



## L'activation de la voie eIF2 $\alpha$ -ATF4, une réponse adaptative au stress cellulaire

Alain Bruhat<sup>1,2</sup>, Céline Jousse<sup>1,2</sup>, Valérie Carraro<sup>1,2</sup>, Anne-Catherine Maurin<sup>1,2</sup>, Cédric Chaveroux<sup>3</sup>, Laurent Parry<sup>1,2</sup>, Julien Averous<sup>1,2</sup>, Florent Mesclon<sup>1,2</sup>, Pierre Fafournoux<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR 1019 Nutrition Humaine, centre Auvergne-Rhône-Alpes, 63122 Saint Genès Champanelle, France ;

<sup>2</sup> Université Clermont 1, UFR Médecine, UMR 1019 Nutrition Humaine, 63000 Clermont-Ferrand, France ;

<sup>3</sup> Inserm U1052, CNRS UMR5286, centre de recherche en cancérologie de Lyon, 69000 Lyon, France.

[alain.bruhat@clermont.inra.fr](mailto:alain.bruhat@clermont.inra.fr);

[pierre.fafournoux@clermont.inra.fr](mailto:pierre.fafournoux@clermont.inra.fr)

> Toutes les cellules de l'organisme doivent faire face à des perturbations de leur environnement pouvant affecter leur homéostasie. Le programme de défense de la cellule sollicite des mécanismes de signalisation permettant de détecter les perturbations de l'environnement et de mettre en place des processus physiologiques d'adaptation. Parmi les voies de signalisation mises en jeu, la voie eIF2 $\alpha$ -ATF4 (*eukaryotic initiation factor 2 alpha - activating transcription factor 4*) joue un rôle clé dans la réponse à des stress cellulaires tels que la carence en acides aminés, le stress oxydant, le choc thermique ou encore l'hypoxie.

### La voie eIF2 $\alpha$ -ATF4

eIF2 (*eukaryotic initiation factor 2*) est un facteur d'initiation de la traduction composé de trois sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ). Il est impliqué dans la fixation du premier ARN de transfert méthionine (ARNt-Met) à la petite sous-unité du ribosome. En réponse à une grande variété de stress, sa sous-unité  $\alpha$  est phosphorylée sur la sérine 51. Chez les mammifères, cette phosphorylation peut être réalisée par quatre kinases [1]. Les deux premières sont la kinase GCN2 (*general control non-depressible-2*) et la kinase PERK (*protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*). GCN2 est activée par la liaison d'ARNt non chargés, générés par une carence en un acide aminé indispensable (AAI), et PERK par l'accumulation de protéines malfor-

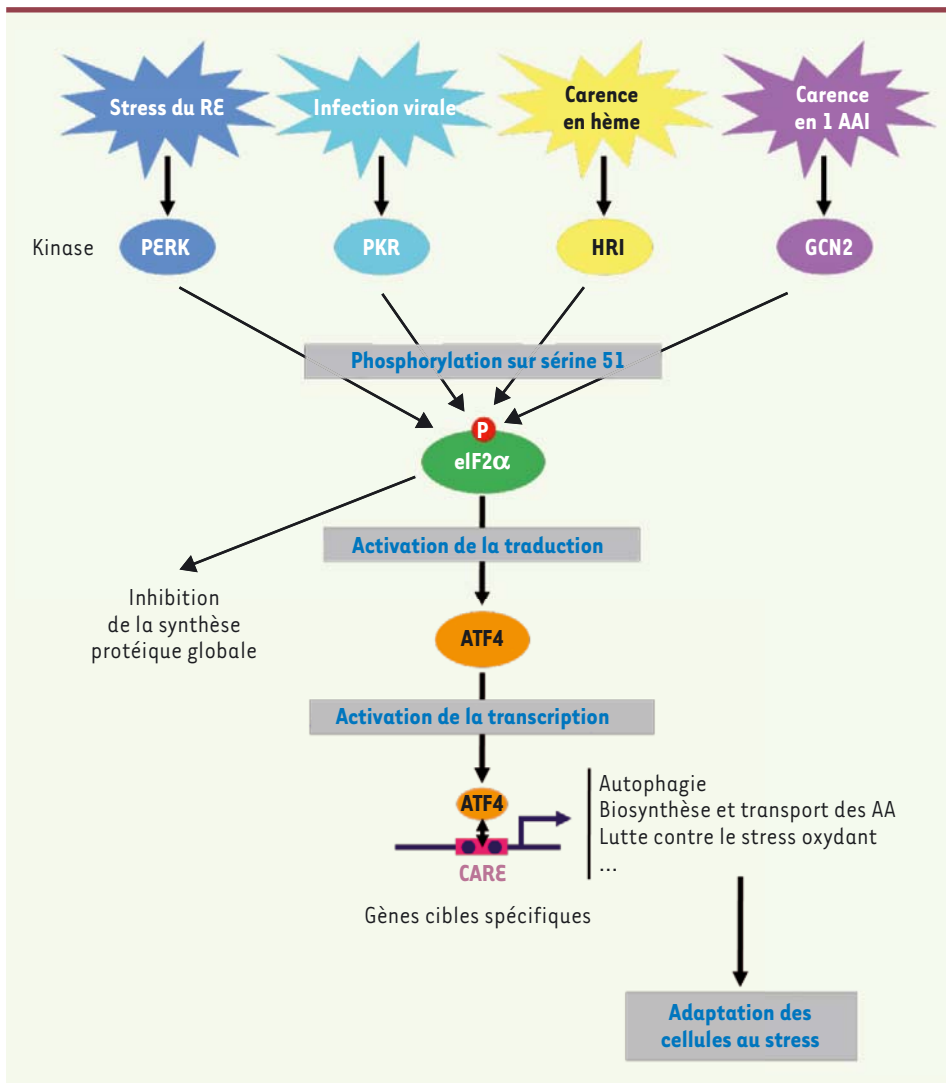
mées, conduisant au stress du réticulum endoplasmique (RE) (Figure 1). La kinase PKR (*protein kinase double-stranded RNA-dependent*) est, elle, activée lors d'infections virales et par certaines cytokines (interféron  $\gamma$ , TNF $\alpha$  [*tumor necrosis factor*] et IL[interleukine]-1 $\beta$ ). Enfin la kinase HRI (*heme regulated inhibitor*), qui est la moins étudiée, est activée dans des conditions de déficit en hème<sup>1</sup>. Quel que soit le stress, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  par ces kinases va avoir pour conséquence d'empêcher la formation du complexe d'initiation de la traduction, entraînant une forte inhibition de la synthèse protéique [2]. La cellule va ainsi pouvoir réduire son métabolisme général et économiser de l'énergie pour réparer les dommages causés par le stress. En parallèle, la traduction de certains ARN messagers, comme celui de l'ATF4 (*activating transcription factor 4*), est sélectivement induite grâce à une structure particulière de leur région 5' non-traduite [3]. ATF4 est un facteur de transcription qui appartient à la famille des protéines bZIP (*basic leucine zipper protein*). Ce facteur interagit avec des séquences promotrices spécifiques, appelées séquences CARE (C/EBP [CCAAT-enhancer-binding protein] - ATF [*activating transcription factor*] - responsive element), et est responsable de

l'induction d'un programme d'expression de gènes cibles connu sous le nom de réponse intégrée au stress (ISR, *integrated stress response*) [4]. Ces gènes jouent un rôle clé dans les processus d'adaptation et de survie de la cellule au stress : ils codent des protéines impliquées, par exemple, dans l'autophagie, la biosynthèse et le transport des acides aminés, et la lutte contre le stress oxydant [5, 6].

### La souris CARE-LUC, un outil pour visualiser l'activation de la voie eIF2 $\alpha$ -ATF4

Afin de visualiser l'activation de la voie de signalisation eIF2 $\alpha$ -ATF4 en réponse à un stress au niveau de l'animal entier, nous avons récemment généré une lignée de souris transgénique, appelée CARE-LUC, qui exprime le gène rapporteur luciférase (LUC) sous le contrôle de séquences CARE capables de fixer le facteur de transcription ATF4 (Figure 2A) [7]. La luciférase exprimée dans les différents tissus catalyse l'oxydation de la luciférine injectée à l'animal. La lumière émise lors de cette réaction est donc proportionnelle au niveau d'expression du gène luciférase. Sa détection permet ainsi de visualiser l'activation de la voie eIF2 $\alpha$ -ATF4 en fonction des stress ou des situations physiopathologiques ou pathologiques au niveau (1) de l'animal entier vivant, par imagerie bioluminescente, (2) de chaque organe ou tissu, par imagerie bioluminescente et dosage enzymatique, et (3) de

<sup>1</sup> L'hème est un cofacteur formé par une structure aromatique, ou porphyrine, et un atome de métal, permettant de fixer un gaz diatomique. L'hémoglobine, par exemple, contient un hème b permettant de fixer le dioxygène.



**Figure 1. L'activation de la voie de signalisation eIF2 $\alpha$ -ATF4.** La voie eIF2 $\alpha$ -ATF4 est activée par 4 kinases (PERK [protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase], GCN2 [general control non-depressible-2], PKR [protein kinase double-stranded RNA-dependent], HRI [heme regulated inhibitor]) spécifiques à différents types de stress. Les kinases, une fois activées, vont phosphoryler le facteur d'initiation de la traduction, eIF2 (eukaryotic initiation factor 2), sur la sérine 51 de sa sous-unité  $\alpha$ . Cet événement va conduire, d'une part, à l'inhibition de la synthèse protéique globale et, d'autre part, à l'induction de la traduction d'un petit nombre d'ARN messagers, dont celui codant le facteur de transcription ATF4 (activating transcription factor 4). Une fois fixé sur des séquences d'ADN *cis* appelées CARE (C/EBP-ATF-responsive element), ATF4 va induire un programme de gènes cibles spécifiques jouant un rôle dans l'adaptation des cellules au stress. AA : acide aminé ; AAI : acide aminé indispensable.

chaque cellule, par immuno-histochimie en utilisant un anticorps anti-luciférase.

### Le profil d'activation de la voie eIF2 $\alpha$ -ATF4 dans les tissus est spécifique de l'inducteur

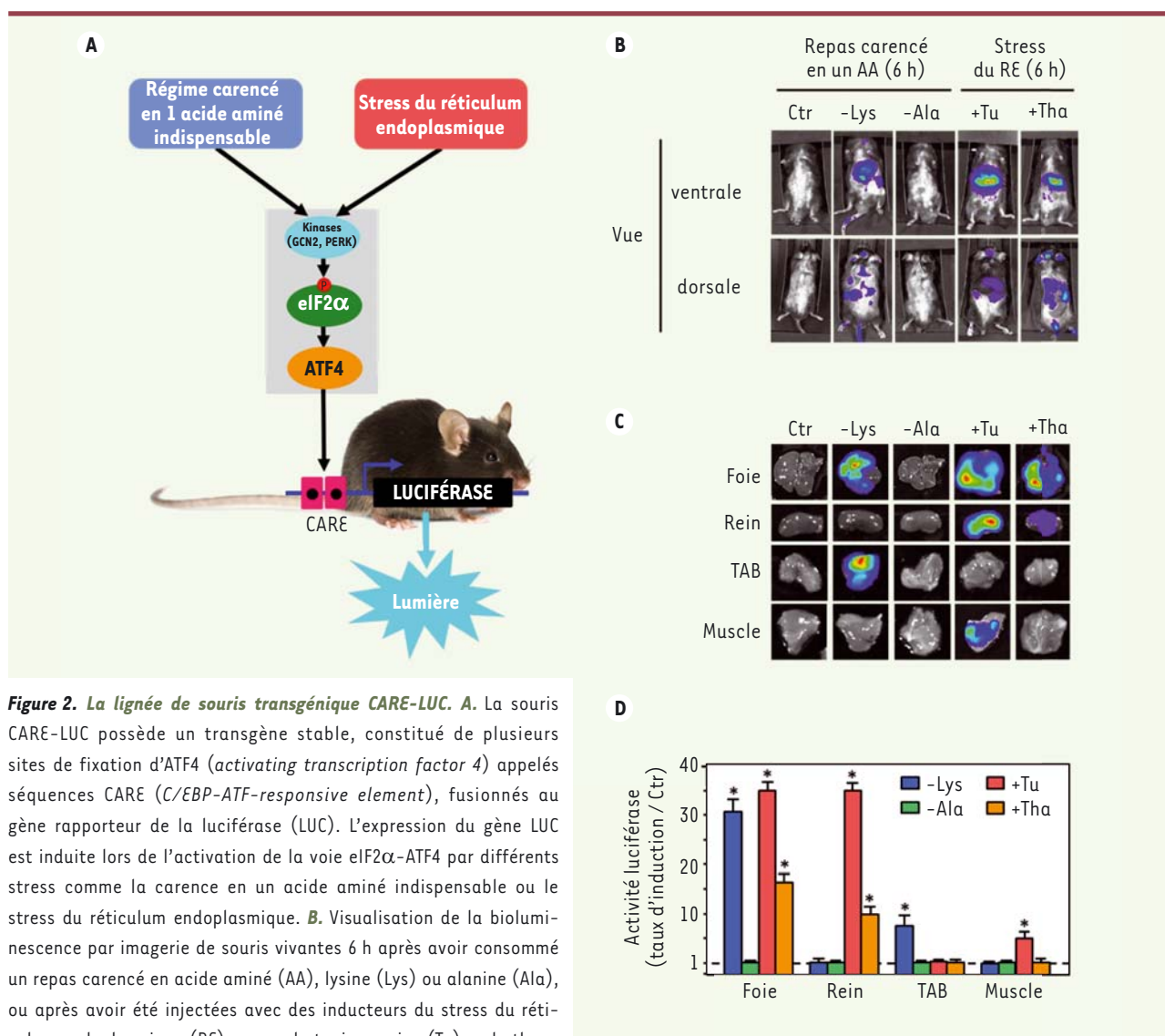
La lignée transgénique CARE-LUC nous a permis de visualiser l'activation de la voie eIF2 $\alpha$ -ATF4 soit par la kinase GCN2, lors d'un stress nutritionnel résultant de la consommation d'un régime carencé en un acide aminé indispensable comme la lysine, soit par la kinase PERK, lors d'un stress du réticulum endoplasmique consécutif à l'injection de drogues comme la tunicamycine<sup>2</sup> (Tu) et la

thapsigargine<sup>3</sup> (Tha) (Figure 2B) [7]. Les résultats, obtenus par visualisation de la bioluminescence au niveau de l'abdomen des souris vivantes, confirment que la voie eIF2 $\alpha$ -ATF4 est activée par ces inducteurs. En revanche, et comme nous nous y attendions, aucune activation n'est détectée suite à la consommation d'un repas carencé en alanine, un acide aminé non indispensable que l'organisme est capable de synthétiser. L'analyse de l'activité luciférase dans les différents tissus nous a ensuite permis de montrer que le profil d'activation de la voie eIF2 $\alpha$ -ATF4 dépend de l'induc-

teur (Figure 2C, D). Si l'induction de cette voie est observée dans le foie lors d'une carence en un acide aminé indispensable (AAI) ou d'un stress du réticulum endoplasmique, elle dépend de l'inducteur dans certains tissus comme le rein, le tissu adipeux brun (TAB) et le muscle. Nous avons pu confirmer ces résultats en mesurant l'induction de l'expression, dans ces différents tissus, de gènes cibles de la voie eIF2 $\alpha$ -ATF4, comme *Trb3* (*tribbles pseudokinase 3*), *Atf3* (*activating transcription factor 3*) ou *Xpot* (*exportin, tRNA*) [7]. Cette différence de profil d'activation ne peut pas s'expliquer par la présence, ou l'absence, des kinases GCN2 et PERK, car celles-ci sont toutes les deux exprimées dans ces tissus. Les mécanismes

<sup>2</sup> Antibiotique issu de bactéries du genre *Streptomyces*, inhibiteur de la glycosylation des protéines.

<sup>3</sup> Composé chimique de la classe des lactones sesquiterpéniques issu d'une plante, *Thapsia garganica*, agissant sur le métabolisme cellulaire calcique.



**Figure 2. La lignée de souris transgénique CARE-LUC.** **A.** La souris CARE-LUC possède un transgène stable, constitué de plusieurs sites de fixation d'ATF4 (*activating transcription factor 4*) appelés séquences CARE (*C/EBP-ATF-responsive element*), fusionnés au gène rapporteur de la luciférase (LUC). L'expression du gène LUC est induite lors de l'activation de la voie eIF2 $\alpha$ -ATF4 par différents stress comme la carence en un acide aminé indispensable ou le stress du réticulum endoplasmique. **B.** Visualisation de la bioluminescence par imagerie de souris vivantes 6 h après avoir consommé un repas carencé en acide aminé (AA), lysine (Lys) ou alanine (Ala), ou après avoir été injectées avec des inducteurs du stress du réticulum endoplasmique (RE) comme la tunicamycine (Tu) ou la thapsigargine (Tha). Ctr : contrôle. **C.** Visualisation de la bioluminescence par imagerie dans le foie, le rein, le tissu adipeux brun (TAB) et le muscle gastrocnémien (situé au niveau du mollet), après sacrifice des souris. **D.** Dosage de l'activité luciférase dans les tissus. Les valeurs correspondent au taux d'induction par rapport au contrôle (Ctr) ; \* $P \leq 0.05$  par rapport aux valeurs contrôles (d'après [7]).

gouvernant la spécificité tissulaire de l'induction de la voie eIF2 $\alpha$ -ATF4 restent donc encore à identifier.

### La voie eIF2 $\alpha$ -ATF4 est activée dans un modèle de fibrose hépatique

La voie eIF2 $\alpha$ -ATF4 est activée dans un grand nombre de situations pathologiques comme la maladie d'Alzheimer, le développement tumoral, les néphropathies, l'infection bactérienne ou le diabète [8-10]. Cependant, le rôle de cette voie dans la progression ou la lutte contre ces pathologies demande à être mieux caractérisé.

Nous avons réalisé une expérience de preuve de concept de l'utilisation de la lignée de souris CARE-LUC pour étudier l'activation de la voie eIF2 $\alpha$ -ATF4 dans une situation pathologique, la fibrose hépatique [7]. Ce type de fibrose est une conséquence de lésions hépatiques chroniques qui se caractérise par l'accumulation anormalement élevée de constituants de la matrice extracellulaire dans le parenchyme hépatique. Nous avons démontré qu'il existe une corrélation entre l'apparition d'une fibrose hépatique induite chimiquement et l'activation de la

voie eIF2 $\alpha$ -ATF4 par la kinase PERK [7]. Des expériences d'immuno-histochimie nous ont aussi permis de mettre en évidence une induction des protéines à la fois de luciférase et du collagène-1 au niveau des hépatocytes. La souris CARE-LUC constitue ainsi un bon modèle *in vivo* pour suivre, dans l'espace et le temps, la modulation de la voie eIF2 $\alpha$ -ATF4 au cours de l'évolution d'une pathologie.

### Conclusions et perspectives

La voie eIF2 $\alpha$ -ATF4 est connue pour son implication dans l'adaptation et

la survie cellulaire en réponse à différents types de stress. Cependant le rôle de cette voie et des kinases qui la contrôlent, dans le développement ou l'adaptation à différentes situations physiopathologiques, est complexe et reste encore mal connu. Nos résultats démontrent que la souris CARE-LUC constitue un bon outil pour mieux comprendre la spécificité tissulaire d'induction et la fonction de cette voie. Si l'on envisage d'utiliser la voie eIF2 $\alpha$ -ATF4 comme cible thérapeutique, la souris CARE-LUC pourra également permettre de tester l'efficacité de nouvelles drogues pharmacologiques capables de moduler son activation.  $\diamond$

**Activation of the eIF2 $\alpha$ -ATF4 pathway: an adaptive response to cellular stress**

## REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été soutenus par des financements de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-12-EMMA-0024, ANR-12-BSV2-0025-03) et de l'INRA (ANSSD AlimH).

## LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

## RÉFÉRENCES

1. Donnelly N, Gorman AM, Gupta S, Samali A. The eIF2alpha kinases: their structures and functions. *Cell Mol Life Sci* 2013 ; 70 : 3493-511.
2. Holcik M, Sonenberg N. Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005 ; 6 : 318-27.
3. Harding HP, Novoa II, Zhang Y, et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 2000 ; 6 : 1099-108.
4. Kilberg MS, Shan J, Su N. ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends Endocrinol Metab* 2009 ; 20 : 436-43.

5. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 2003 ; 11 : 619-33.
6. B'Chir W, Maurin AC, Carraro V, et al. The eIF2alpha/ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res* 2013 ; 41 : 7683-99.
7. Chaveroux C, Carraro V, Canaple L, et al. In vivo imaging of the spatiotemporal activity of the eIF2alpha-ATF4 signaling pathway: Insights into stress and related disorders. *Sci Signal* 2015 ; 8 : rs5.
8. Baird TD, Wek RC. Eukaryotic initiation factor 2 phosphorylation and translational control in metabolism. *Adv Nutr* 2012 ; 3 : 307-21.
9. Tattoli I, Sorbara MT, Vuckovic D, et al. Amino acid starvation induced by invasive bacterial pathogens triggers an innate host defense program. *Cell Host Microbe* 2012 ; 11 : 563-75.
10. Ohno M. Roles of eIF2alpha kinases in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front Mol Neurosci* 2014 ; 7 : 22.

## NOUVELLE

### La phosphoprotéine P du virus de la maladie de Borna altère le développement des neurones GABAergiques humains

Chloé Scordel<sup>1</sup>, Muriel Couplier<sup>2-4</sup>

➤ Suite à l'entrée d'un virus dans le cerveau, l'organisme met en place une réponse immunitaire ayant pour but de limiter la dissémination du virus et de résorber l'infection. Ceci se traduit par une encéphalite aiguë, l'inflammation entraînant alors des lésions du tissu nerveux. Il arrive cependant que certains virus ne soient que peu ou pas reconnus par le système immunitaire et n'induisent ni encéphalite, ni lésions majeures. Dans ce cas, le virus peut se répliquer de façon continue et persister dans le cerveau de l'individu infecté pendant toute sa vie. Sa présence n'est toutefois pas sans danger pour les cellules infectées. Il peut en effet interférer avec des fonctions cellulaires

ce qui, sans altérer la survie de la cellule, va être à l'origine de dysfonctionnements et éventuellement de maladies. Ce mécanisme viral a été mis en évidence pour la première fois pour le virus de la chorioméningite lymphocytaire, dans le début des années 1980, par le groupe du Dr Oldstone [1]. Depuis, un certain nombre d'études épidémiologiques, chez l'homme, et expérimentales, chez l'animal, ont suggéré que des virus mettant en place ce type de mécanisme pourraient être responsables de maladies chroniques du système nerveux central. Ils pourraient ainsi être à l'origine de certaines maladies psychiatriques ou neurologiques dont l'étiologie n'est pas encore connue [2].

<sup>1</sup> Max von Pettenkofer Institute and GeneCenter, Feodor-Lynen Strasse 25, Munich, Allemagne ;

<sup>2</sup> INRA, UMR 1161 Virologie, 7, avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort, France ;

<sup>3</sup> ANSES, UMR 1161 Virologie, 7, avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort, France ;

<sup>4</sup> Université Paris-Est, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR 1161 Virologie, 7, avenue du Gal de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort, France.

[mcouplier@vet-alfort.fr](mailto:mcouplier@vet-alfort.fr)

Le virus de la maladie de Borna est un exemple de ce type de virus. Il induit, chez diverses espèces animales, des désordres comportementaux rappelant ceux observés chez les patients schizophrènes ou bipolaires. C'est un virus enveloppé<sup>1</sup> dont le génome est constitué d'un ARN simple brin, non-segmenté, de

<sup>1</sup> Certains virus sont capables de s'entourer d'une enveloppe membranaire, issue de la cellule hôte, qui peut présenter des protéines produites par le virus ou par l'hôte. Par exemple, le virus de la grippe et celui de l'immunodéficience humaine font partie de cette famille de virus.