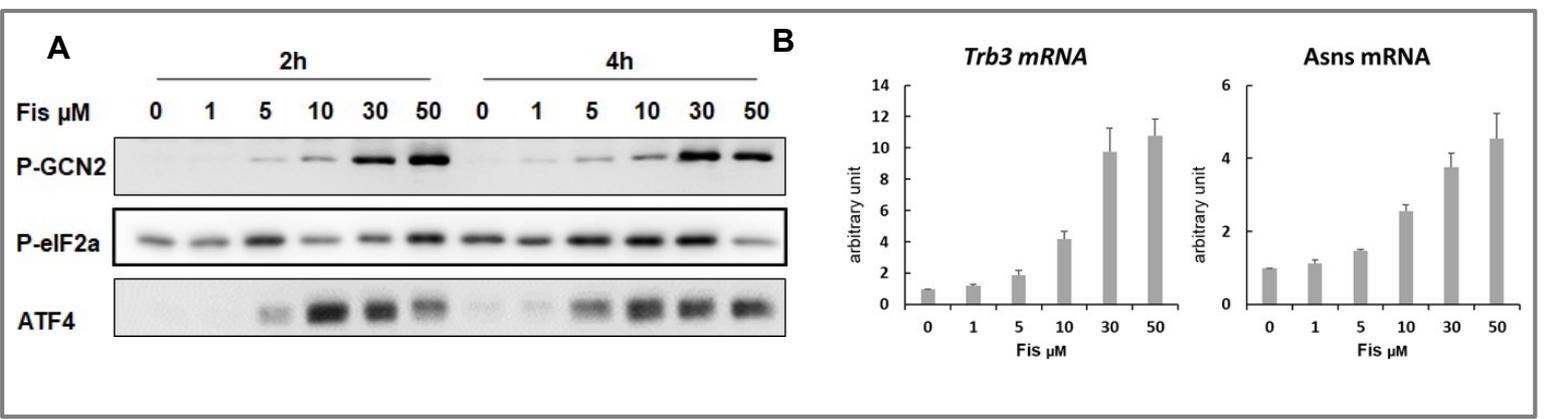
### GCN2 et polyphénols.

Ce projet a été initié en 2016. Des données (non publiées) communiquées par Yohann Wittrant, chercheur à l'UNH, avait mise en évidence que le traitement à la fisétine, un polyphénol de la famille des flavanols, induisait l'expression de gènes cible d'ATF4 dans un modèle d'ostéoblaste en culture. Les polyphénols constituent une large famille de molécules du règne végétal. Ces métabolites assurent pour les végétaux diverses fonctions telles que la protection contre les agressions par les UV ou les parasites. Chez l'Homme, des études ont mis en évidence que la consommation régulière de polyphénols était associée à un risque réduit d'un certain nombre de pathologies dont les maladies cardiovasculaires ou des troubles neurodégénératifs (119,120). Initialement, les polyphénols ont été principalement caractérisés pour leurs effets antioxydants. Toutefois, il est maintenant bien établi que les mécanismes par lesquels ils exercent des effets bénéfiques sont multiples. Concernant plus particulièrement la fisétine, il s'est avéré qu'une étude avait déjà mis en évidence en 2013, dans la lignée neuronale HT22, qu'un traitement avec ce polyphénol entraînait une augmentation du niveau protéique

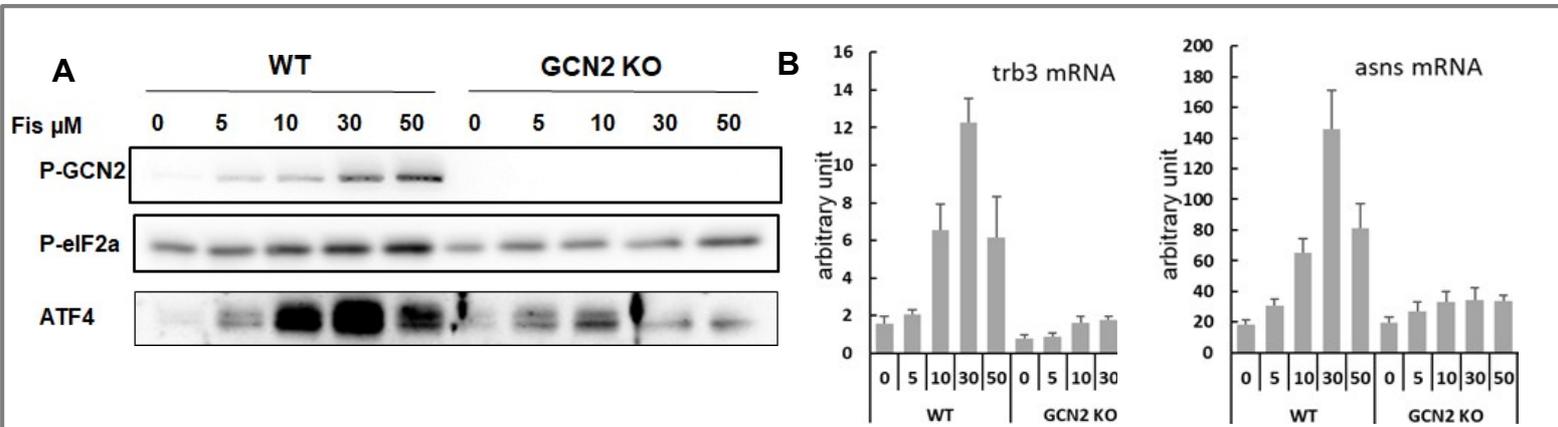


d'ATF4 (121). D'après leurs données, cette induction d'ATF4 ne serait pas dépendante de PERK. Une autre étude a montré que la fisétine peut interagir avec la tyrosyl-ARNt synthétase (YARS) d'un protozoaire et inhiber son activité (122). Si nous faisons l'hypothèse que cette liaison puisse se produire chez les mammifères, la fisétine pourrait donc induire l'inhibition de la YARS entraînant une augmentation des niveaux d'ARNt libres de la tyrosine et donc l'activation de GCN2. Il est important de mentionner que plusieurs voies de signalisation ont été caractérisées comme étant régulées par la fisétine (Akt, mTOR, MAPK) (123–125). Toutefois, dans le modèle proposé, l'activation de GCN2 résulterait d'un effet direct de la fisétine sur la YARS, il peut donc être envisagé que GCN2 puisse contribuer de manière significative à certains des effets biologiques de la fisétine. Ce polyphénol a été notamment caractérisé pour ses effets sur les processus de mémorisation et en particulier, dans des modèles murins de Maladie d'Alzheimer (126). Si les données sur le rôle potentiel de GCN2 dans la Maladie d'Alzheimer sont contradictoires (127,128), il est intéressant de noter que les souris GCN2 KO présentent des altérations des mécanismes de plasticité neuronale et de mémorisation (129). La fisétine a été également caractérisée comme un composé qui permet l'élimination des cellules sénescentes (130). Cette activité sénolytique réduit le nombre de cellules sénescentes chez la souris, cet effet est associé à une augmentation de la longévité (131). Il serait donc intéressant de déterminer la contribution de GCN2 aux effets neuroprotecteurs ou sénolytiques de la fisétine. L'une des problématiques de la fisétine commune à tous les polyphénols est sa faible biodisponibilité, les concentrations retrouvées au niveau plasmatique des polyphénols sont généralement inférieures à 1µM. Cette problématique est d'autant plus importante si l'on envisage l'apport des polyphénols dans le cadre d'un régime alimentaire et non sous la forme de supplément. Cependant, l'hypothèse d'une interaction de la fisétine avec la YARS de mammifère pourrait être étendue à d'autres polyphénols, voire d'autres composés phénoliques (la tyrosine étant elle-même un composé phénolique). Plusieurs flavonoïdes ont été décrits comme des inhibiteurs de YARS d'*Escherichia coli* (132). Il a également été démontré que le resvératrol, un polyphénol de la famille des stilbènes, pouvait interagir avec la YARS de mammifère (133). Il pourrait donc être envisagé d'établir une stratégie nutritionnelle basée sur une combinaison d'aliment riche en polyphénols capable d'interagir avec la YARS afin d'atteindre une concentration suffisante pour activer GCN2.

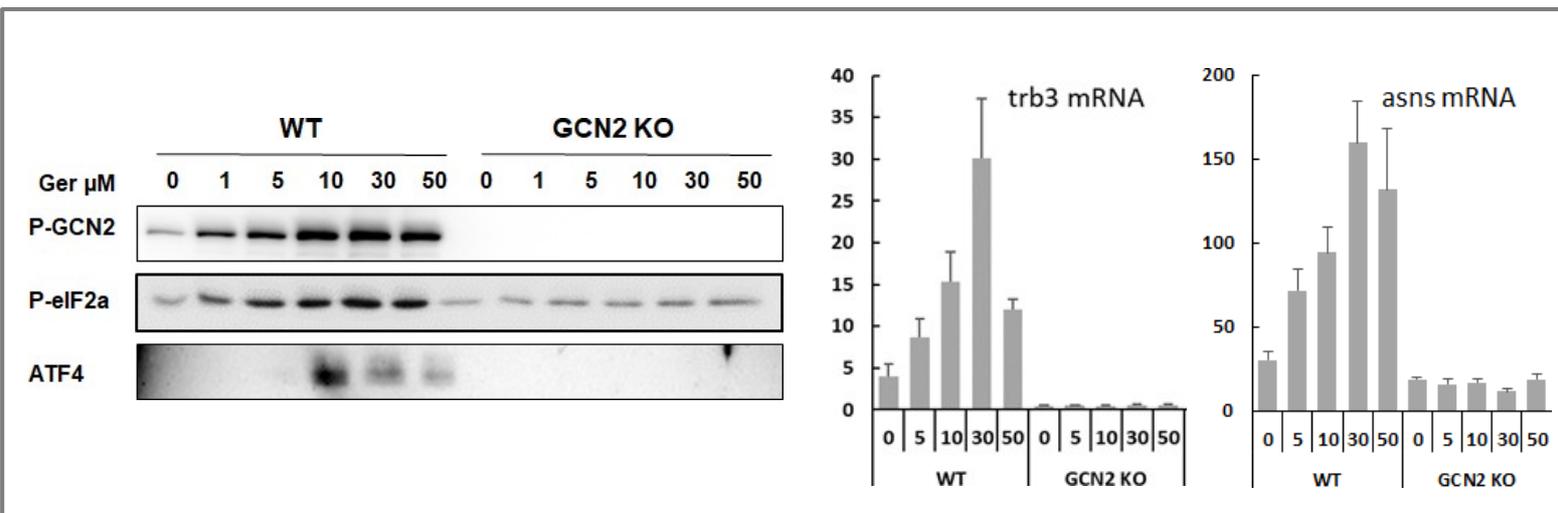
Ces données n'ont pas encore été publiées, une partie des résultats présentés va faire l'objet d'une soumission. Certaines des figures présentées dans ce manuscrit ne sont pas complètes. Une partie de ce projet a fait l'objet du stage de Master 2 de Jean Baptiste Bizeau. Le premier



**Figure 42:** (A) Des cellules HT22 ont été traitées pendant 2 h et 4 h avec les doses indiquées de fisétine, des analyses par westren blot ont été réalisées avec des anticorps dirigés contre p-GCN2, p-eIF2a et ATF4. (B) Des cellules HT22 ont été traitées pendant 6 h avec les doses indiquées de fisétine, les niveaux d'ARNm de *Trb3* et d'*ASNS* ont été déterminés par RT-qPCR.



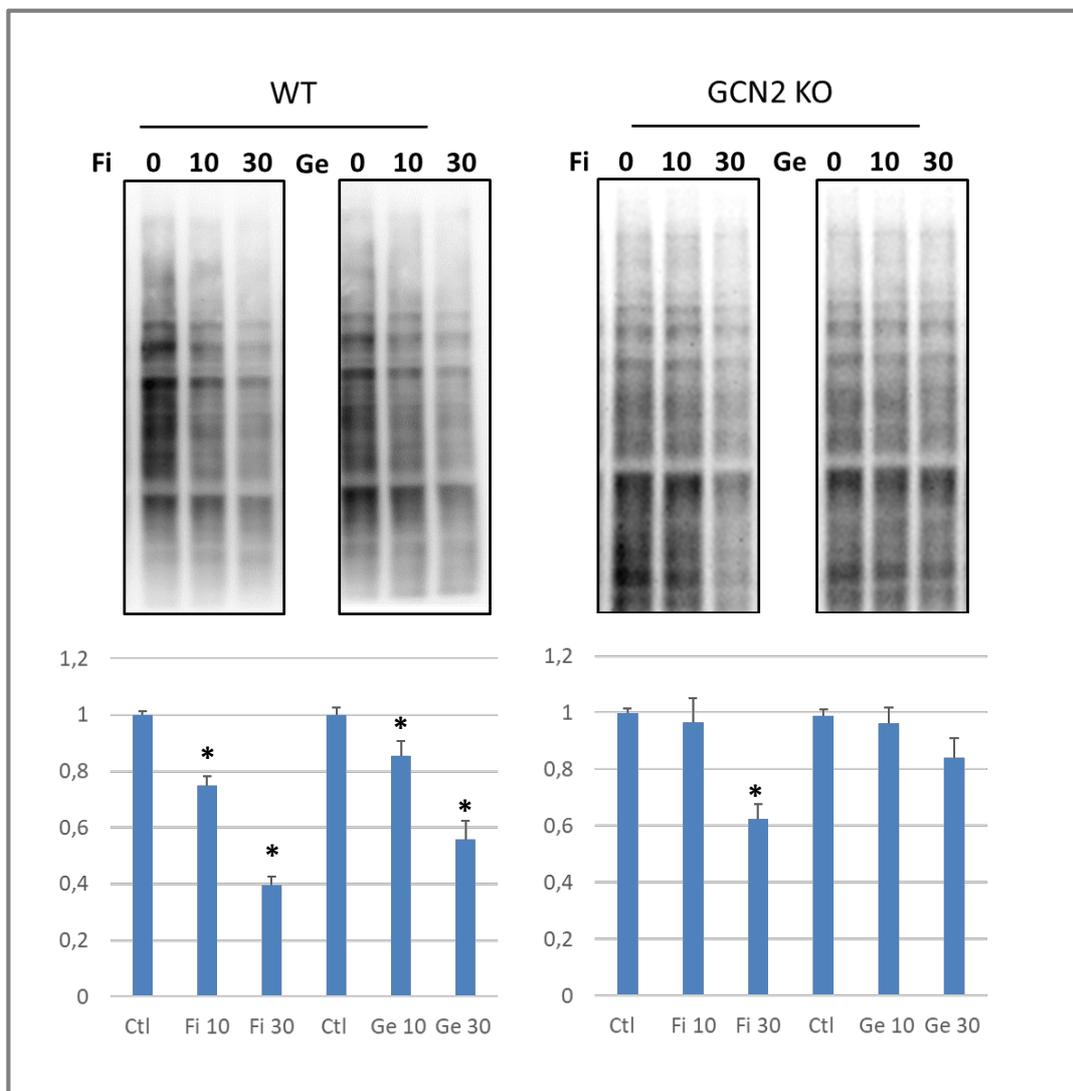
**Figure 43:** (A) Des MEFs WT et GCN2 KO ont été traitées pendant 4 h avec les doses indiquées de fisétine, des analyses par westren blot ont été réalisées avec des anticorps dirigés contre p-GCN2, p-eIF2a et ATF4. (B) Des MEFs WT et GCN2 KO ont été traitées pendant 6 h avec les doses indiquées de fisétine, les niveaux d'ARNm de *Trb3* et d'*ASNS* ont été déterminés par RT-qPCR.



**Figure 44:** (A) Des MEFs WT et GCN2 KO ont été traitées pendant 4 h avec les doses indiquées de géraldol, des analyses par westren blot ont été réalisées avec des anticorps dirigés contre p-GCN2, p-eIF2a et ATF4. (B) Des MEFs WT et GCN2 KO ont été traitées pendant 6 h avec les doses indiquées de fisétine, les niveaux d'ARNm de *Trb3* et d'*ASNS* ont été déterminés par RT-qPCR.

objectif a été de déterminer les effets de la fisétine sur l'activité de la voie GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4 dans la lignée neuronale HT22. Nos travaux ont permis de montrer qu'un traitement de 2 heures et 4 heures à la fisétine entraînait l'activation de GCN2 et en conséquence, une augmentation du niveau protéique d'ATF4 dès 10  $\mu$ M (Fig. 42). Cette augmentation de l'expression d'ATF4 est associée à une induction de l'expression de ses gènes cibles après 6 heures de traitement. L'utilisation d'un inhibiteur de GCN2 mais aussi de MEF GCN2 KO a permis de mettre en évidence que GCN2 contribuait majoritairement à la régulation d'ATF4 et de ses gènes cibles (Fig. 43). Par le même type d'approche, nous avons pu également démontrer que le principal métabolite de la fisétine, le geraldol, entraînait également une augmentation de l'expression d'ATF4 de manière GCN2 dépendante (Fig. 44). Il est important de mentionner que si la dose de 10 $\mu$ M est certes supraphysiologique, elle exerce des effets protecteurs contre le stress oxydant dans les cellules HT-22 et n'a pas d'effet pro-apoptotique sur les MEFs. Les effets du resvératrol ont également été testés. Aucun effet sur l'activité de GNC2 n'a pu être mis en évidence. Nous avons également testé plus d'une dizaine des principaux représentants des familles de polyphénols. Seul le kampferol est susceptible d'induire l'activité de GCN2 dans les MEFs. Les résultats obtenus dans les cellules HT22 n'ont pas été concluants. Ce polyphénol est très proche de la fisétine en terme de structure. Bien qu'il ait été caractérisé comme interagissant avec la YARS, le resvératrol n'a pas induit l'activité de GCN2 dans notre modèle expérimental. Les résultats obtenus *in vitro* ont clairement mise évidence que la fisétine et le geraldol pouvait induire l'activité de GCN2. Néanmoins, cette propriété semble être limitée à un nombre restreint de polyphénols.

Nous avons ensuite tenté de déterminer le mécanisme impliqué dans l'activation de GCN2 par la fisétine. La première hypothèse testée était que la fisétine pouvait se lier à la tyrosyl-ARNt synthetase et inhiber son activité. Une première série d'expérience de Résonance Plasmonique de Surface ou SPR a été réalisée. Il s'agit d'une technique précise et sensible pour déterminer les paramètres d'interaction entre deux molécules. Hormis que cette technique fait partie des savoir-faire de l'équipe, nous l'avons choisi pour pouvoir cribler des polyphénols en fonction de leur capacité à interagir avec la YARS et donc potentiellement, d'induire l'activité de GNC2. Aucune interaction entre la tyrosyl-ARNt synthétase et la fisétine ou le geraldol n'a été mise en évidence. Une interaction de la tyrosyl-ARNt synthétase et de la tyrosine a bien été mise en évidence par cette technique. Toutefois, il s'agit d'expériences préliminaires qui ne permettent pas de conclure. Le niveau de charge des ARNt a également été étudié dans les MEFs par une technique de purification différentielle des ARNt chargés et non chargés et l'utilisation d'une puce spécifique (Collaboration Zoya Ignatova université d'Hambourg)



**Figure 45** : Des MEFs WT et GCN2 KO ont été traitées pendant 2 h avec les doses indiquées de fisétine et geraldol, des analyses par westren blot ont été réalisées avec un anticorps dirigés contre la puromycine, le signal a été quantifié et rapporté à la quantité totale de protéine présente sur la membrane (n=3) \* indique une différence significative avec le Ctl (Test t, P ≤ 0,05)

L'utilisation de cette technique n'a pas permis de mettre en évidence d'accumulation d'ARNt non chargés que ce soit ceux de la tyrosine ou d'un autre acide aminé lors d'un traitement à la fisétine ou au geraldol de 2h. Au contraire, une augmentation de la charge de plusieurs ARNt a été observée. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les effets de la fisétine et du geraldol ne sont pas médiés par l'inhibition de l'activité de la tyrosyl ARNt synthétase. Nous avons également testé si le traitement à la fisétine pouvait induire une diminution du contenu cellulaire en un ou plusieurs acides aminés indispensables dans les MEFs. Aucune diminution n'a été observée, en revanche après 4 heures de traitement le contenu en plusieurs AAI est augmenté, ce résultat est cohérent avec l'augmentation de la charge des ARNt qui a été observée. Ces résultats suggèrent que le traitement à la fisétine induit une inhibition de la synthèse protéique ce qui est cohérent avec l'activation de GCN2 et la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ . Le niveau de synthèse protéique a été étudié par la technique de SUnSET. Cette approche a permis de confirmer que le traitement à la fisétine mais aussi au geraldol entraîne bien une inhibition de la synthèse protéique et ce, de manière GCN2 dépendante, hormis pour la dose de 30  $\mu$ M de fisétine qui induit toujours une inhibition de la synthèse protéique. La dose de 30  $\mu$ M entraîne une diminution de la synthèse mais qui n'est pas statistiquement significative (Fig.45). Il peut être envisagé que la fisétine, en induisant PERK à cette dose, inhibe la synthèse protéique.

Au-delà de déterminer la contribution de GCN2 dans l'inhibition de la synthèse protéique, la question se posait de savoir si la fisétine ou le geraldol pouvait impacter directement un élément de la machinerie traductionnelle contribuant à l'activation de GCN2. En effet, ces dernières années, plusieurs études ont mis en évidence que des altérations de l'élongation et plus particulièrement, de la fonction ribosomale pouvaient conduire à l'activation de GCN2. En particulier, une étude publiée en 2020 a mis en évidence qu'un stress cellulaire (traitement à l'anisomycine) provoquant une « collision » des ribosomes due au ralentissement de la vitesse d'élongation entraînait l'activation de GCN2 via la MAP3kinase ZAK $\alpha$  (134). Cette kinase avait été notamment caractérisée pour son rôle dans la réponse à des stress ribotoxiques. Il s'avère qu'une étude a démontré que la fisétine pouvait induire l'expression de cette kinase et potentiellement, son activité. Nous nous sommes donc procuré les cellules ZAK $\alpha$  KO utilisées par Wu et al. L'ensemble des résultats obtenus montre clairement que ZAK $\alpha$  n'est pas nécessaire à la régulation de la voie GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4, sans que nous ne puissions pour autant exclure qu'elle puisse y contribuer. De plus, si l'anisomycine induit clairement une phosphorylation de ZAK $\alpha$ , aucun effet de la fisétine ou du geraldol n'a pu être observé. Enfin, si nous avons pu reproduire les résultats de Wu et al, il semble que la



phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  par ZAK $\alpha$  soit observable dans des conditions très spécifiques de traitement à l'anisomycine (temps et doses).

Des expériences ont été également menées pour déterminer si la fisétine induisait la voie GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4 *in vivo*. Pour cela, nous avons eu recours à une lignée transgénique développé par Alain Bruhat, la souris CARE-LUC (135). Cette lignée exprime le gène rapporteur luciférase sous le contrôle de l'élément de réponse à ATF4 (CARE). La luciférase exprimée dans les tissus catalyse l'oxydation de la luciférine injectée à l'animal. La détection de la lumière émise lors de cette réaction permet ainsi de visualiser l'activation de la voie eIF2 $\alpha$ /ATF4 au niveau de l'animal entier vivant ou d'un organe isolé par imagerie bioluminescente. La première série d'expériences menée a consisté à administrer, par gavage ou par injection, la fisétine à différentes doses sur 5 jours avec des mesures de l'activité luciférase quotidienne. Ce protocole n'a pas permis de mettre en évidence d'activation de la transcription ATF4 dépendante par la fisétine. Toutefois, il est possible que le modèle de souris CARE-LUC ne permette pas de détecter une faible activation de la voie. Nous envisageons de mesurer directement l'expression de différents gènes ATF4 dépendants au niveau de différents organes dont le foie, l'intestin, le muscle et le cerveau à la suite de l'administration de fisétine par gavage.

Les résultats obtenus *in vitro* ont permis de mettre en évidence que la fisétine et le geraldol pouvaient induire l'activation de GCN2. Il reste à déterminer le mécanisme d'activation de GCN2 par ces polyphénols. Plusieurs études récentes montrent que l'activation de GCN2 peut être engendrée indépendamment du niveau de charge des ARNt. L'étude de ces polyphénols constitue donc un modèle pour potentiellement identifier de nouveaux mécanismes. La compréhension de ces derniers serait particulièrement intéressante pour caractériser les situations dans lesquelles GCN2 peut être activée et jouer un rôle. Il est notable que les modèles transgéniques ou l'identification de mutations de GCN2 ont mis en évidence son rôle dans des processus physiologiques ou pathologiques indépendamment d'aspects nutritionnels (129,136). Toutefois, l'objectif initial de ce projet était de définir une stratégie nutritionnelle pouvant induire l'activité de GCN2. *In vitro*, il apparaît que la capacité à activer GCN2 ne constitue pas une caractéristique partagée par de nombreux polyphénols. *In vivo*, les premières expériences suggèrent que la fisétine n'induit pas ou que faiblement l'activité de GCN2. L'ensemble de ces observations ne sont pas en faveur de l'hypothèse d'une stratégie nutritionnelle basée sur les polyphénols induisant la voie GNC2. Il demeure que les travaux menés *in vivo* par d'autres équipes ont mis clairement en évidence un rôle spécifique de la fisétine, en particulier en tant que sénolytique ayant des effets positifs sur la longévité. Plusieurs essais cliniques sont en cours



dont l'un concernant les effets sénolytiques dans le contexte de l'arthrose. Les doses utilisées dans ces travaux ou ces essais correspondent à celles que nous avons utilisé dans les expériences que nous avons menés *in vivo*, il s'agit de doses pharmacologiques qui ne peuvent pas être atteintes dans la cadre de l'alimentation. Bien que l'objectif initial était établir une stratégie nutritionnelle d'activation de GCN2, il serait intéressant d'étudier la contribution de GCN2 ou de l'ISR dans les effets sénolytiques de GCN2.



## Projet de Recherche

Le projet de recherche ici présenté partage le même objectif que le projet précédent à savoir, mettre au point une stratégie nutritionnelle permettant de tirer parti des effets préventifs potentiels de l'activation de la voie GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4 qui soit transposable à l'Homme. Comme énoncé précédemment, il a été démontré que l'activation de GCN2 pouvait contribuer à limiter les effets adverses d'un épisode inflammatoire au niveau intestinal ou d'une ischémie/reperfusion (117,118). Plusieurs hypothèses ont été faites concernant le rôle protecteur que GCN2 pourrait exercer, notamment via son rôle dans la régulation de l'inflammation ou de l'autophagie (137,138). La question se pose également quant à la contribution que GCN2 pourrait avoir dans les restrictions nutritionnelles en protéines ou en acides aminés. Il est bien établi que ces approches nutritionnelles dans des modèles animaux exercent des effets bénéfiques sur le métabolisme ou encore la longévité (ces aspects sont détaillés ci-dessous) (139). Cette question de l'effet préventif de l'activation de GCN2 est devenue l'un des axes de recherche de l'équipe Proteostasis. Anne-Catherine Maurin a mis en évidence chez la souris que l'activation préalable de la voie GCN2/eIF2 $\alpha$ , par un traitement modéré à l'halofuginone (un activateur de GCN2), exerce un effet positif sur les paramètres mitochondriaux hépatiques lors d'un stress ultérieur causé par l'injection de lipopolysaccharide (manuscrit en préparation). Lydie Combaret développe un projet visant à déterminer si l'activation de la voie GCN2/eIF2 $\alpha$  par le même type de traitement pouvait conférer un effet protecteur vis-à-vis de situations entraînant une atrophie musculaire.

La stratégie proposée dans ce projet repose sur l'hypothèse que la consommation de protéines présentant une composition déséquilibrée en acides aminés indispensables peut conduire à l'activation de la voie GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4. La notion de protéine déséquilibrée désigne une protéine dont les niveaux respectifs en acides aminés ne correspondent pas à ceux nécessaires au maintien de la balance azotée dans le cadre d'un apport protéique correspondant aux recommandations. Il existe des systèmes d'évaluation de la qualité des protéines dont le DIASS (Digestible Indispensable Amino Acid Score) qui prend en compte la composition et de la digestibilité d'une protéine (140). Les protéines alimentaires d'origine animale sont toutes considérées comme étant de bonne qualité, avec une bonne digestibilité et fournissant suffisamment d'acides aminés indispensables. En revanche, de nombreuses protéines végétales présentent des déséquilibres plus ou moins marqués en acides aminés indispensables. C'est en particulier le cas des légumineuses et des céréales qui présentent respectivement une plus faible proportion en méthionine et en lysine. Cette notion de qualité des protéines en fonction de leur



composition est l'un des sujets de recherche qui connaît un nouvel intérêt au travers de la question de la transition alimentaire. Pour des enjeux écologiques voir sociétaux, il existe une volonté de substituer une part des protéines animales de notre alimentation par des protéines végétales. De nombreuses études visent à proposer des stratégies pour améliorer la qualité des apports en acides aminés des régimes à base de protéines végétales. Ces stratégies vont de la sélection variétale à la mise au point de régimes combinant plusieurs sources de protéines végétales. Le projet présenté vise au contraire à tirer parti de ce déséquilibre des protéines végétales pour activer la voie GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4 afin de définir une stratégie de nutrition préventive.

Plusieurs études ont déjà démontré que moduler l'apport en acides aminés en jouant sur les protéines de l'alimentation peut entraîner l'activation de la transcription ATF4 dépendante, voire l'activation de GNC2. Deux cas doivent être distingués, les études basées sur des régimes pauvres en protéines animales (5% au lieu de 16 à 20%) et les études basées sur l'utilisation de protéines végétales. Dans le premier cas, les travaux de Chalvon-Demersay *et al.* (Auxquels j'ai contribué) ont montré que la consommation de 1g sur 2 heures d'un régime contenant 5% de protéines de lait entraînait l'activité de GCN2 contrairement au régime contenant 20% de protéines (112). Dans le deuxième cas, seules deux études ont montré que la consommation d'un régime contenant une ou des protéines de soja (20% dans le régime) induisait l'expression d'ATF4 et de ses gènes cibles (141,142). Toutefois, l'implication de GCN2 n'a pas été déterminée dans les effets des protéines de soja. De plus, les expériences ont été réalisées sur de jeunes animaux qui, étant en croissance, présentent des besoins en acides aminés plus élevés. Les protéines de soja, tout comme les légumineuses, présentent un faible contenu en acides aminés soufrés, la méthionine, un acide aminé indispensable et la cystéine, un acide aminé conditionnellement indispensable (143).

Ces deux acides aminés soufrés jouent un rôle majeur dans la régulation du statut oxydant. La cystéine est le précurseur de la synthèse du glutathion et la méthionine peut être convertie en cystéine. Il existe une littérature extensive sur les effets de la restriction en protéines ou en acides aminés soufrés sur le long-terme au sein de modèles animaux (139,144,145). Tout comme la restriction calorique, ce type de restriction exerce de nombreux effets telle que l'augmentation de la longévité ou la protection contre le développement du diabète de type 2 ou l'obésité. A titre d'exemple, il peut être mentionné l'étude de Castano-Martinez *et al* qui a mis en évidence que la consommation d'un régime restreint en méthionine et en cystéine permettrait de ralentir le développement de l'obésité et de l'insulino-résistance dans la souris NZO (un modèle d'obésité polygénique)(146). De nombreux travaux se sont



intéressés aux effets bénéfiques de ces restrictions sur le métabolisme. Dans cette littérature, le rôle de l'hormone FGF21 occupe une place prépondérante. Une grande partie des effets bénéfiques de la restriction en protéines ou en acides aminés soufrés est attribuée à cette hormone synthétisée majoritairement au niveau du foie (147). Elle a notamment été caractérisée comme un gène cible de PPAR $\alpha$  jouant un rôle clé dans la réponse au jeûne (148,149). La contribution de GCN2 aux effets de la restriction en protéines ou en méthionine n'a été que peu étudiée. Dans le contexte de la restriction en protéines il a été montré dans des modèles de souris GCN2 KO que la régulation de son expression dépendait de GCN2 et ATF4. Toutefois, après 27 semaines, la régulation du FGF21 et les effets métaboliques sont toujours observés chez les souris KO (150). Concernant la restriction en méthionine dans un contexte de régime obésogène, les travaux de Pettit *et al.* ne montrent qu'une contribution restreinte de GCN2 dans la régulation de l'expression de FGF21 après 2 jours ou 5 semaines de régimes(151). Dans cette étude, les effets de la restriction sont attribués à une activation de PERK et du facteur de transcription NRF2 mais n'impliqueraient pas la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ . L'activation de PERK et de NRF2, qui joue un rôle majeur dans la réponse au stress oxydant, est cohérent quant au rôle des acides aminés soufrés dans le contrôle du statut redox via la synthèse du glutathion. Il est important de préciser que si le terme restriction en méthionine est souvent employé il s'agit souvent d'une restriction partielle en méthionine (0,17% au lieu de 0,85% du régime) et d'une restriction totale en cystéine. Certaines études utilisent bien le terme de restriction en acides aminés soufrés alors que beaucoup utilisent le terme de restriction en méthionine alors qu'il s'agit du même type de restriction. Au sein de l'équipe Proteostasis, la contribution de GCN2 à l'activation de l'ISR par la restriction en AAS sur le court terme (quelques heures) est également étudiée par Alain Bruhat et Isabelle Papet. Les premiers résultats (non publiés) montrent que GCN2 contribue à l'activation précoce de la transcription ATF4 dépendante lors de la prise d'un repas. Une partie du projet repose sur l'utilisation de protéines avec de faibles niveaux en acides aminés soufrés, cette approche sera complémentaire du projet de recherche développer par mes collègues.

La restriction en AAS n'est pas la seule restriction en acides aminés susceptible d'exercer des effets bénéfiques sur le long terme. Des études ont également montré qu'une restriction en acides aminés branchés (isoleucine, leucine, valine) peut également améliorer les paramètres métaboliques et la longévité (152,153). Une étude récente suggère que ce serait en particulier la restriction en isoleucine qui exercerait les effets bénéfiques sur des paramètres métaboliques (154). Néanmoins, l'ensemble de ces études a été mené avec des restrictions permanentes sur le long court. De telles interventions ne sont pas sans conséquence sur des



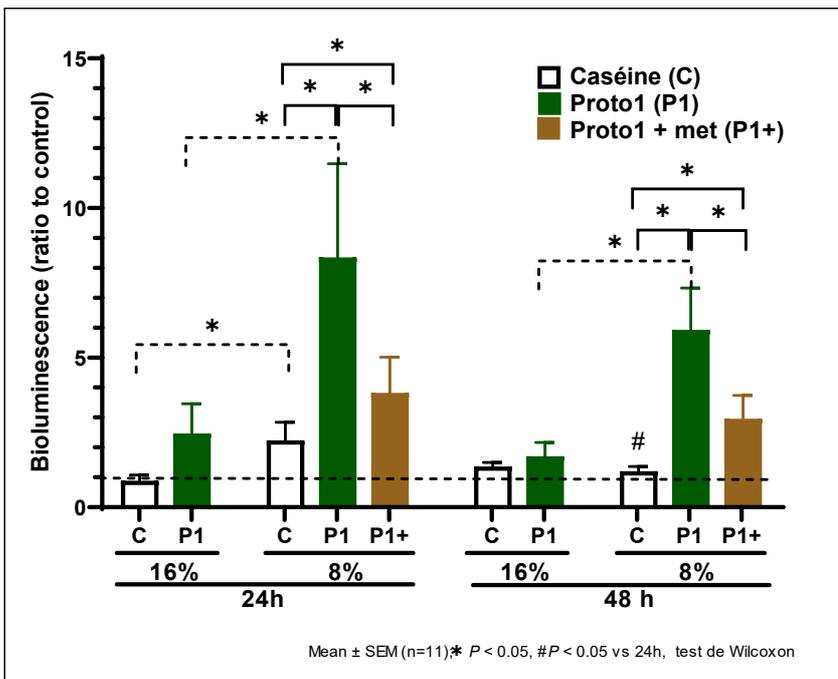
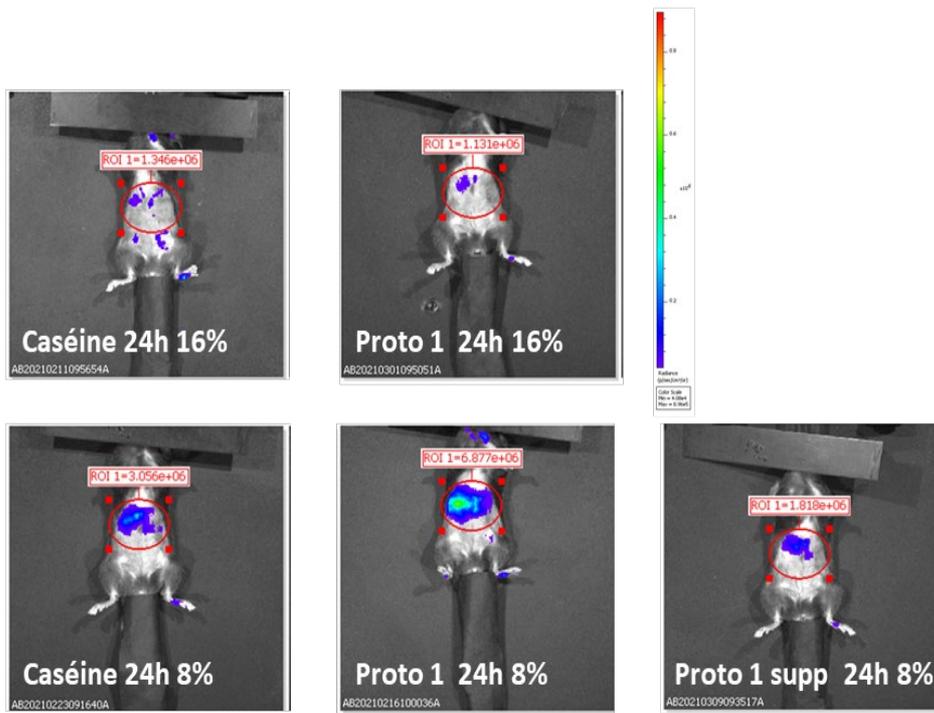
paramètres tels que la croissance, la fertilité ou encore la masse osseuse. **Le projet que je propose d'initier vise à déterminer si la consommation d'un régime à base de protéines végétales de manière discontinue pourrait entraîner une activation modérée de la voie GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4 et reproduire les effets bénéfiques d'une restriction permanente en acides aminés libres. Il s'agira également de déterminer la contribution de GCN2 dans ces effets.**

## Description du projet de recherche

Les points évoqués ci-dessous abordent les principaux aspects qui seront abordés lors de ce projet dans les années à venir. Il s'agit d'une vue générale et non exhaustive des protocoles et analyses qui seront réalisés

### 1) Identification de protéines végétales pouvant induire la voie de signalisation GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4

L'un des objectifs est la mise au point du protocole nutritionnel d'activation de la voie par la consommation intermittente de la voie sur plusieurs semaines. En premier, il convient de définir si la prise ponctuelle d'un régime dont l'apport protéique se fait sous la forme d'une protéine végétale (blé, pois,..) déséquilibrée en un AAI (lysine, méthionine...) induit la voie GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4 chez la souris adulte. Pour répondre à cette question, la lignée de souris transgénique CARE-LUC s'avère particulièrement adaptée à cette étude. Les souris adultes seront soumises à différents régimes comportant une seule source de protéine végétale (mélange de protéine pour le témoin) à différents pourcentages sur une période allant de 6h à 24h. Outre l'activité luciférase, nous déterminerons les concentrations en acides aminés plasmatiques. Une fois que les conditions de régimes permettant une activation de la voie auront été déterminées, nous pourrons envisager des analyses plus poussées sur le niveau d'activation de la voie dans différents organes en mesurant notamment le niveau d'expression des gènes cibles d'ATF4. De plus, des expériences de supplémentation de la protéine végétale avec l'acide aminé limitant seront réalisées pour valider son implication dans l'activation de la transcription AARE dépendante. Afin de déterminer si l'induction du programme transcriptionnel d'ATF4 est bien



**Figure 46:** Des souris CARE-LUC ont été mise à jeun 16h avant de recevoir un régime contenant soit 16% de caséine (C) ou de prototype 1 (P1) soit 8% de caséine (C) ou de prototype 1 (P1) soit une régime contenant 8% de prototype 1 supplémenté en méthionine à hauteur du contenu en méthionine du régime 8% caséine. L'activité Luciférase a été mesurée 24h et 48h après le début du régime. Les images sont représentative des moyennes des inductions. Chaque souris est son propre contrôle (n=11).

due à l'activation de GCN2, nous répèterons les expériences dans les lignées de souris GCN2 KO et GCN2 KO CARE-Luc.

### *Résultats préliminaires*

Nous avons choisi de tester en premier lieu une protéine déséquilibrée en acides aminés soufrés. Cette protéine dit prototype 1 nous a été fourni par l'entreprise Roquette. En se référant au besoin du rongeur, nous avons testé un régime contenant 8% de ce prototype afin de générer un défaut d'apport en méthionine. Nous avons également testé un apport de 16% du prototype dans le régime, ce pourcentage correspondant à la quantité de protéine classiquement présente dans les régimes d'entretien. Comme protéine de référence, nous avons utilisé la caséine qui a également été amenée à hauteur de 8 et 16% dans le régime. Les souris CARE-Luc ont été mises à jeun la nuit avant de recevoir les différents régimes pour 48h. Une mesure de l'activité luciférase a été faite 24h et 48 après le début du régime, les résultats sont présents dans la Figure 46. Il peut être observé que dès 24h, la consommation du régime à 8% de prototype 1 entraîne une activation significative de la transcription ATF4 dépendante comparativement au régime contenant 16 ou 8% de caséine. En revanche, le régime à 16% du prototype 1 n'entraîne pas d'augmentation significative de la transcription ATF4 dépendante. L'ajout de méthionine au régime 8% du prototype 1 pour obtenir une quantité de méthionine équivalente à celle du régime 8% caséine diminue significativement l'induction de l'activité luciférase. Les effets du prototype 1 dépendent donc en partie de son faible contenu en méthionine. Ces résultats sont encourageants. Certains aspects du protocole devront être optimisés (protéine témoin, durée du régime) avant de procéder à plus d'analyses (voir ci-dessus) et à déterminer le rôle de GCN2 dans l'activation d'ATF4.

### *2) Mise au point d'une stratégie d'activation intermittente de la voie GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4 par une protéine végétale déficiente en un acide aminé indispensable*

Il conviendra ensuite de mettre au point la stratégie sur plusieurs semaines. La stratégie envisagée reposera sur un régime d'alternance entre une protéine végétale déficiente en un AAI et une protéine animale présentant une composition équilibrée en acides aminés sur une période suffisamment longue (quelques mois). La mise au point de cette stratégie pourra être spécifique à chaque protéine testée. Le choix des protéines testées se fera en fonction de leur capacité à activer la voie et de la nature de l'acide aminé indispensable pour lequel elle présente un déséquilibre. En premier lieu, la stratégie sera mise au point avec le prototype 1 ou une protéine



présentant une composition équivalente. D'une part, le prototype 1 a montré des résultats encourageants. D'autre part, les données de la littérature sur la restriction continue en méthionine (sous forme d'acides aminés libres) serviront de référence pour établir la preuve de concept de l'efficacité de la restriction intermittente via une protéine déséquilibrée (voir point 3). Pour la suite, nous pouvons anticiper que la stratégie sera également mise au point avec une protéine déficiente en lysine dans la mesure où plusieurs protéines de céréales présentent ce type de déséquilibre. Si l'identification des organes présentant une activation de GCN2 par différentes protéines végétales sera effectuée dans le point 1, il sera important de vérifier que cette activation perdure au cours du protocole nutritionnel. Ces données seront utiles pour définir quelles pathologies ou physiopathologies pourraient être impactées par cette approche nutritionnelle et seraient susceptibles d'être étudiées dans le cadre de ce projet.

Nous utiliserons la souris CARE-Luc afin de pouvoir monitorer l'activité de la voie eIF2 $\alpha$ /ATF4 sans avoir à sacrifier l'animal tout au long de la période de régime. Nous travaillerons sur la souris adulte. L'objectif sera de trouver une périodicité et une quantité des différentes sources de protéines permettant à la fois d'avoir une activation régulière de la voie GCN2 (pas permanente) et de maintenir les paramètres physiologiques équivalents à ceux d'un groupe nourri avec un régime contrôle. La composition corporelle, la densité osseuse et les paramètres sanguins seront étudiés tout au long de l'étude. La fonctionnalité musculaire sera également étudiée dans la mesure où le muscle squelettique est l'un des organes pouvant être impacté en cas de déficit d'apport en acides aminés indispensables. Il sera également envisagé d'étudier des aspects métaboliques tels que la dépense énergétique ou le bilan azoté. Pour cela, nous pourrions bénéficier de l'expertise de Dalila Azzout-Marniche (UMR914) dont la thématique aborde la définition de la couverture du besoin en acides aminés et l'impact de la teneur en protéines/ acides aminés de l'alimentation sur le métabolisme. A la fin du protocole, les animaux seront mis à mort afin de mesurer précisément la composition corporelle et prélever différents organes (foie, tissus adipeux, pancréas) pour réaliser des analyses par western blot et RT-qPCR des protéines (voie GCN2, mTORC1, Akt...) et des ARNm d'intérêt. Une partie des organes sera également prélevée pour réaliser des analyses par microscopie (structure, IF, IHC). Une attention particulière sera portée au muscle squelettique. L'analyse du type et de la taille des fibres sera déterminée afin d'établir si la restriction intermittente n'entraîne pas des altérations du tissu musculaire. Il s'agit d'un protocole pilote qui nécessitera de nombreux ajustements en cours d'expérimentation. Toutefois, en fonction des résultats obtenus, il pourra être envisagé de prolonger l'expérimentation afin d'étudier l'impact d'un tel régime sur des



paramètres associés au vieillissement (stress oxydant, sénescence). Ces aspects seront également abordés dans le point 4.

### 3) Effet préventif de l'activation intermittente de la voie GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4 par une protéine végétale déficiente en méthionine dans un modèle d'induction d'obésité

Le deuxième objectif sera d'établir une preuve de concept que l'activation de la voie GCN2 par ce type d'approche peut avoir un effet bénéfique. Pour ce faire, il sera envisagé de démontrer que la stratégie mise au point peut récapituler les effets établis d'une restriction en acides aminés soufrés continue sur l'induction de l'obésité et du diabète de type 2. Dans la plupart de ces études, la restriction et le régime obésogène sont appliqués simultanément. Pour ce faire, nous utiliserons le prototype 1 ou une protéine équivalente pour tester la stratégie d'activation intermittente dans un modèle d'induction de l'obésité chez la souris. L'activation intermittente de la voie sera effectuée en amont (pendant 8 semaines) et pendant l'induction de l'obésité. Les paramètres de composition corporelle, biochimiques et hormonaux (en particulier le FGF21) seront suivis au cours du protocole. Une attention particulière sera portée aux paramètres pour lesquels la restriction en méthionine a montré des effets positifs. Une première série d'animaux seront mise- à mort avant la séquence d'induction de l'obésité afin de mesurer précisément la composition corporelle et prélever différents organes (foie, tissus adipeux, pancréas) pour réaliser des analyses par western blot et RT-qPCR des protéines (voie GCN2, mTORC1, Akt...) et des ARNm d'intérêts. Une partie des organes sera également prélevée pour réaliser des analyses par microscopie (structure, IF, IHC). Concernant les ARNm, hormis les cibles d'ATF4, seront également étudiés des gènes potentiellement associés à la réponse métabolique à la restriction intermittente, comme par exemple ceux impliqués dans le browning du tissu adipeux blanc. En fonction des résultats, il pourra être envisagé de réaliser des analyses transcriptomiques dans différents tissus. Les mêmes mesures seront réalisées à la fin du protocole d'induction de l'obésité. L'implication potentielle de GCN2 sera déterminée en menant le même protocole chez la souris GCN2 KO.

Nous pourrions également envisager de tester les effets de cette stratégie nutritionnelle dans des modèles de souris présentant une susceptibilité à l'obésité ou au diabète de type 2. Ce genre de modèle permettrait d'utiliser des régimes moins extrêmes que les régimes high fat classiques. De plus, si à terme la stratégie que nous proposons devait être appliquée à l'Homme dans le contexte de l'obésité ou du diabète, elle s'adresserait en premier lieu aux individus



présentant une susceptibilité accrue à ces physiopathologies. Parmi les modèles murins pouvant être envisagés, nous pouvons mentionner la souris NZO (New Zealand Obese). Il s'agit d'un modèle polygénique chez lequel se développe spontanément une obésité et un diabète de type 2. Ce modèle est d'autant plus intéressant qu'il a été démontré qu'une restriction en méthionine améliorerait les paramètres métaboliques de ces souris dans le contexte d'un régime high fat. Un autre modèle intéressant est celui développé dans l'équipe par Céline Jousse qui vise à étudier l'impact de la nutrition maternelle pendant les périodes de gestation/lactation et d'identifier des marqueurs de prédisposition au syndrome métabolique dans la descendance. Ainsi, des souris dont la mère a reçu un régime high fat ou low protein (10%) pendant la période de lactation présente une susceptibilité accrue au syndrome métabolique (données non publiées). Il serait donc particulièrement intéressant de tester la stratégie nutritionnelle sur ce modèle, d'autant que nous pourrions réaliser ces expériences dans des souris GCN2 KO.

#### 4) Identifications des fonctions biologiques affectées par des restrictions intermittentes en différents acides aminés indispensables, évaluation du rôle de GCN2

L'un des objectifs de ce projet est d'identifier des fonctions biologiques qui pourraient être modulées par l'activation répétée et modérée de la voie GCN2. Dans cette partie du projet, outre le fait de définir les cibles de cette stratégie de nutrition préventive, il s'agit de tirer parti d'une approche qui permettrait d'activer GCN2 de manière chronique afin de pouvoir révéler des processus biologiques qui ne pourraient pas être identifiés dans une approche d'activation aiguë de la voie. Cette approche est une alternative aux approches basées sur l'utilisation de composés pharmacologiques telle l'halofuginone ou de régimes composés d'acides aminés libres. Elle présente notamment l'avantage d'être directement applicable à l'Homme. La littérature concernant GCN2, et plus globalement ATF4, permet de faire de nombreuses hypothèses quant aux fonctions potentiellement impactées par l'activation chronique de GCN2, telles que les fonctions cognitives, le rythme circadien, la fonction rénale ou encore la senescence. En fonction des résultats obtenus, il sera particulièrement intéressant de déterminer l'impact de la stratégie nutritionnelle sur ces fonctions ou leur déclin dans le contexte du vieillissement. Il pourrait notamment être envisagé d'utiliser des modèles de souris progéroides.

Cette partie du projet reposera sur la stratégie nutritionnelle telle qu'elle sera définie dans le point 2). Plusieurs protéines entraînant des restrictions en différents acides aminés indispensables pourront être testées. Des analyses transcriptomiques seront réalisées dans une



sélection de tissus présentant une activation de la transcription ATF4 dépendante afin de définir des fonctions potentiellement impactées. D'autres analyses omiques pourront être envisagées. En particulier, une analyse métabolomique au niveau du plasma pourrait apporter des informations quant aux modifications métaboliques consécutives à la stratégie d'activation de GCN2. Le rôle de cette dernière sera évalué par l'utilisation de souris GCN2 KO.

## 5) Application à l'Homme

Un des enjeux de ce projet sera d'effectuer la translation à l'Homme. Avant de pouvoir déterminer si l'activation répétée de la voie peut s'avérer bénéfique chez l'Homme, il conviendra d'établir que la consommation de protéines végétales peut entraîner l'activation de la voie GCN2. Il sera notamment nécessaire de pouvoir caractériser des marqueurs circulant de l'activation de la voie GCN2. Le FGF21 circulant pourrait en faire partie. Néanmoins, sa mesure n'est pas suffisamment spécifique du fait que de nombreux stimulus peuvent entraîner l'augmentation de son niveau plasmatique (155). D'autres marqueurs devront être identifiés. Pour atteindre cet objectif, nous pourrions bénéficier d'outils en cours de développement dans l'équipe Proteostasis dans le cadre de la mise au point d'un système de thérapie génique (Nutrireg) dont le fonctionnement est basé sur l'activation de la voie GCN2.

Ce projet va faire l'objet d'un sujet de thèse et d'une demande de financement auprès de l'ANR. Il est également envisagé de bénéficier d'un soutien de l'INRAE dans la mesure où l'étude des protéines végétales est une priorité de l'institut. Il impliquera plusieurs scientifiques de l'équipe dont Alain Bruhat et Isabelle Papet, il bénéficiera de collaborations pour aborder les aspects de métabolisme musculaire (Stephane Walrand, UNH), de métabolisme énergétique et de couverture des besoins en acides aminés (Dalila Azzout-Marniche, PNCA). Il sera également nécessaire de développer des collaborations en lien avec les aspects susceptibles d'être abordés au cours de ce projet.



## Bibliographie

1. Gong SS, Guerrini L, Basilico C. Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. *Mol Cell Biol*. 1991;11(12):6059-66.
2. Marten NW, Burke EJ, Hayden JM, Straus DS. Effect of amino acid limitation on the expression of 19 genes in rat hepatoma cells. *Faseb J*. 1994;8(8):538-44.
3. Luethy JD, Fagnoli J, Park JS, Fornace AJ Jr, Holbrook NJ. Isolation and characterization of the hamster gadd153 gene. Activation of promoter activity by agents that damage DNA. *J Biol Chem*. 1990;265(27):16521-6.
4. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* [Internet]. avr 2004 [cité 14 mai 2021];11(4):381-9. Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/4401373>
5. Bruhat A, Jousse C, Wang XZ, Ron D, Ferrara M, Fafournoux P. Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. *J Biol Chem* [Internet]. 1997;272(28):17588-93. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.jbc.org/cgi/content/full/272/28/17588>
6. Bruhat A, Jousse C, Carraro V, Reimold AM, Ferrara M, Fafournoux P. Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the CHOP promoter. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2000;20(19):7192-204. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/20/19/7192>
7. Ouwens DM, de Ruiter ND, van der Zon GC, Carter AP, Schouten J, van der Burgt C, et al. Growth factors can activate ATF2 via a two-step mechanism: phosphorylation of Thr71 through the Ras-MEK-ERK pathway and of Thr69 through RalGDS-Src-p38. *Embo J* [Internet]. 15 juill 2002;21(14):3782-93. Disponible sur: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12110590](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12110590)
8. Steinmuller L, Thiel G. Regulation of gene transcription by a constitutively active mutant of activating transcription factor 2 (ATF2). *Biol Chem* [Internet]. avr 2003;384(4):667-72. Disponible sur: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12751796](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12751796)
9. Bruhat A, Cherasse Y, Maurin AC, Breitwieser W, Parry L, Deval C, et al. ATF2 is required for amino acid-regulated transcription by orchestrating specific histone acetylation. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 31 janv 2007;35(N°4):1312-21. Disponible sur: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17267404](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17267404)
10. Chaveroux C, Jousse C, Cherasse Y, Maurin AC, Parry L, Carraro V, et al. Identification of a novel amino acid response pathway triggering ATF2 phosphorylation in mammals. *Mol Cell Biol* [Internet]. déc 2009;29(24):6515-26. Disponible sur: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19822663](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19822663)

11. 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* [Internet]. 2002;277(27):24120-7. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.jbc.org/cgi/content/full/277/27/24120>
12. Deval C, Chaveroux C, Maurin AC, Cherasse Y, Parry L, Carraro V, et al. Amino acid limitation regulates the expression of genes involved in several specific biological processes through GCN2-dependent and GCN2-independent pathways. *Febs J* [Internet]. févr 2009;276(3):707-18. Disponible sur: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19120448](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19120448)
13. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, et al. An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress. *Mol Cell* [Internet]. 1 mars 2003 [cité 4 mars 2019];11(3):619-33. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276503001059>
14. Pakos-Zebrucka K, Koryga I, Mnich K, Lujic M, Samali A, Gorman AM. The integrated stress response. *EMBO Rep* [Internet]. oct 2016 [cité 20 mai 2021];17(10):1374-95. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5048378/>
15. Hope IA, Struhl K. GCN4 protein, synthesized in vitro, binds HIS3 regulatory sequences: implications for general control of amino acid biosynthetic genes in yeast. *Cell*. 1985;43(1):177-88.
16. Hinnebusch AG. Evidence for translational regulation of the activator of general amino acid control in yeast. *Proc Natl Acad Sci U A* [Internet]. oct 1984;81(20):6442-6. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6387704>
17. Williams NP, Hinnebusch AG, Donahue TF. Mutations in the structural genes for eukaryotic initiation factors 2 alpha and 2 beta of *Saccharomyces cerevisiae* disrupt translational control of GCN4 mRNA. *Proc Natl Acad Sci U A*. 1989;86(19):7515-9.
18. Harding HP, Novoa II, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell*. 2000;6(5):1099-108.
19. Wek RC, Jackson BM, Hinnebusch AG. Juxtaposition of domains homologous to protein kinases and histidyl- tRNA synthetases in GCN2 protein suggests a mechanism for coupling GCN4 expression to amino acid availability. *Proc Natl Acad Sci U A*. 1989;86(12):4579-83.
20. Qiu H, Dong J, Hu C, Francklyn CS, Hinnebusch AG. 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*. 15 mars 2001;20(6):1425-38.
21. Miller PF, Hinnebusch AG. cis-acting sequences involved in the translational control of GCN4 expression. *Biochim Biophys Acta*. 1990;1050(1-3):151-4.
22. Lu PD, Harding HP, Ron D. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol* [Internet]. 11 oct 2004 [cité 16 juill 2020];167(1):27-33. Disponible sur: <https://rupress.org/jcb/article/167/1/27/51290/Translation-reinitiation-at-alternative-open>

23. Wallis MH, Kramer G, Hardesty B. Partial purification and characterization of a 90,000-dalton peptide involved in activation of the eIF-2 alpha protein kinase of the hemin-controlled translational repressor. *Biochemistry*. 19 févr 1980;19(4):798-804.
24. Levin DH, Petryshyn R, London IM. Characterization of double-stranded-RNA-activated kinase that phosphorylates alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 (eIF-2 alpha) in reticulocyte lysates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. févr 1980;77(2):832-6.
25. Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum- resident kinase [published erratum appears in *Nature* 1999 Mar 4;398(6722):90] [see comments]. *Nature*. 1999;397(6716):271-4.
26. Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol* [Internet]. 28 mai 2001;153(5):1011-22. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11381086>
27. Donnelly N, Gorman AM, Gupta S, Samali A. The eIF2alpha kinases: their structures and functions. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. oct 2013;70(19):3493-511. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23354059>
28. Lu Y-N, Kavianpour S, Zhang T, Zhang X, Nguyen D, Thombre R, et al. MARK2 phosphorylates eIF2 $\alpha$  in response to proteotoxic stress. *PLoS Biol*. mars 2021;19(3):e3001096.
29. Suzuki A, Hirata M, Kamimura K, Maniwa R, Yamanaka T, Mizuno K, et al. aPKC acts upstream of PAR-1b in both the establishment and maintenance of mammalian epithelial polarity. *Curr Biol CB*. 24 août 2004;14(16):1425-35.
30. Guo X, Aviles G, Liu Y, Tian R, Unger BA, Lin Y-HT, et al. Mitochondrial stress is relayed to the cytosol by an OMA1–DELE1–HRI pathway. *Nature* [Internet]. mars 2020 [cité 14 avr 2020];579(7799):427-32. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2078-2>
31. Fessler E, Eckl E-M, Schmitt S, Mancilla IA, Meyer-Bender MF, Hanf M, et al. A pathway coordinated by DELE1 relays mitochondrial stress to the cytosol. *Nature*. mars 2020;579(7799):433-7.
32. Straus DS, Burke EJ, Marten NW. Induction of insulin-like growth factor binding protein-1 gene expression in liver of protein-restricted rats and in rat hepatoma cells limited for a single amino acid. *Endocrinology*. 1993;132(3):1090-100.
33. Lewitt MS, Denyer GS, Cooney GJ, Baxter RC. Insulin-like growth factor-binding protein-1 modulates blood glucose levels. *Endocrinology*. 1991;129(4):2254-6.
34. Marchand A, Tomkiewicz C, Magne L, Barouki R, Garlatti M. Endoplasmic reticulum stress induction of insulin-like growth factor-binding protein-1 involves ATF4. *J Biol Chem*. 14 juill 2006;281(28):19124-33.
35. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* [Internet]. 9 mars 2017 [cité 20 mai 2021];168(6):960-76. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5394987/>
36. Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M. RAFTI: A Mammalian Protein That Binds to FKBP12 in a Rapamycin-Dependent Fashion and Is Homologous to Yeast TORs. :9.

37. Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, et al. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*. 30 juin 1994;369(6483):756-8.
38. Kim D-H, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*. 26 juill 2002;110(2):163-75.
39. Dos D. Sarbassov, Ali SM, Kim D-H, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. Rictor, a Novel Binding Partner of mTOR, Defines a Rapamycin-Insensitive and Raptor-Independent Pathway that Regulates the Cytoskeleton. *Curr Biol [Internet]*. 27 juill 2004 [cité 20 mai 2021];14(14):1296-302. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982204004713>
40. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Rüegg MA, Hall A, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*. nov 2004;6(11):1122-8.
41. Liu GY, Sabatini DM. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]*. 14 janv 2020 [cité 28 janv 2020];1-21. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/s41580-019-0199-y>
42. Proud C. mTORC1 signalling and mRNA translation. *Biochem Soc Trans*. 2009;37:227.
43. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1 - PubMed [Internet]. [cité 20 mai 2021]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/9465032/>
44. Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB, Thomas G. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *Embo J [Internet]*. 1997;16(12):3693-704. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.emboj.org/cgi/content/full/16/12/3693>
45. Tang H, Hornstein E, Stolovich M, Levy G, Livingstone M, Templeton D, et al. Amino acid-induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on phosphatidylinositol 3-kinase-mediated signaling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation. *Mol Cell Biol [Internet]*. 2001;21(24):8671-83. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/21/24/8671>
46. Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, et al. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*. 9 sept 2004;431(7005):200-5.
47. Raught B, Peiretti F, Gingras A-C, Livingstone M, Shahbazian D, Mayeur GL, et al. Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *EMBO J*. 21 avr 2004;23(8):1761-9.
48. Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E - PubMed [Internet]. [cité 20 mai 2021]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/8521827/>
49. Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N. mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene*. 16 oct 2006;25(48):6416-22.

50. Hashemolhosseini S, Nagamine Y, Morley SJ, Desrivières S, Mercep L, Ferrari S. Rapamycin Inhibition of the G1 to S Transition Is Mediated by Effects on Cyclin D1 mRNA and Protein Stability\*. *J Biol Chem* [Internet]. 5 juin 1998 [cité 20 mai 2021];273(23):14424-9. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925819774870>
51. Rosenwald IB, Lazaris-Karatzas A, Sonenberg N, Schmidt EV. Elevated levels of cyclin D1 protein in response to increased expression of eukaryotic initiation factor 4E. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1 déc 1993 [cité 20 mai 2021];13(12):7358-63. Disponible sur: <https://mcb-asm-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/content/13/12/7358>
52. Tcherkezian J, Cargnello M, Romeo Y, Huttlin EL, Lavoie G, Gygi SP, et al. Proteomic analysis of cap-dependent translation identifies LARP1 as a key regulator of 5'TOP mRNA translation. *Genes Dev* [Internet]. 15 févr 2014 [cité 20 mai 2021];28(4):357-71. Disponible sur: <http://genesdev.cshlp.org/content/28/4/357>
53. Jia J-J, Lahr RM, Solgaard MT, Moraes BJ, Pointet R, Yang A-D, et al. mTORC1 promotes TOP mRNA translation through site-specific phosphorylation of LARP1. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 4 janv 2021 [cité 20 mai 2021];49(6):3461-89. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8034618/>
54. Thoreen CC, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS, Sabatini DM. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* [Internet]. 3 mai 2012 [cité 13 mai 2014];485(7396):109-13. Disponible sur: <http://www.nature.com.gate2.inist.fr/nature/journal/v485/n7396/full/nature11083.html>
55. Shahbazian D, Parsyan A, Petroulakis E, Topisirovic I, Martineau Y, Gibbs BF, et al. Control of cell survival and proliferation by mammalian eukaryotic initiation factor 4B. *Mol Cell Biol*. mars 2010;30(6):1478-85.
56. Gandin V, Masvidal L, Hulea L, Gravel S-P, Cargnello M, McLaughlan S, et al. nanoCAGE reveals 5' UTR features that define specific modes of translation of functionally related MTOR-sensitive mRNAs. *Genome Res*. mai 2016;26(5):636-48.
57. Dardevet D, Rieu I, Fafournoux P, Sornet C, Combaret L, Bruhat A, et al. Leucine: a key amino acid in ageing-associated sarcopenia? *Nutr Res Rev*. juin 2003;16(1):61-70.
58. Dardevet D, Sornet C, Balage M, Grizard J. Stimulation of in vitro rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age. *J Nutr*. nov 2000;130(11):2630-5.
59. Drummond MJ, Dreyer HC, Pennings B, Fry CS, Dhanani S, Dillon EL, et al. Skeletal muscle protein anabolic response to resistance exercise and essential amino acids is delayed with aging. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. mai 2008;104(5):1452-61.
60. Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*. janv 2004;84(1):209-38.
61. Sabourin LA, Rudnicki MA. The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet*. janv 2000;57(1):16-25.
62. Guillet C, Prod'homme M, Balage M, Gachon P, Giraudet C, Morin L, et al. Impaired anabolic response of muscle protein synthesis is associated with S6K1 dysregulation in elderly humans. *FASEB J* [Internet]. 2004 [cité 20 mai 2021];18(13):1586-7. Disponible sur: <http://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.03-1341fje>

63. Rieu I, Magne H, Savary-Auzeloux I, Averous J, Bos C, Peyron M-A, et al. Reduction of low grade inflammation restores blunting of postprandial muscle anabolism and limits sarcopenia in old rats. *J Physiol*. 2009;587(22):5483-92.
64. Balage M, Averous J, Remond D, Bos C, Pujos-Guillot E, Papet I, et al. Presence of low-grade inflammation impaired postprandial stimulation of muscle protein synthesis in old rats. *J Nutr Biochem*. 2010;21(4):325-31.
65. Vazeille E, Codran A, Claustre A, Averous J, Listrat A, Béchet D, et al. The ubiquitin-proteasome and the mitochondria-associated apoptotic pathways are sequentially downregulated during recovery after immobilization-induced muscle atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2008;295(5):E1181-90. Disponible sur: <http://gateway.isiknowledge.com/gateway/Gateway.cgi?&GWVersion=2&SrcAuth=INRA&SrcApp=INRA&DestLinkType=FullRecord&DestApp=WOS&KeyUT=000260770300023>
66. Jin H-O, Seo S-K, Woo S-H, Choe T-B, Hong S-I, Kim J-I, et al. Nuclear protein 1 induced by ATF4 in response to various stressors acts as a positive regulator on the transcriptional activation of ATF4. *IUBMB Life*. déc 2009;61(12):1153-8.
67. Goruppi S, Iovanna JL. Stress-inducible protein p8 is involved in several physiological and pathological processes. *J Biol Chem*. 15 janv 2010;285(3):1577-81.
68. Teresa Borrello M, Rita Emma M, Listi A, Rubis M, Coslet S, Augello G, et al. NUPR1 protects liver from lipotoxic injury by improving the endoplasmic reticulum stress response. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. mars 2021;35(3):e21395.
69. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*. 4 janv 1996;379(6560):88-91.
70. Bristow RG, Hill RP. Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer*. mars 2008;8(3):180-92.
71. Schmidt EK, Clavarino G, Ceppi M, Pierre P. SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat Methods* [Internet]. avr 2009 [cité 14 févr 2018];6(4):275-7. Disponible sur: <https://www-nature-com.gate2.inist.fr/articles/nmeth.1314>
72. Lassot I, Ségéral E, Berlioz-Torrent C, Durand H, Groussin L, Hai T, et al. ATF4 Degradation Relies on a Phosphorylation-Dependent Interaction with the SCF $\beta$ TrCP Ubiquitin Ligase. *Mol Cell Biol* [Internet]. 15 mars 2001 [cité 20 oct 2015];21(6):2192-202. Disponible sur: <http://mcb.asm.org/content/21/6/2192>
73. Longchamp A, Mirabella T, Arduini A, MacArthur MR, Das A, Treviño-Villarreal JH, et al. Amino Acid Restriction Triggers Angiogenesis via GCN2/ATF4 Regulation of VEGF and H2S Production. *Cell*. 22 2018;173(1):117-129.e14.
74. Ye J, Kumanova M, Hart LS, Sloane K, Zhang H, De Panis DN, et al. The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *EMBO J* [Internet]. 16 juin 2010 [cité 2 avr 2015];29(12):2082-96. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2892366/>
75. Tian X, Ye J, Alonso-Basanta M, Hahn SM, Koumenis C, Dorsey JF. Modulation of CCAAT/enhancer binding protein homologous protein (CHOP)-dependent DR5 expression by

- nelfinavir sensitizes glioblastoma multiforme cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Biol Chem*. 19 août 2011;286(33):29408-16.
76. Qing G, Li B, Vu A, Skuli N, Walton ZE, Liu X, et al. ATF4 Regulates MYC-mediated Neuroblastoma Cell Death upon Glutamine Deprivation. *Cancer Cell* [Internet]. 13 nov 2012 [cité 20 mai 2021];22(5):631-44. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3510660/>
  77. Han J, Back SH, Hur J, Lin Y-H, Gildersleeve R, Shan J, et al. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol*. mai 2013;15:481-90.
  78. Leprivier G, Remke M, Rotblat B, Dubuc A, Mateo A-RF, Kool M, et al. The eEF2 Kinase Confers Resistance to Nutrient Deprivation by Blocking Translation Elongation. *Cell*. 23 mai 2013;153:1064-79.
  79. Commisso C, Davidson SM, Soydaner-Azeloglu RG, Parker SJ, Kamphorst JJ, Hackett S, et al. Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature* [Internet]. 30 mai 2013 [cité 23 janv 2014];497(7451):633-7. Disponible sur: <http://www.nature.com/nature/journal/v497/n7451/full/nature12138.html>
  80. Kamphorst JJ, Nofal M, Commisso C, Hackett SR, Lu W, Grabocka E, et al. Human Pancreatic Cancer Tumors Are Nutrient Poor and Tumor Cells Actively Scavenge Extracellular Protein. *Cancer Res* [Internet]. 2 janv 2015 [cité 25 févr 2015];75(3):544-53. Disponible sur: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/75/3/544>
  81. Maddocks ODK, Berkers CR, Mason SM, Zheng L, Blyth K, Gottlieb E, et al. Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. *Nature* [Internet]. 24 janv 2013 [cité 16 sept 2015];493(7433):542-6. Disponible sur: <http://www.nature.com.gate2.inist.fr/nature/journal/v493/n7433/full/nature11743.html>
  82. Son J, Lyssiotis CA, Ying H, Wang X, Hua S, Ligorio M, et al. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature*. 4 avr 2013;496(7443):101-5.
  83. Zhang J, Fan J, Venneti S, Cross JR, Takagi T, Bhinder B, et al. Asparagine Plays a Critical Role in Regulating Cellular Adaptation to Glutamine Depletion. *Mol Cell* [Internet]. 23 oct 2014 [cité 24 oct 2014];56(2):205-18. Disponible sur: <http://www.cell.com/article/S109727651400673X/abstract>
  84. Yang M, Vousden KH. Serine and one-carbon metabolism in cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. oct 2016 [cité 20 mai 2021];16(10):650-62. Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/nrc.2016.81>
  85. Sofer A, Lei K, Johannessen CM, Ellisen LW. Regulation of mTOR and Cell Growth in Response to Energy Stress by REDD1. *Mol Cell Biol* [Internet]. juill 2005 [cité 20 mai 2021];25(14):5834-45. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1168803/>
  86. Matsushima R, Harada N, Webster NJ, Tsutsumi YM, Nakaya Y. Effect of TRB3 on insulin and nutrient-stimulated hepatic p70 S6 kinase activity. *J Biol Chem* [Internet]. 6 oct 2006;281(40):29719-29. Disponible sur: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16887816](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16887816)

87. Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, et al. The Rag GTPases Bind Raptor and Mediate Amino Acid Signaling to mTORC1. *Science* [Internet]. 13 juin 2008 [cité 11 oct 2013];320(5882):1496-501. Disponible sur: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1157535>
88. Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM. Ragulator-Rag Complex Targets mTORC1 to the Lysosomal Surface and Is Necessary for Its Activation by Amino Acids. *Cell* [Internet]. avr 2010 [cité 11 oct 2013];141(2):290-303. Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867410001777>
89. Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol CB*. 5 août 2003;13(15):1259-68.
90. Inoki K, Li Y, Xu T, Guan K-L. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev* [Internet]. 1 août 2003 [cité 20 mai 2021];17(15):1829-34. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC196227/>
91. Demetriades C, Doumpas N, Teleman AA. Regulation of TORC1 in Response to Amino Acid Starvation via Lysosomal Recruitment of TSC2. *Cell* [Internet]. 13 févr 2014 [cité 3 mars 2014];156(4):786-99. Disponible sur: [http://www.cell.com/abstract/S0092-8674\(14\)00076-2](http://www.cell.com/abstract/S0092-8674(14)00076-2)
92. Fitzian K, Brückner A, Brohée L, Zech R, Antoni C, Kiontke S, et al. TSC1 binding to lysosomal PIPs is required for TSC complex translocation and mTORC1 regulation. *Mol Cell* [Internet]. 10 mai 2021 [cité 20 mai 2021]; Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276521003245>
93. Prentzell MT, Rehbein U, Cadena Sandoval M, De Meulemeester A-S, Baumeister R, Brohée L, et al. G3BPs tether the TSC complex to lysosomes and suppress mTORC1 signaling. *Cell* [Internet]. 4 févr 2021 [cité 20 mai 2021];184(3):655-674.e27. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7868890/>
94. Marion V, Sankaranarayanan S, de Theije C, van Dijk P, Lindsey P, Lamers MC, et al. Arginine Deficiency Causes Runting in the Suckling Period by Selectively Activating the Stress Kinase GCN2. *J Biol Chem*. 18 mars 2011;286(11):8866-74.
95. Budanov AV, Karin M. The p53-regulated Sestrin gene products inhibit mTOR signaling. *Cell* [Internet]. 8 août 2008 [cité 20 mai 2021];134(3):451-60. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2758522/>
96. Wolfson RL, Chantranupong L, Saxton RA, Shen K, Scaria SM, Cantor JR, et al. Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway. *Science* [Internet]. 8 oct 2015 [cité 13 oct 2015];aab2674. Disponible sur: <http://www.sciencemag.org.gate2.inist.fr/content/early/2015/10/07/science.aab2674>
97. Ye J, Palm W, Peng M, King B, Lindsten T, Li MO, et al. GCN2 sustains mTORC1 suppression upon amino acid deprivation by inducing Sestrin2. *Genes Dev* [Internet]. 5 nov 2015 [cité 9 nov 2015]; Disponible sur: <http://genesdev.cshlp.org.gate2.inist.fr/content/early/2015/11/05/gad.269324.115>
98. Han JM, Jeong SJ, Park MC, Kim G, Kwon NH, Kim HK, et al. Leucyl-tRNA Synthetase Is an Intracellular Leucine Sensor for the mTORC1-Signaling Pathway. *Cell*. avr 2012;149:410-24.

99. Lee M, Kim JH, Yoon I, Lee C, Fallahi Sichani M, Kang JS, et al. Coordination of the leucine-sensing Rag GTPase cycle by leucyl-tRNA synthetase in the mTORC1 signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 5 juin 2018 [cité 20 mai 2021];115(23):E5279-88. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6003318/>
100. Chantranupong L, Scaria SM, Saxton RA, Gygi MP, Shen K, Wyant GA, et al. The CASTOR proteins are arginine sensors for the mTORC1 pathway. *Cell* [Internet]. 24 mars 2016 [cité 20 mai 2021];165(1):153-64. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4808398/>
101. Wang S, Tsun Z-Y, Wolfson RL, Shen K, Wyant GA, Plovanich ME, et al. Lysosomal amino acid transporter SLC38A9 signals arginine sufficiency to mTORC1. *Science* [Internet]. 1 sept 2015 [cité 9 janv 2015];347(6218):188-94. Disponible sur: <http://www.sciencemag.org.gate2.inist.fr/content/347/6218/188>
102. Wyant GA, Abu-Remaileh M, Wolfson RL, Chen WW, Freinkman E, Danai LV, et al. mTORC1 Activator SLC38A9 Is Required to Efflux Essential Amino Acids from Lysosomes and Use Protein as a Nutrient. *Cell* [Internet]. 19 oct 2017 [cité 23 oct 2017];171(3):642-654.e12. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867417311406>
103. Gu X, Orozco JM, Saxton RA, Condon KJ, Liu GY, Krawczyk PA, et al. SAMTOR is an S-adenosylmethionine sensor for the mTORC1 pathway. *Science* [Internet]. 10 nov 2017 [cité 24 oct 2018];358(6364):813-8. Disponible sur: <http://science.sciencemag.org.gate2.inist.fr/content/358/6364/813>
104. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* [Internet]. 23 août 1991 [cité 20 mai 2021];253(5022):905-9. Disponible sur: <https://science-sciencemag-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/content/253/5022/905>
105. Durán RV, Oppliger W, Robitaille AM, Heiserich L, Skendaj R, Gottlieb E, et al. Glutaminolysis Activates Rag-mTORC1 Signaling. *Mol Cell* [Internet]. 10 août 2012 [cité 31 oct 2013];47(3):349-58. Disponible sur: [http://www.cell.com/molecular-cell/abstract/S1097-2765\(12\)00488-1](http://www.cell.com/molecular-cell/abstract/S1097-2765(12)00488-1)
106. Zoncu R, Bar-Peled L, Efeyan A, Wang S, Sancak Y, Sabatini DM. mTORC1 Senses Lysosomal Amino Acids Through an Inside-Out Mechanism That Requires the Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Science* [Internet]. 11 avr 2011 [cité 4 nov 2013];334(6056):678-83. Disponible sur: <http://www.sciencemag.org/content/334/6056/678>
107. Tsun Z-Y, Bar-Peled L, Chantranupong L, Zoncu R, Wang T, Kim C, et al. The Folliculin Tumor Suppressor Is a GAP for the RagC/D GTPases That Signal Amino Acid Levels to mTORC1. *Mol Cell* [Internet]. 21 nov 2013 [cité 4 févr 2014];52(4):495-505. Disponible sur: [http://www.cell.com/molecular-cell/abstract/S1097-2765\(13\)00686-2](http://www.cell.com/molecular-cell/abstract/S1097-2765(13)00686-2)
108. Bar-Peled L, Chantranupong L, Cherniack AD, Chen WW, Ottina KA, Grabiner BC, et al. A Tumor Suppressor Complex with GAP Activity for the Rag GTPases That Signal Amino Acid Sufficiency to mTORC1. *Science* [Internet]. 31 mai 2013 [cité 4 févr 2014];340(6136):1100-6. Disponible sur: <http://www.sciencemag.org/content/340/6136/1100>
109. Jewell JL, Kim YC, Russell RC, Yu F-X, Park HW, Plouffe SW, et al. Differential regulation of mTORC1 by leucine and glutamine. *Science* [Internet]. 1 sept 2015 [cité 9 janv

- 2015];347(6218):194-8. Disponible sur:  
<http://www.sciencemag.org.gate2.inist.fr/content/347/6218/194>
110. Xiao F, Huang Z, Li H, Yu J, Wang C, Chen S, et al. Leucine Deprivation Increases Hepatic Insulin Sensitivity via GCN2/mTOR/S6K1 and AMPK Pathways. *Diabetes* [Internet]. 3 janv 2011 [cité 20 juin 2014];60(3):746-56. Disponible sur:  
<http://diabetes.diabetesjournals.org/content/60/3/746>
  111. Nikonorova IA, Mirek ET, Signore CC, Goudie MP, Wek RC, Anthony TG. Time-resolved analysis of amino acid stress identifies eIF2 phosphorylation as necessary to inhibit mTORC1 activity in liver. *J Biol Chem* [Internet]. 6 avr 2018 [cité 20 mai 2021];293(14):5005-15. Disponible sur:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5892569/>
  112. Chalvon-Demersay T, Moro J, Even PC, Chaumontet C, Tomé D, Averous J, et al. Liver GCN2 controls hepatic FGF21 secretion and modulates whole body postprandial oxidation profile under a low-protein diet. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* [Internet]. 1 oct 2019 [cité 29 nov 2020];317(6):E1015-21. Disponible sur:  
<https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpendo.00022.2019>
  113. Bouquier N, Moutin E, Tintignac LA, Reverbel A, Jublanc E, Sinnreich M, et al. AIMTOR, a BRET biosensor for live imaging, reveals subcellular mTOR signaling and dysfunctions. *BMC Biol* [Internet]. 3 juill 2020 [cité 20 mai 2021];18. Disponible sur:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7334845/>
  114. Liu R, Iadevaia V, Averous J, Taylor PM, Zhang Z, Proud CG. Impairing the production of ribosomal RNA activates mammalian target of rapamycin complex 1 signalling and downstream translation factors. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(8):5083-96.
  115. Fedele AO, Carraro V, Xie J, Averous J, Proud CG. Cyclosporin A but not FK506 activates the integrated stress response in human cells. *J Biol Chem*. 30 oct 2020;295(44):15134-43.
  116. Maurin A-C, Jousse C, Averous J, Parry L, Bruhat A, Cherasse Y, et al. The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores. *Cell Metab*. 2005;1(4):273-7.
  117. Peng W, Robertson L, Gallinetti J, Mejia P, Vose S, Charlip A, et al. Surgical stress resistance induced by single amino acid deprivation requires Gcn2 in mice. *Sci Transl Med*. 25 janv 2012;4(118):118ra11.
  118. Ravindran R, Loebbermann J, Nakaya HI, Khan N, Ma H, Gama L, et al. The amino acid sensor GCN2 controls gut inflammation by inhibiting inflammasome activation. *Nature*. 24 mars 2016;531(7595):523-7.
  119. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2005;45(4):287-306.
  120. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*. déc 2009;2(5):270-8.
  121. Ehren JL, Maher P. Concurrent regulation of the transcription factors Nrf2 and ATF4 mediates the enhancement of glutathione levels by the flavonoid fisetin. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 15 juin 2013 [cité 5 déc 2018];85(12):1816-26. Disponible sur:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295213002529>

122. Larson ET, Kim JE, Castaneda LJ, Napuli AJ, Zhang Z, Fan E, et al. The double-length tyrosyl-tRNA synthetase from the eukaryote *Leishmania major* forms an intrinsically asymmetric pseudo-dimer. *J Mol Biol* [Internet]. 3 juin 2011 [cité 12 déc 2017];409(2):159-76. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3095712/>
123. Khan N, Afaq F, Khusro FH, Mustafa Adhami V, Suh Y, Mukhtar H. Dual inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mammalian target of rapamycin signaling in human nonsmall cell lung cancer cells by a dietary flavonoid fisetin. *Int J Cancer*. 1 avr 2012;130(7):1695-705.
124. Suh Y, Afaq F, Khan N, Johnson JJ, Khusro FH, Mukhtar H. Fisetin induces autophagic cell death through suppression of mTOR signaling pathway in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* [Internet]. août 2010 [cité 24 nov 2017];31(8):1424-33. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2915634/>
125. Yen J-H, Wu P-S, Chen S-F, Wu M-J. Fisetin Protects PC12 Cells from Tunicamycin-Mediated Cell Death via Reactive Oxygen Species Scavenging and Modulation of Nrf2-Driven Gene Expression, SIRT1 and MAPK Signaling in PC12 Cells. *Int J Mol Sci*. 17 avr 2017;18(4).
126. Currais A, Prior M, Dargusch R, Armando A, Ehren J, Schubert D, et al. Modulation of p25 and inflammatory pathways by fisetin maintains cognitive function in Alzheimer's disease transgenic mice. *Aging Cell* [Internet]. avr 2014 [cité 20 mai 2021];13(2):379-90. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3954948/>
127. Ma T, Trinh MA, Wexler AJ, Bourbon C, Gatti E, Pierre P, et al. Suppression of eIF2 $\alpha$  kinases alleviates Alzheimer's disease-related plasticity and memory deficits. *Nat Neurosci*. sept 2013;16(9):1299-305.
128. Devi L, Ohno M. Deletion of the eIF2 $\alpha$  Kinase GCN2 Fails to Rescue the Memory Decline Associated with Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* [Internet]. 11 oct 2013 [cité 20 mai 2021];8(10). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3795630/>
129. Costa-Mattioli M, Gobert D, Harding H, Herdy B, Azzi M, Bruno M, et al. Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2 $\alpha$  kinase GCN2. *Nature* [Internet]. 25 août 2005;436(7054):1166-73. Disponible sur: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature03897>
130. Zhu Y, Doornebal EJ, Pirtskhalava T, Giorgadze N, Wentworth M, Fuhrmann-Stroissnigg H, et al. New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-XL inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging* [Internet]. 8 mars 2017 [cité 28 févr 2020];9(3):955-63. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5391241/>
131. Yousefzadeh MJ, Zhu Y, McGowan SJ, Angelini L, Fuhrmann-Stroissnigg H, Xu M, et al. Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan. *EBioMedicine* [Internet]. 1 oct 2018 [cité 19 oct 2018];36:18-28. Disponible sur: [https://www.ebiomedicine.com/article/S2352-3964\(18\)30373-6/fulltext](https://www.ebiomedicine.com/article/S2352-3964(18)30373-6/fulltext)
132. Skupińska M, Stępiak P, Łętowska I, Rychlewski L, Barciszewska M, Barciszewski J, et al. Natural Compounds as Inhibitors of Tyrosyl-tRNA Synthetase. *Microb Drug Resist Larchmt N*. avr 2017;23(3):308-20.

133. Sajish M, Schimmel P. Human Tyr-tRNA synthetase is a potent PARP-1 activating effector target for resveratrol. *Nature* [Internet]. 19 mars 2015 [cité 14 avr 2020];519(7543):370-3. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4368482/>
134. Wu CC-C, Peterson A, Zinshteyn B, Regot S, Green R. Ribosome Collisions Trigger General Stress Responses to Regulate Cell Fate. *Cell* [Internet]. 30 juin 2020 [cité 21 juill 2020]; Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420306930>
135. Chaveroux C, Carraro V, Canaple L, Averous J, Maurin A-C, Jousse C, et al. In vivo imaging of the spatiotemporal activity of the eIF2 $\alpha$ -ATF4 signaling pathway: Insights into stress and related disorders. *Sci Signal* [Internet]. 28 avr 2015 [cité 20 avr 2021];8(374):rs5-rs5. Disponible sur: <https://stke-sciencemag-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/content/8/374/rs5>
136. Eyries M, Montani D, Girerd B, Perret C, Leroy A, Lonjou C, et al. EIF2AK4 mutations cause pulmonary veno-occlusive disease, a recessive form of pulmonary hypertension. *Nat Genet* [Internet]. janv 2014;46(1):65-9. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24292273>
137. Okawa T, Nagai M, Hase K. Dietary Intervention Impacts Immune Cell Functions and Dynamics by Inducing Metabolic Rewiring. *Front Immunol*. 2020;11:623989.
138. Carroll B, Korolchuk VI, Sarkar S. Amino acids and autophagy: cross-talk and co-operation to control cellular homeostasis. *Amino Acids* [Internet]. 26 juin 2014; Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24965527>
139. Brandhorst S, Longo VD. Protein Quantity and Source, Fasting-Mimicking Diets, and Longevity. *Adv Nutr Bethesda Md*. 1 nov 2019;10(Suppl\_4):S340-50.
140. Wolfe RR, Rutherfurd SM, Kim I-Y, Moughan PJ. Protein quality as determined by the Digestible Indispensable Amino Acid Score: evaluation of factors underlying the calculation. *Nutr Rev*. sept 2016;74(9):584-99.
141. Song S, Hooiveld GJ, Li M, Zhao F, Zhang W, Xu X, et al. Dietary soy and meat proteins induce distinct physiological and gene expression changes in rats. *Sci Rep* [Internet]. 9 févr 2016 [cité 10 sept 2019];6. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4746574/>
142. Hashidume T, Kato A, Tanaka T, Miyoshi S, Itoh N, Nakata R, et al. Single ingestion of soy  $\beta$ -conglycinin induces increased postprandial circulating FGF21 levels exerting beneficial health effects. *Sci Rep* [Internet]. juin 2016 [cité 28 août 2019];6(1):28183. Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/srep28183>
143. Gorissen SHM, Crombag JJR, Senden JMG, Waterval WAH, Bierau J, Verdijk LB, et al. Protein content and amino acid composition of commercially available plant-based protein isolates. *Amino Acids* [Internet]. 2018 [cité 13 sept 2019];50(12):1685-95. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6245118/>
144. Fontana L, Partridge L. Promoting health and longevity through diet: from model organisms to humans. *Cell*. 26 mars 2015;161(1):106-18.
145. Bruhat A, Papet I, Fafournoux P. Complex Mechanisms Link Dietary Sulfur Amino Acid Restriction to Health Improvement. *J Nutr*. 8 avr 2021;151(4):749-50.

146. Castaño-Martinez T, Schumacher F, Schumacher S, Kochlik B, Weber D, Grune T, et al. Methionine restriction prevents onset of type 2 diabetes in NZO mice. *FASEB J* [Internet]. 2019 [cité 13 avr 2021];33(6):7092-102. Disponible sur: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.201900150R>
147. Forney LA, Stone KP, Wanders D, Gettys TW. Sensing and signaling mechanisms linking dietary methionine restriction to the behavioral and physiological components of the response. *Front Neuroendocrinol.* oct 2018;51:36-45.
148. Inagaki T, Dutchak P, Zhao G, Ding X, Gautron L, Parameswara V, et al. Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab.* juin 2007;5(6):415-25.
149. Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, Koukos G, Flier JS, Maratos-Flier E. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab.* juin 2007;5(6):426-37.
150. Laeger T, Albarado DC, Burke SJ, Trosclair L, Hedgepeth JW, Berthoud H-R, et al. Metabolic responses to dietary protein restriction require an increase in FGF21 that is delayed by the absence of GCN2. *Cell Rep* [Internet]. 19 juill 2016 [cité 11 oct 2019];16(3):707-16. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4956501/>
151. Pettit AP, Jonsson WO, Bargoud AR, Mirek ET, Peelor FF, Wang Y, et al. Dietary Methionine Restriction Regulates Liver Protein Synthesis and Gene Expression Independently of Eukaryotic Initiation Factor 2 Phosphorylation in Mice<sup>123</sup>. *J Nutr* [Internet]. juin 2017 [cité 14 oct 2019];147(6):1031-40. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5443467/>
152. Cummings NE, Williams EM, Kasza I, Konon EN, Schaid MD, Schmidt BA, et al. Restoration of metabolic health by decreased consumption of branched-chain amino acids. *J Physiol* [Internet]. 15 févr 2018 [cité 20 mai 2021];596(4):623-45. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5813603/>
153. Richardson NE, Konon EN, Schuster HS, Mitchell AT, Boyle C, Rodgers AC, et al. Lifelong restriction of dietary branched-chain amino acids has sex-specific benefits for frailty and life span in mice. *Nat Aging* [Internet]. janv 2021 [cité 21 avr 2021];1(1):73-86. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/s43587-020-00006-2>
154. Yu D, Richardson NE, Green CL, Spicer AB, Murphy ME, Flores V, et al. The adverse metabolic effects of branched-chain amino acids are mediated by isoleucine and valine. *Cell Metab.* 4 mai 2021;33(5):905-922.e6.
155. Sjøberg S, Andersen ES, Dalsgaard NB, Jarlhelt I, Hansen NL, Hoffmann N, et al. FGF21, a liver hormone that inhibits alcohol intake in mice, increases in human circulation after acute alcohol ingestion and sustained binge drinking at Oktoberfest. *Mol Metab.* mai 2018;11:96-103.

## Curriculum Vitae

---

### ***Chargé de recherche classe normale INRAE 44 ans***

Unité de Nutrition Humaine, UMR1019 INRA Université d'Auvergne Clermont Ferrand (France).

Centre de recherche INRA 63122 Theix

Tel 0473624204 fax 0473624755

julien.averous@inrae.fr

### **Cursus et expériences professionnelles**

1999-2000 DEA Physiopathologie de la Nutrition Humaine, Paris VII. Stage, ISERM U465 (Dir P Ferré, encadrant A Quignard-Boulangé).

2000-2004 Doctorat, Université d'Auvergne, Clermont Ferrand (France). Stage, Unité de Nutrition du Métabolisme Protéique INRA de Theix (Dir de thèse : P Fafournoux)

2004-2005. Post-Doc, Pr Chris Proud's lab, UBC, Vancouver (Canada).

2006- présent: Chargé de recherche INRA, UMR1019 INRA Université d'Auvergne Clermont Ferrand (France).

2011: passage en Chargé de Recherche 1ère classe.

### **Expertise**

Domaines d'études :

- Etude de la régulation de l'expression des gènes par les acides aminés.
- Etude de la régulation des voies de signalisations par les nutriments.

Disciplines scientifiques :

- Biologie moléculaire, Biochimie, Biologie Cellulaire.

## Bilan d'activité

### 1/ Production scientifique

#### 1.1 Articles

- 1 Nathalie Bouquier, Enora Moutin, Lionel Tintignac, Amandine Reverbel, Elodie Jublanc, Michael Sinnreich, Yan Chastagnier, **Julien Averous**, Pierre Fafournoux, Chiara Verpelli, Tobias Boeckers, Gilles Carnac, Julie Perroy, Vincent Ollendorff (2020). AIMTOR, a BRET biosensor for live imaging, reveals subcellular mTOR signaling and dysfunctions. *BMC Biology*, 18 81, <https://dx.doi.org/10.1186%2Fs12915-020-00790-8>, <https://hal.inrae.fr/hal-02889781>
- 2 Anthony Fedele, Valérie Carraro, Jianling Xie, **Julien Averous**, Christopher Proud (2020). Cyclosporin A but not FK506 activates the integrated stress response in human cells. *Journal of Biological Chemistry*, jbc.RA120.014531, <https://dx.doi.org/10.1074%2Fjbc.RA120.014531>, <https://hal.inrae.fr/hal-02957868>
- 3 Tristan Chalvon-Demersay, Joanna Moro, Patrick Even, Catherine Chaumontet, Daniel Tomé, **Julien Averous**, Julien Piedcoq, Claire Gaudichon, Anne-Catherine Maurin, Pierre Fafournoux, Dalila Azzout-Marniche (2019). Liver GCN2 controls hepatic FGF21 secretion and modulates whole body postprandial oxidation profile under a low-protein diet. *AJP - Endocrinology and Metabolism*, 317 E1015-E1021, <https://dx.doi.org/10.1152%2Fajpendo.00022.2019>, <https://hal.inrae.fr/hal-02952238>
- 4 Florent Mesclon, Sarah Lambert-Langlais, Valérie Carraro, Laurent Parry, Isabelle Hainault, Céline Jousse, Anne-Catherine Maurin, Alain Bruhat, Pierre Fafournoux, **Julien Averous** (2017). Decreased ATF4 expression as a mechanism of acquired resistance to long-term amino acid limitation in cancer cells. *Oncotarget*, 8 27440-27453, <https://dx.doi.org/10.18632%2Foncotarget.15828>, <https://hal.inrae.fr/hal-02952250>
- 5 Cedric Chaveroux, Alain Bruhat, Valerie Carraro, Celine Jousse, **Julien Averous**, Anne-Catherine Maurin, Laurent Parry, Florent Mesclon, Yuki Muranishi, Pierre Cordelier, Aline Meulle, Patrick Baril, Anh Do Thi, Philippe Ravassard, Jacques Mallet, Pierre Fafournoux (2016). Regulating the expression of therapeutic transgenes by controlled intake of dietary essential amino acids. *Nature Biotechnology*, 34 746-751, <https://dx.doi.org/10.1038%2Fnbt.3582>, <https://hal.inrae.fr/hal-01594469>
- 6 **Julien Averous**, Sarah Lambert-Langlais, Florent Mesclon, Valerie Carraro, Laurent Parry, Celine Jousse, Alain Bruhat, Anne-Catherine Maurin, Philippe Pierre, Christopher G. Proud, Pierre Fafournoux (2016). GCN2 contributes to mTORC1 inhibition by leucine deprivation through an ATF4 independent mechanism. *Scientific Reports*, 6 27698, <https://dx.doi.org/10.1038%2Fsrep27698>, <https://hal.inrae.fr/hal-01438154>
- 7 Yuki Muranishi, Laurent Parry, **Julien Averous**, Anne Terrisse, Anne-Catherine Maurin, Cedric Chaveroux, Florent Mesclon, Valerie Carraro, Alain Bruhat, Pierre Fafournoux, Celine Jousse (2016). Method for collecting mouse milk without exogenous oxytocin stimulation. *Biotechniques*, 60 47-49, <https://dx.doi.org/10.2144%2F000114373>, <https://hal.inrae.fr/hal-01274509>
- 8 Cedric Chaveroux, Valerie Carraro, Laurence Canaple, , **Julien Averous**, Anne-Catherine Maurin, Celine Jousse, Yuki Muranishi, Laurent Parry, Florent Mesclon, Evelina Gatti, Jacques Mallet, Philippe Ravassard, Philippe Pierre, Pierre Fafournoux, Alain Bruhat (2015). In vivo imaging of the spatiotemporal activity of the eIF2 -ATF4 signaling pathway: Insights into stress and related disorders. *Science Signaling*, 8, 374 <https://stke.sciencemag.org/content/8/374/rs5>, <https://hal.inrae.fr/hal-02459218>

- 9 Céline Jousse, Yuki Muranishi, Laurent Parry, Christophe Montaurier, Patrick Even, Jean-Marie Launay, Valérie Carraro, Anne-Catherine Maurin, **Julien Averous**, Cédric Chaveroux, Alain Bruhat, Jacques Mallet, Béatrice Morio, Pierre Fafournoux (2014-08-13). Perinatal Protein Malnutrition Affects Mitochondrial Function in Adult and Results in a Resistance to High Fat Diet-Induced Obesity. *PLoS ONE*, 9 e104896, <https://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0104896>, <https://hal.sorbonne-universite.fr/hal-01365546>
- 10 **Julien Averous**, Sarah Lambert-Langlais, Valerie Carraro, Ophélie Gourbeyre, Laurent Parry, Wafa B'Chir, Yuki Muranishi, Celine Jousse, Alain Bruhat, Anne-Catherine Maurin, Christopher G. Proud, Pierre Fafournoux (2014). Requirement for lysosomal localization of mTOR for its activation differs between leucine and other amino acids. *Cellular Signalling*, 26 1918-1927, <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.cellsig.2014.04.019>, <https://hal.inrae.fr/hal-02631139>
- 11 Wafa B'Chir, Cedric Chaveroux, Valerie Carraro, **Julien Averous**, Anne-Catherine Maurin, Celine Jousse, Yuki Muranishi, Laurent Parry, Pierre Fafournoux, Alain Bruhat (2014). Dual role for CHOP in the crosstalk between autophagy and apoptosis to determine cell fate in response to amino acid deprivation. *Cellular Signalling*, 26 1385 - 1391, <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.cellsig.2014.03.009>, <https://hal.inrae.fr/hal-02638190>
- 12 Anne-Catherine Maurin, Alexandre Benani, Anne Lorsignol, Xavier Brenachot, Laurent Parry, Valerie Carraro, Christophe Guissard, **Julien Averous**, Celine Jousse, Alain Bruhat, Cedric Chaveroux, Wafa B'Chir, Yuki Muranishi, David Ron, Luc Pénicaud, Pierre Fafournoux (2014). Hypothalamic eIF2 alpha signaling regulates food intake. *Cell Reports*, 6 438-444, <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.celrep.2014.01.006>, <https://hal.inrae.fr/hal-02635326>
- 13 Rui Liu, Valentina Iadevaia, **Julien Averous**, Peter M. Taylor, Ze Zhang, Christopher G. Proud (2014). Impairing the production of ribosomal RNA activates mammalian target of rapamycin complex 1 signalling and downstream translation factors. *Nucleic Acids Research*, 42 5083-5096, <https://dx.doi.org/10.1093%2Fnar%2Fgku130>, <https://hal.inrae.fr/hal-02631277>
- 14 Wafa B'Chir, Anne-Catherine Maurin, Valerie Carraro, **Julien Averous**, Celine Jousse, Yuki Muranishi, Laurent Parry, Georges Stepien, Pierre Fafournoux, Alain Bruhat (2013). The eIF2 alpha/ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Research*, 41 7683 - 7699, <https://dx.doi.org/10.1093%2Fnar%2Fgkt563>, <https://hal.inrae.fr/hal-01056786>
- 15 Iban Seiliez, Jean-Charles Gabillard, Marine Riflade, Bastien Sadoul, Karine Dias, **Julien Averous**, Sophie Tesseraud, Sandrine Skiba, Stephane Panserat (2012). Amino acids downregulate the expression of several autophagy-related genes in rainbow trout myoblasts. *Autophagy*, 8 1-12, <https://dx.doi.org/10.4161%2Fauto.18863>, <https://hal.inrae.fr/hal-01205048>
- 16 **Julien Averous**, Jean-Charles Gabillard, Iban Seiliez, Dominique Dardevet (2012). Leucine limitation regulates myf5 and myoD expression and inhibits myoblast differentiation. *Experimental Cell Research*, 318 217-227, <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.yexcr.2011.10.015>, <https://hal.inrae.fr/hal-01205044>
- 17 Anne-Catherine Maurin, Cedric Chaveroux, Sarah Langlais, Valerie Carraro, Celine Jousse, Alain Bruhat, **Julien Averous**, Laurent Parry, David Ron, Josette Alliot, Pierre Fafournoux (2012). The amino acid sensor GCN2 biases macronutrient selection during aging. *European Journal of Nutrition*, 51 119 - 126, <https://dx.doi.org/10.1007%2Fs00394-011-0205-4>, <https://hal.inrae.fr/hal-02645818>
- 18 Céline Jousse, Laurent Parry, Sarah Lambert-langlais, Anne-Catherine Maurin, **Julien**

- Averous**, Alain Bruhat, Valérie Carraro, Jorg Tost, Philippe Lettéron, Patty Chen, Ralf Jockers, Jean-marie Launay, Jacques Mallet, Pierre Fafournoux (2011-06-06). Perinatal undernutrition affects the methylation and expression of the leptin gene in adults: implication for the understanding of metabolic syndrome. *FASEB Journal*, 25 3271-3278, <https://dx.doi.org/10.1096%2Ffj.11-181792>, <https://hal.uca.fr/hal-02460410>
- 19 Cedric Chaveroux, Sarah Lambert-Langlais, Laurent Parry, Valerie Carraro, Celine Jousse, Anne-Catherine Maurin, Alain Bruhat, Geoffroy Marceau, Vincent Sapin, **Julien Averous**, Pierre Fafournoux (2011). Identification of GCN2 as new redox regulator for oxidative stress prevention in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 415 120 - 124, <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.bbrc.2011.10.027>, <https://hal.inrae.fr/hal-02645943>
- 20 **Julien Averous**, S. Lambert-Langlais, Y. Cherasse, Valerie Carraro, Laurent Parry, Wafa B'Chir, Celine Jousse, Anne-Catherine Maurin, Alain Bruhat, Pierre Fafournoux (2011). Amino acid deprivation regulates the stress-inducible gene p8 via the GCN2/ATF4 pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 413 24 - 29, <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.bbrc.2011.08.028>, <https://hal.inrae.fr/hal-02650318>
- 21 Valerie Carraro, Anne-Catherine Maurin, Sarah Lambert-Langlais, **Julien Averous**, Cedric Chaveroux, Laurent Parry, Celine Jousse, Daima Oerd, Tonis Oerd, Pierre Fafournoux, Alain Bruhat (2010). Amino Acid Availability Controls TRB3 Transcription in Liver through the GCN2/eIF2 alpha/ATF4 Pathway. *PLoS ONE*, 5 <https://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0015716>, <https://hal.inrae.fr/hal-02660079>
- 22 Michelle Balage, **Julien Averous**, Didier Remond, Cécile Bos, Estelle Pujos-Guillot, Isabelle Papet, Laurent Mosoni, Lydie Combaret, Dominique Dardevet (2010). Presence of low-grade inflammation impaired postprandial stimulation of muscle protein synthesis in old rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 21 325-31, <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.jnutbio.2009.01.005>, <https://hal.inrae.fr/hal-01173409>
- 23 Isabelle Rieu, Hugues Magne, Isabelle Savary-Auzeloux, **Julien Averous**, Cecile Bos, Marie-Agnès Peyron, Lydie Combaret, Dominique Dardevet (2009). Reduction of low grade inflammation restores blunting of postprandial muscle anabolism and limits sarcopenia in old rats. *The Journal of Physiology*, 587 5483-5492, <https://dx.doi.org/10.1113%2Fjphysiol.2009.178319>, <https://hal.inrae.fr/hal-01867976>
- 24 **Julien Averous**, Bruno Fonseca, Christopher Proud (2008). Regulation of cyclin D1 expression by mTORC1 signaling requires eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1. *Oncogene*, 27 1106-1113, <https://dx.doi.org/10.1038%2Fsj.onc.1210715>, <https://hal.inrae.fr/hal-02667468>
- 25 Emilie Vazeille, Audrey Codran, Agnes Claustre, **Julien Averous**, Anne Lustrat, Daniel Bechet, Daniel Taillandier, Dominique Dardevet, Didier Attaix, Lydie Combaret (2008). The ubiquitin-proteasome and the mitochondria-associated apoptotic pathways are sequentially downregulated during recovery after immobilization-induced muscle atrophy. *AJP - Endocrinology and Metabolism*, 295 E1181-E1190, <https://dx.doi.org/10.1152%2Fajpendo.90532.2008>, <https://hal.inrae.fr/hal-02660018>
- 26 Anne-Catherine Maurin, Celine Jousse, **Julien Averous**, Laurent Parry, Alain Bruhat, Yoan Cherasse, Huiqing Zeng, Yuhong Zhang, Heather Harding, David Ron, Pierre Fafournoux (2005-04). The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores. *Cell Metabolism*, 1 273-277, <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.cmet.2005.03.004>, <https://hal.uca.fr/hal-02454718>
- 27 Anne-Catherine Maurin, Celine Jousse, Michelle Balage, **Julien Averous**, Laurent Parry, Alain Bruhat, Yoan Cherasse, Huiqing Zeng, Yuhong Zhang, Heather Harding, David Ron, Pierre Fafournoux (2005). La kinase GCN2 régule le comportement alimentaire des omnivores afin de maintenir l'homéostasie des acides aminés. *médecine/sciences*, 21 799-

- 801, <https://hal.inrae.fr/hal-02681321>
- 28 **Julien Averous**, Anne-Catherine Maurin, Alain Bruhat, Celine Jousse, Celine Arliguie, Pierre Fafournoux (2005). Induction of IGFBP-1 expression by amino acid deprivation of HepG2 human hepatoma cells involves both a transcriptional activation and an mRNA stabilization due to its 3'UTR. *FEBS Letters*, 579 2609-2614, <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.febslet.2005.03.077>, <https://hal.inrae.fr/hal-02682908>
- 29 **Julien Averous**, Alain Bruhat, Valerie Carraro, Celine Jousse, Gerald Thiel, Pierre Fafournoux (2004). Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 279 5288-5297, <https://dx.doi.org/10.1074%2Fjbc.M311862200>, <https://hal.inrae.fr/hal-02683570>
- 30 Alain Bruhat, **Julien Averous**, Valerie Carraro, Can Zhong, Andreas M. Reimold, Mickael S. Kilberg, Pierre Fafournoux (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. *Journal of Biological Chemistry*, 277 48107-48114, <https://dx.doi.org/10.1074%2Fjbc.M206149200>, <https://hal.inrae.fr/hal-02683499>

## **1.2 Revue**

- 1 Alain Bruhat, Cedric Chaveroux, Valerie Carraro, Celine Jousse, **Julien Averous**, Anne-Catherine Maurin, Laurent Parry, Florent Mesclon, Yuki Muranishi, Patrick Baril, Anh Do Thi, Philippe Ravassard, Jacques Mallet, Pierre Fafournoux (2017). Réguler l'expression d'un transgène thérapeutique par un régime alimentaire carencé en un acide aminé indispensable. Tuning transgene expression with an artificial diet: a compelling resource in gene therapy. *médecine/sciences*, 33 136-139, <https://dx.doi.org/10.1051%2Fmedsci%2F20173302007>, <https://hal.inrae.fr/hal-01595228>
- 2 Alain Bruhat, Celine Jousse, Valerie Carraro, Anne-Catherine Maurin, Cedric Chaveroux, Laurent Parry, **Julien Averous**, Florent Mesclon, Pierre Fafournoux (2015). L'activation de la voie eIF2 $\alpha$ -ATF4, une réponse adaptative au stress cellulaire. *médecine/sciences*, 31 1057-1060, <https://dx.doi.org/10.1051%2Fmedsci%2F20153112002>, <https://hal.inrae.fr/hal-01595102>
- 3 Pierre Fafournoux, **Julien Averous**, Alain Bruhat, Valerie Carraro, Celine Jousse, Anne-Catherine Maurin, Florent Mesclon, Laurent Parry (2015). Adaptation to the availability of essential amino-acids: role of GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway. *Biologie Aujourd'hui*, 209 317-23, <https://dx.doi.org/10.1051%2Fjbio%2F2016005>, <https://hal.inrae.fr/hal-01519158>
- 4 Cédric Chaveroux, Sarah Lambert-Langlais, Yoan Cherasse, **Julien Averous**, Laurent Parry, Valérie Carraro, Céline Jousse, Anne-Catherine Maurin, Alain Bruhat, Pierre Fafournoux (2009). Molecular mechanisms involved in the adaptation to amino acid limitation in mammals. *Biochimie* 7. <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/biof.40>, <https://hal.inrae.fr/hal-02664128v1>
- 5 **Julien Averous**, Christopher Proud (2006). When translation meets transformation : The mTOR story. *Oncogene*, 25 6423-6435, <https://dx.doi.org/10.1038%2Fsj.onc.1209887>, <https://hal.inrae.fr/hal-02658876>
- 6 C. Jousse, **Julien Averous**, Alain Bruhat, Valérie Carraro, Sylvie Mordier, Pierre Fafournoux (2004). Amino acids as regulators of gene expression : Molecular mechanisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313 447-452, <https://hal.inrae.fr/hal-02679439>
- 7 **Julien Averous**, Alain Bruhat, Sylvie Mordier, Pierre Fafournoux (2003). Recent advances in the understanding of amino acid regulation of gene expression. *Journal of*

### **1.3 Chapitres d'ouvrages**

**Julien Averous**, Celine Jousse, Anne-Catherine Maurin, Alain Bruhat, Pierre Fafournoux (2016). Adaptation to Amino Acid Availability: Role of GCN2 in the Regulation of Physiological Functions and in Pathological Disorders. 368 p., <https://hal.inrae.fr/hal-02799663>

**Julien Averous**, Sarah Langlais, Cedric Chaveroux, Laurent Parry, Valerie Carraro, Anne-Catherine Maurin, Celine Jousse, Alain Bruhat, Pierre Fafournoux (2012). Cellular adaptation to amino acid availability: mechanisms involved in the regulation of gene expression. 14, <https://hal.inrae.fr/hal-02805890>

Sylvie Mordier, Alain Bruhat, **Julien Averous**, Pierre Fafournoux (2002). Cellular adaptation to amino acid availability : Mechanisms involved in the regulation of gene expression and protein metabolism. 3 <https://hal.inrae.fr/hal-02826696>

### **2/ Congrès, colloques**

#### **2.1 Communication orales**

**Julien Averous**, Florent Mesclon, Valerie Carraro, Laurent Parry, Celine Jousse, Anne-Catherine Maurin, Alain Bruhat, Pierre Fafournoux . Une nouvelle piste concernant les effets biologiques des polyphénols : Rôle de la voie GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4. JFN Nantes (2017)

Florent Mesclon, Sarah Langlais, Valerie Carraro, Laurent Parry, Cedric Chaveroux, Celine Jousse, Anne-Catherine Maurin, Alain Bruhat, Pierre Fafournoux, **Julien Averous** (2015-11-04). *Identification des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance des cellules à une carence en acides aminés*. Presented at : 2emes Assises Inter-Régionales De Nutrition et Métabolisme, Saint Galmier, France, fr (2015-11-04 - 2015-11-05), <https://hal.inrae.fr/hal-01237880>

**Julien Averous**, Sarah Lambert-Langlais, Florent Mesclon, Valerie Carraro, Laurent Parry, Celine Jousse, Alain Bruhat, Anne-Catherine Maurin, Philippe Pierre, Christopher G. Proud, Pierre Fafournoux (2018-05-22). *GCN2 contributes to mTORC1 inhibition by leucine deprivation through an ATF4 independent mechanism*. Presented at : 1.edition Target of Rapamycin science club in France, le "TOR de France", fr (2018-05-22 - ), <https://hal.inrae.fr/hal-01811435>

#### **2.2 posters**

**Julien Averous**, Sarah Lambert-Langlais, Florent Mesclon, Valerie Carraro, Laurent Parry, Celine Jousse, Alain Bruhat, Anne-Catherine Maurin, Philippe Pierre, Christopher G. Proud, Pierre Fafournoux (2017). GCN2 contributes to mTORC1 inhibition by leucine deprivation through an ATF4 independent mechanism. Life Science Symposium, Frontier in Metabolism, Lausanne.

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

(2017) Identification of molecular mechanisms involved in cancer cell resistance to amino acid deprivation. Life Science Symposium, Frontier in Metabolism, Lausanne (2017).

Anne-Catherine Maurin, Wafa B'Chir, Vanessa Reinhardt, Laurent Parry, Valerie Carraro, Florent Mesclon, Sylvie Mordier, Celine Jousse, Alain Bruhat, **Julien Averous**, Pierre Fafournoux (2016-04-06). *The GCN2 kinase is required for activating autophagy in response to indispensable amino acid deficiencies*. Presented at : 7. Proteasomes & Autophagy Workshop, fr (2016-04-06 - ), <https://hal.inrae.fr/hal-01305347>

Florent Mesclon, Sarah Langlais, Valerie Carraro, Laurent Parry, Cedric Chaveroux, Celine Jousse, Anne-Catherine Maurin, Alain Bruhat, Pierre Fafournoux, **Julien Averous** (2015-09-28). *Identification of molecular mechanisms involved in cancer cell resistance to amino acid deprivation*. Presented at : Cancer and Metabolism conference, ABCAM 2015, gb (2015-09-28 - ), <https://hal.inrae.fr/hal-02739369>

Cedric Chaveroux, Alain Bruhat, Valerie Carraro, **Julien Averous**, Celine Jousse, Anne-Catherine Maurin, Yuki Muranishi, Laurent Parry, Jacques Mallet, Philippe Ravassard, Pierre Fafournoux (2014-03-24). *Development and optimization of a new gene regulation system controlled by nutrition applicable for gene therapy*. Presented at : Congrès de la Société Française de Thérapie Cellulaire et Génique (SFTCG), fr (2014-03-24 - ), <https://hal.inrae.fr/hal-02740006>

Alain Bruhat, Cedric Chaveroux, Valerie Carraro, **Julien Averous**, Celine Jousse, Anne-Catherine Maurin, Yuki Muranishi, Laurent Parry, Denise Aubert, Didier Nègre, Pierre Fafournoux (2014-01-21). *Génération d'un modèle de souris transgénique pour visualiser en temps réel l'activation de la voie eIF2 $\alpha$ /ATF4 lors d'un stress nutritionnel*. Presented at : Assises du Département Alimh, fr (2014-01-21 - ), <https://hal.inrae.fr/hal-01190022>

Wafa B'Chir, Anne-Catherine Maurin, **Julien Averous**, Celine Jousse, Yuki Muranishi, Valerie Carraro, Laurent Parry, Georges Stepien, Pierre Fafournoux, Alain Bruhat (2013-05-05). *The eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression*. Presented at : EMBO Conference, Autophagy: Molecular Mechanisms, Physiology and Pathology, no (2013-05-05 - ), <https://hal.inrae.fr/hal-02748854>

### 3/ Collaborations

#### **3.1 Nationale**

Dalila Azzout Marniche (UMR0914 INRA/AgroParisTech) (collaboration depuis 2011).

Vincent Ollendorff (Unité DMEM, Montpellier) (collaboration en 2019)

Jean-Charles Gabillard (LPGP, INRAE) et Iban Seiliez (NuMeA, INRAE) (2009-2012)

#### **3.2 Internationale**

Jacques Pouyssegur (Centre Scientifique de Monaco, Monaco) (2012-2017)

Chris Proud (Université d'Adélaïde, Australie) (2010-2019)

#### 4/ Financement et Prix

Financement INRAE de type ANSSD (Actions Nouvelles du Schéma Stratégique de Département) pour deux ans (10 000 euros) pour les cellules satellites.

Prix de Recherche SFN en 2016 (20 000 euros) GCN2 et polyphénols.

#### 5/ Formation par la recherche, formation initiale et continue

##### **5.1 Encadrement**

###### Encadrement d'étudiant.es BAC+2, BAC+3

Emilien Bonnet, BTS Lycée Simone Veil, Le puy en Velay 2010 (Encadrement)

Mélody Fimbel, BTS Lycée Simone Veil, Le puy en Velay 2011 (Encadrement)

Maxime Jaranton, BTS Lycée La Découverte, Decazeville 2016 (Encadrement)

###### Encadrement d'étudiant.es BAC+4, BAC+5

Florent Mesclon, M2 Sciences de la Vie de la Santé, Université Clermont-Ferrand Auvergne, 2013 (Encadrant)

Jean Baptiste Bizeau, M2 Sciences de la Vie de la Santé, Université Clermont-Ferrand Auvergne, 2019 (Encadrant)

###### Thèses

Florent Mesclon, Ecole Doctorale Sciences de la Vie de la Santé, Université Clermont-Ferrand Auvergne, 2013-2016 (Co-Encadrant) Financement Région Auvergne-INRA

###### Post-doctorant.es

Sarah Lambert-Langlais, Co responsable.

##### **5.2 Contribution aux enseignements**

Master 1 Régulation des gènes par les nutriments, Université Clermont-Ferrand Auvergne  
Participation à l'enseignement (4 heures /an)

#### 6/ Participation à des comités de thèses, des instances de recrutement, jurys de concours, jurys de sélection

Comités de thèse :

Rafik Boudra (Université Clermont Auvergne)

Houda Tabbal (Université Clermont Auvergne)

Anthony Alioui (Université Clermont Auvergne)

Joanna Moro (AgroParisTech, Université Paris-Saclay)

Jury de Concours :

Participation à un jury de concours Master 2 Sciences de la Vie et de la Santé Université Clermont Ferrand Auvergne ; 2020.

Jurys de sélection :

Participation à un Comité de sélection de MCU à l'Université Blaise Pascal de Clermont Ferrand en 2010

## 7/ Organisation de congrès, participation à des comités d'organisation

Participation à l'organisation du congrès 2006 de la Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire, Clermont Ferrand.

## 8/ Participation au collectif de l'unité

Membre du groupe d'animation scientifique

Membre du groupe de gestion du matériel et de l'équipement

## 9/ Brevet

Pierre Fafournoux, Alain Bruhat, Celine Jousse, Anne-Catherine Maurin, Julien Averous (2014-10-30). Inducible expression cassette, and uses thereof. (Brevet n°: US 2014/0322184 A1). <https://hal.inrae.fr/hal-02792534>

Pierre Fafournoux, Alain Bruhat, Celine Jousse, Anne-Catherine Maurin, Julien Averous (2011-11-08). Cassette d'expression inductible et ses utilisations. (Brevet n°: EP2776568 A1). <https://hal.inrae.fr/hal-02809468>

## 10/ Création ou participation à la création d'une entreprise pour valoriser ses résultats de recherche, ou collaborer avec une start-up

Concours scientifique et participation à la startup Nutritheragène. Cette StartUp a été créée en 2019 sous l'impulsion de Pierre Fafournoux et d'Alain Bruhat, elle repose sur le brevet mentionné précédemment. Le projet a reçu le Grand prix I-Lab en 2018. L'objectif est de

développer un outil de thérapie génique inductible de manière nutritionnelle en se basant sur la voie GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4. Il faut savoir qu'actuellement, il n'existe pas de système de thérapie génique inductible utilisable chez l'Homme.

11/ Actions d'information scientifique et technique, ouvrage de vulgarisation, contribution au profit du grand public

Animation d'un stand aux Journées Portes Ouvertes INRA Centre de Theix (Mai 2015).