



Université de Sherbrooke

Rôle des Glycogène synthase kinases 3 (GSK3) dans la  
régulation de l'autophagie et du facteur de transcription EB  
(TFEB) dans les cellules pancréatiques tumorales humaines

Par  
Benoît Marchand  
Département de médecine, Service de gastroentérologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
En vue de l'obtention du grade de  
Philosophiae doctor (Ph.D.) en biologie cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada  
14 Janvier 2016

Membres du jury d'évaluation :  
Pre Marie-Josée Boucher, Département de médecine, Université de Sherbrooke  
Pr François Boudreau, Département d'anatomie et biologie cellulaire, UdeS  
Pre Sophie Roux, Département de médecine, UdeS  
Pre Louise Larose, Département de médecine, McGill

# Rôle des Glycogène synthase kinases 3 (GSK3) dans la régulation de l'autophagie et du facteur de transcription EB (TFEB) dans les cellules pancréatiques tumorales humaines

Par Benoît Marchand

Département de médecine, Service de gastroentérologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.) en biologie cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Canada

Plusieurs études ont suggéré une implication des glycogène synthase kinases 3 (GSK3) dans la carcinogenèse, notamment du pancréas. Des études ont rapporté des résultats contradictoires quant à l'impact des GSK3 sur la survie cellulaire. Au niveau du pancréas, il a été observé que l'inhibition des GSK3 inhibe la croissance entre autres via la régulation de la voie JNK ou NF $\kappa$ B. Les inhibiteurs des GSK3 sont présentement à l'étude comme traitement de différentes pathologies, notamment pour le cancer pancréatique. Une meilleure compréhension des voies de signalisation régulées par les GSK3 sera donc nécessaire. Nous avons entrepris ces travaux afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation de la survie des cellules pancréatiques tumorales par les GSK3.

Nous avons démontré que l'inhibition des GSK3 induit l'apoptose et l'autophagie dans les cellules pancréatiques tumorales humaines. L'inhibition des GSK3 stimule l'autophagie autant dans les cellules pancréatiques tumorales que non tumorales, alors que l'apoptose est induite spécifiquement dans les cellules tumorales. Contrairement à l'apoptose, l'autophagie est induite indépendamment de la voie JNK-cJUN suite à l'inhibition des GSK3. Nos résultats démontrent que l'inhibition des GSK3 mène à l'inactivation de la voie mTORC1 qui pourrait contribuer à l'induction de l'autophagie. D'autre part, nos travaux ont démontré pour la première fois que les GSK3 régulent le facteur de transcription EB (TFEB) dans les cellules pancréatiques tumorales. En effet, l'inhibition des GSK3 entraîne la déphosphorylation de TFEB, notamment sur la Ser211, la dissociation des 14-3-3 et sa translocation nucléaire. Nos résultats suggèrent que la régulation de TFEB par les GSK3 impliquerait des Ser/Thr phosphatases et pourrait être indépendante de l'activité mTORC1. L'inhibition de l'autophagie ou la déplétion de l'expression de TFEB sensibilise les cellules pancréatiques tumorales à l'apoptose induite suite à l'inhibition des GSK3 suggérant un rôle pro-survie de l'autophagie et de TFEB dans ces cellules. Enfin, l'inhibition des GSK3 semble mener à l'inhibition de la glycolyse qui contribuerait à l'induction de l'apoptose. En résumé, nos résultats démontrent que l'inhibition des GSK3 induit à la fois des signaux pro-apoptotiques et pro-survie suggérant que l'équilibre entre ces signaux dicterait l'impact des GSK3 sur la survie des cellules pancréatiques tumorales humaines.

Mots clés : GSK3, cancer pancréatique, autophagie, TFEB, mTOR, 14-3-3, JNK

Je dédicace cette thèse à mon père Michel Marchand qui nous a quitté le 19 décembre 2015. Son encouragement inconditionnel m'a permis avec de la persévérance de me dépasser et réaliser cet accomplissement.

## Table des matières :

<b>Résumé</b>	<b>II</b>
<b>Dédicace</b>	<b>III</b>
<b>Table des matières :</b>	<b>IV</b>
<b>Liste des figures :</b>	<b>VIII</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>X</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>XI</b>
<b>I- Introduction</b>	<b>1</b>
1. LE PANCRÉAS	1
1.1 Anatomie et physiologie	1
1.2 Le cancer pancréatique	3
1.2.1 Épidémiologie et caractéristiques moléculaires	3
1.2.2 Modèles animaux de cancer pancréatique	6
1.2.3 Le cancer pancréatique chez l'humain	8
2. L'AUTOPHAGIE	10
2.1 Mécanismes moléculaires	12
2.2 Régulation de l'autophagie :	15
2.2.1 La voie de signalisation mTOR	15
2.2.1.1 Régulation de la signalisation mTOR	16
2.2.1.2 Régulation de l'autophagie par les voies de signalisation mTOR et AMPK	19
2.2.1.3 Autres régulateurs	21
2.2.2. Le stress du réticulum endoplasmique	22
2.2.3 Régulation croisée entre l'apoptose et l'autophagie	25
2.3 Rôle de l'autophagie dans la carcinogenèse	27
2.3.1 Fonctions	27
2.3.2 Implication de l'autophagie dans la carcinogenèse pancréatique	29
2.4 Potentiel thérapeutique de l'autophagie	30
3. LES GLYCOGÈNE SYNTHASE KINASES 3	31
3.1 Caractérisation et fonctions	31
3.2 Les mécanismes de régulation des GSK3	34
3.2.1 Phosphorylation et régulation des GSK3 par la voie PI3K/AKT	34

3.2.2	<i>Régulation de l'activité des GSK3 par la voie de signalisation des WNT</i>	35
3.3	<i>Implication des GSK3 dans la tumorigenèse</i>	40
3.4	<i>Rôle des GSK3 dans la régulation de l'autophagie</i>	41
4.	<b>HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS</b>	<b>43</b>
<b>II - Matériel et méthodes</b>		<b>44</b>
1.	<b>MATÉRIEL</b>	<b>44</b>
2.	<b>CULTURE CELLULAIRE</b>	<b>44</b>
2.1	<i>Lignées pancréatiques tumorales humaines</i>	45
2.2	<i>HPDE</i>	45
2.3	<i>HEK293T</i>	46
2.4	<i>Fibroblastes d'embryon de souris</i>	46
3.	<b>PRÉPARATION DES EXTRAITS PROTÉIQUES</b>	<b>46</b>
3.1	<i>Extraction des protéines totales</i>	46
3.1.1	<i>Lyse Triton</i>	46
3.1.2	<i>Lyse avec haute concentration en sel (HS)</i>	47
3.2	<i>Fractionnement subcellulaire: protéines cytosoliques et nucléaires</i>	47
4.	<b>IMMUNOBUVARDAGE</b>	<b>48</b>
5.	<b>TRANSFECTIONS TRANSITOIRES</b>	<b>51</b>
5.1	<i>Transfection de siARN</i>	51
5.2	<i>Transfection d'ADN</i>	51
5.3	<i>Vecteurs et gènes rapporteurs</i>	52
6.	<b>IMMUNOPRÉCIPITATION</b>	<b>53</b>
7.	<b>ESSAIS KINASE ET PHOSPHATASE</b>	<b>53</b>
7.1	<i>Essai phosphatase</i>	53
7.2	<i>Essai kinase GSK3</i>	54
8.	<b>IMMUNOFLUORESCENCE</b>	<b>54</b>
8.1	<i>Marquage des autophagosomes</i>	54
8.2	<i>Marquage des Lysosomes</i>	55
8.3	<i>Visualisation TFEB-EGFP</i>	56
9.	<b>PRODUCTION ET INFECTION LENTIVIRALE</b>	<b>56</b>
10.	<b>CROISSANCE EN AGAROSE MOU</b>	<b>57</b>
11.	<b>SPECTROMÉTRIE DE MASSE</b>	<b>57</b>
11.1	<i>Préparation des échantillons</i>	57
11.2	<i>Préparation et analyse des peptides</i>	58

12. MESURE DES NIVEAUX INTRACELLULAIRE D'ATP ET D'ADP -----	60
13. COLORATION À L'ACIDE PÉRIODIQUE DE SCHIFF -----	61
14. DENSITOMÉTRIE ET STATISTIQUES-----	61
<b>III- Résultats: -----</b>	<b>62</b>
1- L'INHIBITION DE L'ACTIVITÉ DES GSK3 INDUIT L'APOPTOSE ET L'AUTOPHAGIE DANS LES CELLULES ÉPITHÉLIALES PANCRÉATIQUES TUMORALES-----	62
2- LA STIMULATION DE L'AUTOPHAGIE INDUITE SUITE À L'INHIBITION DES GSK3 N'EST PAS RESTREINTE AUX CELLULES PANCRÉATIQUES TUMORALES HUMAINES -----	68
3- L'INHIBITION DE L'AUTOPHAGIE SENSIBILISE LES CELLULES PANCRÉATIQUES TUMORALES À L'APOPTOSE INDUITE PAR L'INHIBITION DES GSK3.-----	70
4- L'INHIBITION DES GSK3 INDUIT L'AUTOPHAGIE INDÉPENDAMMENT DE LA VOIE JNK- cJUN-----	73
5- L'INHIBITION DE L'ACTIVITÉ DES GSK3 MÈNE À L'INHIBITION DE LA VOIE mTOR ---	76
6- LES GSK3 ET mTOR RÉGULENT LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION EB (TFEB) ---	81
6.1- Régulation de la localisation subcellulaire de TFEB par les GSK3 et mTOR -----	82
6.2- Régulation de la phosphorylation de la protéine TFEB par les GSK3 et mTOR-----	82
6.3- Régulation de l'association de TFEB avec ses partenaires d'interaction par les GSK3 et mTOR-----	89
7- LA DÉPLÉTION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION TFEB SENSIBILISE LES CELLULES PANCRÉATIQUES TUMORALES À L'APOPTOSE INDUITE SUITE À L'INHIBITION DES GSK3.---	96
8- L'INHIBITION DE L'ACTIVITÉ DES GSK3 ET/OU LA DÉPLÉTION DE TFEB INFLUENCE LE MÉTABOLISME DES CELLULES PANCRÉATIQUES TUMORALES -----	100
<b>IV- Discussion-----</b>	<b>107</b>
1. L'INHIBITION DES GSK3 INDUIT L'APOPTOSE ET L'AUTOPHAGIE DANS LES CELLULES PANCRÉATIQUES TUMORALES HUMAINES -----	107
2. L'INHIBITION DE L'AUTOPHAGIE SENSIBILISE LES CELLULES PANCRÉATIQUES TUMORALES HUMAINES À L'APOPTOSE INDUITE PAR L'INHIBITION DES GSK3 -----	111
3. L'INHIBITION DES GSK3 INDUIT L'AUTOPHAGIE INDÉPENDAMMENT DE LA VOIE JNK- cJUN. -----	113

4. L'INHIBITION DES GSK3 MÈNE À L'INACTIVATION DE LA VOIE MTORC1 DANS LES CELLULES PANCRÉATIQUES ÉPITHÉLIALES HUMAINES -----	116
5. RÉGULATION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION TFEB PAR LES GSK3-----	118
5.1 <i>L'inhibition des GSK3 ou de mTOR induit la translocation nucléaire de TFEB</i> -----	118
5.2 <i>L'activité des GSK3 et de mTOR régule la phosphorylation de TFEB</i> -----	120
5.3 <i>L'activité des GSK3 et de mTOR influence l'association des partenaires d'interaction de TFEB</i> -----	126
6. LA DÉPLÉTION DE L'EXPRESSION DE TFEB SENSIBILISE LES CELLULES PANCRÉATIQUES TUMORALES HUMAINES À L'APOPTOSE INDUITE SUITE À L'INHIBITION DES GSK3. -----	132
7. RÉGULATION DU MÉTABOLISME DES CELLULES PANCRÉATIQUES TUMORALES HUMAINES PAR LES GSK3 : IMPLICATION DANS L'AUTOPHAGIE ET LA SURVIE CELLULAIRE. -----	136
<b>V- Conclusion -----</b>	<b>142</b>
<b>VI- Remerciements -----</b>	<b>147</b>
<b>VII- Liste des références -----</b>	<b>149</b>

## Liste des figures :

Figure 1: Anatomie du pancréas .....	2
Figure 2: Modèle de carcinogenèse pancréatique .....	4
Figure 3: L'autophagie et les complexes protéiques régulant ses principales étapes.....	11
Figure 4: Régulation de la voie de signalisation mTOR .....	17
Figure 5: Régulation de l'autophagie par le stress du réticulum endoplasmique via l'« unfolded protein response » (UPR). .....	24
Figure 6: Mécanismes de régulation de l'activité des GSK3 par les voies de l'insuline et des WNT. ....	36
Figure 7 : L'inhibition de l'activité des GSK3 réduit la croissance en indépendance d'ancrage des cellules pancréatiques tumorales.....	63
Figure 8 : L'inhibition des GSK3 augmente les niveaux de LC3B II et sa localisation aux autophagosomes dans les cellules PANC1.....	65
Figure 9: L'analyse du flux autophagique dans les cellules PANC1 suite à l'inhibition des GSK3 ..	67
Figure 10: L'inhibition des GSK3 induit l'autophagie dans les cellules non tumorales HPDE et dans des fibroblastes d'embryons de souris, MEF. ....	69
Figure 11: L'inhibition de l'autophagie sensibilise les cellules pancréatiques tumorales à l'apoptose induite par l'inhibition des GSK3. ....	72
Figure 12: L'activation de la voie JNK-cJUN n'est pas nécessaire pour l'induction de l'autophagie suite à l'inhibition des GSK3. ....	74
Figure 13: L'inhibition des GSK3 augmente l'expression de protéines impliquées dans la réponse au stress du réticulum endoplasmique. ....	75
Figure 14 : L'inhibition de l'activité des GSK3 inhibe l'axe S6K1-S6 en aval de mTORC1.....	77
Figure 15 : L'inhibition de l'activité des GSK3 réduit la phosphorylation d'ULK1 et de S6K1. ....	79
Figure 16: L'expression d'un mutant mTOR E2419K ne prévient pas l'inhibition de l'axe S6K-S6 par l'inhibition des GSK3. ....	80

Figure 17: L'inhibition des GSK3 et de mTOR favorise la localisation nucléaire de TFEB.....	83
Figure 18: L'inhibition des GSK3 et de mTOR influence le profil de migration de la protéine TFEB.....	86
Figure 19: Les GSK3 régulent la phosphorylation du facteur de transcription TFEB .....	88
Figure 20: L'inhibition de la réponse apoptotique ou autophagique n'influence pas la régulation de TFEB par les GSK3. ....	90
Figure 21 : L'inhibition des GSK3 et de mTOR module l'association de TFEB avec ses partenaires d'interaction. ....	92
Figure 22: L'impact de la déplétion de l'expression de TFEB sur le flux autophagique dans les cellules PANC1 traitées avec un inhibiteur des GSK3. ....	99
Figure 23: La déplétion de l'expression de TFEB sensibilise les cellules PANC1 à l'apoptose induite suite à l'inhibition des GSK3.....	99
Figure 24: Les GSK3 et TFEB influencent le métabolisme du glycogène et l'inhibition de la glycolyse induit l'autophagie dans les cellules PANC1. ....	102
Figure 25: L'ajout de méthyle pyruvate prévient l'apoptose induite par l'inhibition des GSK3 dans les cellules PANC1.....	104
Figure 26: L'ajout d'intermédiaires métaboliques ne prévient pas la diminution de la capacité de croissance en indépendance d'ancrage des cellules PANC1 induite par l'inhibition des GSK3.....	105

## Liste des tableaux

Tableau 1: Anticorps primaires utilisés pour les immunobuvardages -----	49
Tableau 2: Anticorps secondaires utilisés pour les immunobuvardages -----	50
Tableau 3: Transfection d'ADN -----	52
Tableau 4: Liste des vecteurs -----	52
Tableau 5: Analyse par LC-MS/MS des associations de TFEB-EGFP -----	93

## Liste des abréviations

2-DG :	<u>2-Déoxyglucose</u>
ADN:	<u>Acide désoxyribonucléique</u>
ADP:	<u>Adénosine diphosphate</u>
APC:	<u>Adenomatous polyposis coli</u>
APS:	<u>Ammonium persulfate</u>
ARN:	<u>Acide ribonucléique</u>
ATG:	<u>Autophagy-related gene</u>
ATP:	Adénosine triphosphate
BAF:	<u>Bafilomycine A1</u>
BCA:	<u>Bicinchoninic acid</u>
BPE:	<u>Bovine pituitary extract</u>
BSA:	<u>Bovine serum albumin</u>
CHIR:	<u>CHIR99021</u>
CLEAR:	<u>Coordinated lysosomal expression and regulation</u>
CMV:	<u>Cytomégalovirus</u>
CQ:	<u>Chloroquine</u>
DAPI:	<u>4',6'-diamidino-2-phénylindole</u>
DMEM:	<u>Dulbecco's modified eagle medium</u>
DMSO:	<u>Diméthylsulfoxyde</u>
DTT:	<u>Dithiothreitol</u>
DVL:	Dishevelled
EDTA:	<u>Éthylène diamine tétra acétique</u>
EGF:	<u>Epidermal growth factor</u>
EGFP:	<u>enhanced GFP</u>
EGTA:	<u>Éthylène glycol tétra acétique</u>
ERK:	<u>Extracellular signal-regulated kinase</u>
ERS:	<u>Endoplasmic reticulum stress</u>
FBS:	<u>Fetal bovine serum</u>
FNIP:	<u>Folliculin interacting protein</u>
FRAT:	<u>Frequently-rearranged in T-cells</u>
GAP:	<u>GTPase-activating protein</u>
GAPDH:	<u>Glyceraldehyde-3-phosphate déhydrogénase</u>
GDP:	<u>Guanosine diphosphate</u>
GEF:	<u>Guanine nucleotide exchange factor</u>
GFP:	<u>Green fluorescent protein</u>
GSK3:	<u>Glycogène synthase kinase-3</u>
GSKIP:	<u>GSK3-interacting protein</u>
GTP:	<u>Guanosine triphosphate</u>
HEK293T:	<u>Human embryonic kidney 293T</u>
Hepes:	<u>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</u>
HPDE:	<u>Human pancreatic ductal epithelial</u>
HRP:	<u>Horseradish peroxidase</u>
IPMN:	<u>Intraductal papillary mucinous neoplasm</u>
JNK:	<u>c-JUN N-terminal kinase</u>
KRAS:	<u>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</u>

K-SFM:	<i><u>K</u>eratinocyte-<u>s</u>erum <u>f</u>ree <u>m</u>edium</i>
LAMTOR:	<i><u>L</u>ate endosomal/lysosomal <u>a</u>daptor, <u>M</u>APK and <u>M</u>TOR activator</i>
LC-MS/MS:	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
MAPK:	<i><u>M</u>itogen-<u>a</u>ctivated <u>p</u>rotein <u>k</u>inase</i>
MCN:	<i><u>M</u>ucinous <u>c</u>ystic <u>n</u>eoplasm</i>
MEF:	<i><u>M</u>ouse <u>e</u>mbryonic <u>f</u>ibroblast</i>
MP:	<i><u>M</u>éthyle pyruvate</i>
mTOR:	<i><u>M</u>ammalian <u>t</u>arget <u>o</u>f <u>r</u>apamycin</i>
mTORC1:	<i><u>m</u>TOR complexe 1</i>
MTT:	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide
PanIN:	<i><u>P</u>ancreatic <u>i</u>ntraepithelial <u>n</u>eoplasia</i>
PARP:	<i><u>P</u>oly(<u>A</u>DP-<u>r</u>ibose) <u>p</u>olymérase</i>
PAS:	<i><u>P</u>eriodic <u>a</u>cid <u>S</u>chiff</i>
PBS:	<i><u>P</u>hosphate-<u>b</u>uffered <u>s</u>aline</i>
PDAC:	<i><u>P</u>ancreatic <u>d</u>uctal <u>a</u>deno<u>c</u>arcinoma</i>
PF:	PF4708671
PFA:	<i><u>P</u>araformaldéhyde</i>
PI3K:	<i><u>P</u>hosphoinositide <u>3</u>-<u>k</u>inase</i>
PIP:	<i><u>P</u>hosphatidylinositol-phosphate</i>
PMS:	<i><u>P</u>henazine <u>m</u>etho<u>s</u>ulfate</i>
PMSF:	<i><u>P</u>henylmethylsulfonyl fluoride</i>
PPM:	Partie par million
RAPTOR :	<i><u>R</u>egulatory-<u>a</u>ssociated <u>p</u>rotein of <u>m</u>TOR</i>
RE:	<i>Réticulum endoplasmique</i>
REDD1:	<i><u>R</u>egulated in <u>d</u>evelopment and <u>D</u>NA damage 1</i>
RHEB:	<i><u>R</u>as <u>h</u>omolog <u>e</u>nriched in <u>b</u>rain</i>
RICTOR:	<i><u>R</u>apamycin-<u>i</u>nsensitive <u>c</u>ompanion of <u>m</u>TOR</i>
ROS:	<i><u>R</u>eactive <u>o</u>xygen <u>s</u>pecies</i>
RPMI:	<i><u>R</u>oswell park <u>m</u>emorial <u>i</u>nstitute</i>
RSK:	<i>90kDa <u>r</u>ibosomal <u>S</u>6 <u>k</u>inase</i>
RTK:	<i>Récepteur à activité tyrosine <u>k</u>inase</i>
S6:	<i>protéine ribosomale <u>S</u>6</i>
S6K:	<i>protéine ribosomale <u>S</u>6 <u>k</u>inase</i>
SB:	<i>SB216763</i>
SDS-PAGE:	<i><u>S</u>odium <u>d</u>odecyl <u>s</u>ulfate polyacrylamide gel <u>e</u>lectrophoresis</i>
shARN:	<i><u>S</u>mall <u>h</u>airpin <u>A</u>RN</i>
siARN:	<i><u>S</u>mall <u>i</u>nterfering <u>A</u>RN</i>
SP:	<i>SP600125</i>
TBS-T:	<i><u>T</u>ris-<u>b</u>uffered <u>s</u>aline – <u>T</u>ween</i>
TCA:	<i><u>T</u>richloro<u>a</u>cetic acid</i>
TGFβ:	<i><u>T</u>ransforming <u>g</u>rowth <u>f</u>actor <u>β</u></i>
TSC:	<i><u>T</u>uberous <u>s</u>clerosis <u>c</u>omplex</i>
XBP1:	<i><u>X</u>-box-<u>b</u>inding <u>p</u>rotein 1</i>
XTT:	<i>2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt</i>

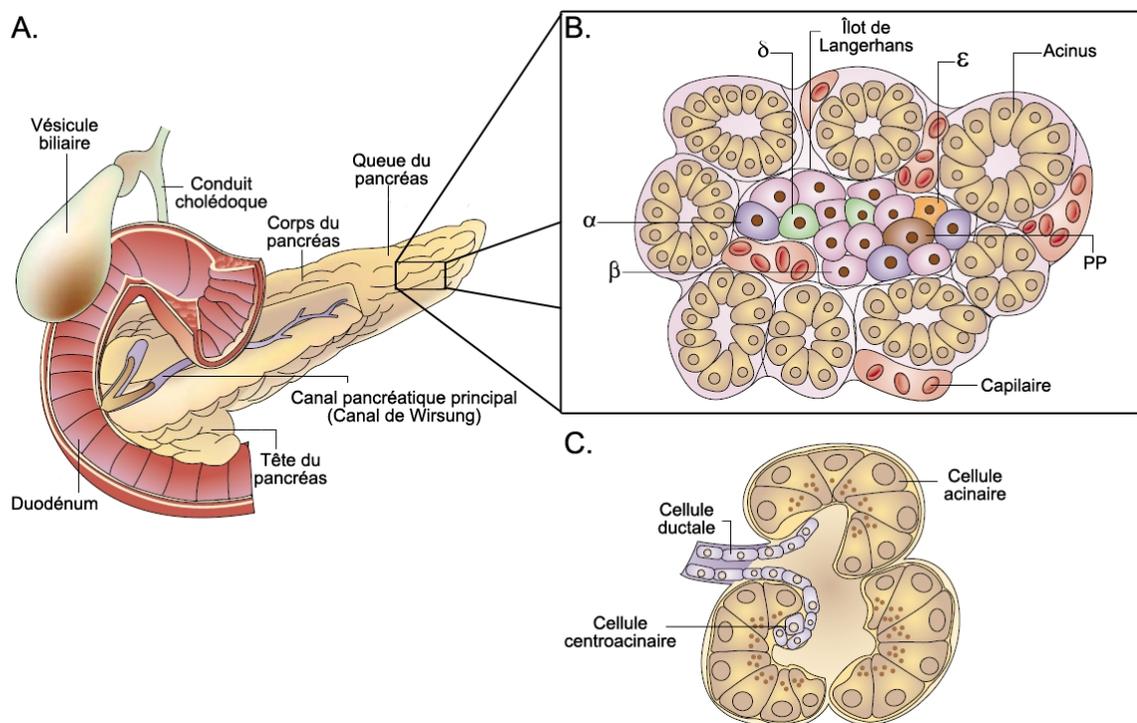
# I- Introduction

## 1. Le Pancréas

### 1.1 Anatomie et physiologie

Le pancréas se développe au niveau du tube digestif primitif dans une région de l'endoderme antérieur prédestinée à se différencier en duodénum lors de l'embryogenèse (F. C. Pan & Wright, 2011; Slack, 1995). Cet organe est issu de la fusion de deux bourgeonnements, dorsal et ventral, de l'endoderme antérieur. Le pancréas est un organe glandulaire mixte du système digestif assurant à la fois des fonctions exocrines et endocrines. Les composantes exocrine et endocrine représentent environ 95% et 1-2% respectivement de la masse du tissu pancréatique. Premièrement, la fonction exocrine du pancréas est responsable de la production, de la sécrétion et du déversement du suc pancréatique dans le duodénum, via le canal pancréatique principal (Wirsung) (Figure 1A). La synthèse des composantes du suc pancréatique implique trois types cellulaires, les cellules acinaires, centroacinaires et ductales (Figure 1C). Les cellules acinaires synthétisent et sécrètent les enzymes pancréatiques nécessaires pour la digestion des nutriments. Ces cellules forment des acini regroupés en lobules qui sont reliés à un réseau de canaux composés des cellules ductales. Les cellules ductales, ainsi que les cellules centroacinaires, sécrètent des composantes non enzymatiques du suc pancréatique telles que du bicarbonate, de l'eau et des sels. Cette sécrétion favorise le déversement des enzymes pancréatiques, ainsi que leur activité optimale en neutralisant l'acidité du suc gastrique au niveau du duodénum.

Les îlots de Langerhans assurent la fonction endocrine du pancréas via la production et la libération d'hormones impliquées dans le contrôle de la glycémie. Ces îlots regroupent cinq principaux types de cellules endocrines, les cellules  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  et PP, à proximité d'une forte vascularisation (Figure 1B). Les sécrétions de l'insuline par les cellules  $\beta$  et du glucagon par les cellules  $\alpha$  sont respectivement



### Figure 1: Anatomie du pancréas

**A)** Le pancréas se sépare en trois régions : la tête située adjacente au duodénum qui est suivie du corps et de la queue. Le suc pancréatique se déverse dans le duodénum à partir du canal pancréatique principal (canal de Wirsung) au niveau de la tête du pancréas. Le pancréas assure des fonctions endocrine et exocrine.

**B)** L'îlot de Langerhans représente la composante endocrine du pancréas. Un certain nombre d'îlots sont disséminés au sein du tissu exocrine. Ces îlots sont des agrégats de cellules composés de 4 types cellulaires sécrétrices. Chez la souris, les cellules  $\beta$  (insuline) sont localisées au centre et les cellules  $\alpha$  (glucagon),  $\delta$  (somatostatine),  $\epsilon$  (ghréline) et PP (polypeptide pancréatique) en périphérie. L'architecture des îlots de Langerhans diffère légèrement chez l'humain en présentant une localisation dispersé des cellules  $\beta$  et  $\alpha$ .

**C)** La fonction exocrine est assurée grâce à des acini reliés à un réseau de canaux. Les cellules acinaires formant l'acinus, ainsi que les cellules centroacinaires et ductales sont responsables de la production du suc pancréatique. Le suc pancréatique est composé d'enzymes pancréatiques synthétisées et sécrétées par les cellules acinaires ainsi que du bicarbonate, de l'eau et des sels libérés par les cellules centroacinaires et ductales. Adapté de Bardeesy & DePinho, 2002

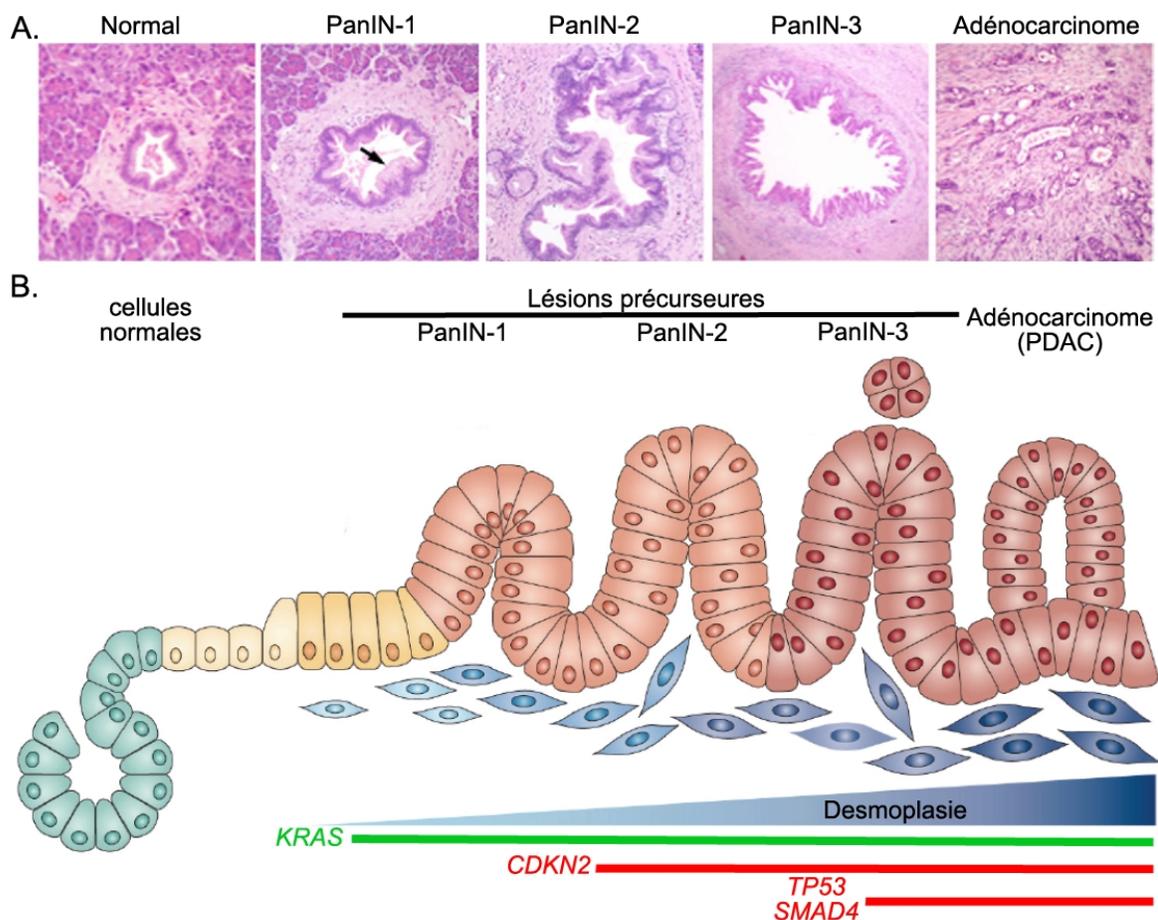
hypoglycémiant et hyperglycémiant. De plus, la somatostatine, la ghréline et le polypeptide pancréatique synthétisés par les cellules  $\delta$ ,  $\epsilon$  et PP respectivement sont impliqués dans la régulation des sécrétions pancréatiques.

## 1.2 Le cancer pancréatique

### 1.2.1 Épidémiologie et caractéristiques moléculaires

Les différentes tumeurs pancréatiques, dont les cystadénocarcinomes, les carcinomes à cellules acinaires et l'adénocarcinome ductale, sont majoritairement retrouvées au niveau de la composante exocrine du pancréas, alors que les tumeurs d'origine endocrine constituent que 5% des tumeurs pancréatiques. Au Canada, 4 700 nouveaux cas de cancer pancréatique et 4 400 décès associés à ce cancer sont estimés pour l'année 2014 ce qui le place à la 4<sup>e</sup> cause de décès par cancer. Le taux de survie des patients atteints d'un cancer pancréatique 5 ans suivant le diagnostic est de seulement 5%. Le diagnostic de ce cancer est généralement tardif; ainsi sa détection à un stade avancé où le carcinome s'est étendu vers d'autres organes est fréquente. Le seul traitement curatif possible à ce jour, la résection chirurgicale de la tumeur, n'est possible que chez 15-20% des patients expliquant en partie le faible taux de survie des patients atteints. Afin d'accélérer et d'améliorer le diagnostic ainsi que le traitement du cancer pancréatique, plusieurs études ont été entreprises pour identifier les caractéristiques moléculaires des tumeurs pancréatiques. Ces études s'intéressent principalement à l'adénocarcinome pancréatique ductal (PDAC) qui représente plus de 90% des cas de cancer pancréatique.

Les altérations génétiques les plus fréquentes associées aux adénocarcinomes pancréatiques ductaux sont celles de l'oncogène *KRAS*, ainsi que des gènes suppresseurs de tumeur *CDKN2A*, *TP53* et *SMAD4* (Figure 2) (Hezel et al., 2006; Koorstra et al., 2008). Tout d'abord, une mutation de l'oncogène *KRAS* est retrouvée dans plus de 95% des adénocarcinomes pancréatiques et confère entre autres un avantage prolifératif (Hruban et al., 1993).



**Figure 2: Modèle de carcinogénèse pancréatique**

**A)** Histologie des différents stades de la progression des lésions précurseurs PanIN vers l'adénocarcinome pancréatique. Adapté de MacGregor-Das & Iacobuzio-Donahue, 2013 **B)** Schématisation du modèle de progression des lésions PanIN en adénocarcinome et les principales caractéristiques moléculaires associées à celui-ci. Adapté de Rui Kang & Tang, 2012

Quant aux altérations des suppresseurs de tumeur, la délétion homozygote, la mutation intragénique ou l'hyperméthylation de *CDKN2A* sont observées dans environ 90% des cancers pancréatiques (Caldas et al., 1994; Schutte et al., 1997). Toutes ces modifications conduisent à la perte de fonction de la protéine P16<sup>INK4A</sup> bloquant les signaux d'arrêt de prolifération ce qui favorise la transition G1-S du cycle cellulaire. Le suppresseur de tumeur *TP53*, considéré comme le gardien du génome, est muté dans 50-75% des PDAC (Redston et al., 1994). Un rôle important de P53 est le contrôle de l'intégrité génétique particulièrement lors de stress cytotoxiques, tels les dommages à l'ADN. D'une part, P53 permet la réparation de l'ADN en induisant l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21 et l'arrêt de la prolifération, tandis qu'il induit la mort cellulaire programmée (apoptose) lors de dommages excessifs. Ainsi, l'altération de *TP53* contribuerait à la tumorigenèse en favorisant la prolifération, la survie cellulaire et une instabilité génétique (Kirsch & Kastan, 1998). La mutation ou la délétion homozygote de *SMAD4* dans 55% des carcinomes pancréatiques sont responsables d'une altération des signaux anti-prolifératifs de la voie de signalisation du TGF $\beta$  (Hahn et al., 1996; Wilentz et al., 2000). Enfin, les études des adénocarcinomes pancréatiques suggèrent que seulement 10% des cas de cancer pancréatique seraient dus à des prédispositions héréditaires des patients.

La néoplasie intraépithéliale pancréatique (PanIN) est une lésion précurseur observée au niveau du tissu pancréatique qui présente certaines caractéristiques de l'épithélium ductal pancréatique. Celle-ci peut progresser vers l'adénocarcinome invasif et elle représente la lésion la plus fréquemment observée. Les lésions PanIN de grade 1 sont caractérisées par un allongement cellulaire et peuvent progresser vers un état de dysplasie plus avancé où des noyaux atypiques et une perte de polarité sont observés (PanIN-2 et 3) (Figure 2A). L'étude de la progression des lésions PanIN vers l'adénocarcinome a permis d'associer les altérations génétiques observées aux différents stades (Figure 2B). D'abord, la mutation de l'oncogène *KRAS* est parmi les premiers évènements observés dès les lésions PanIN-1. L'altération de *CDKN2A* est ensuite rapidement

observée, tandis que les mutations des gènes suppresseur de tumeur *TP53* et *SMAD4* surviennent plus tardivement (PanIN-3). Comme dans plusieurs autres organes, la tumorigenèse pancréatique résulte d'une séquence d'évènements, la mutation de *KRAS* est un évènement initiateur alors que la progression nécessiterait d'autres altérations. Enfin, il existe deux autres types de lésions pancréatiques, la tumeur kystique mucineuse (MCN) et la tumeur intracanaulaire papillaire mucineuse (IPMN), qui peuvent également progresser vers l'adénocarcinome. Malgré qu'elles présentent des différences histologiques et génétiques, ces lésions possèdent plusieurs des altérations observées dans les PanIN (*KRAS*, *TP53* et *SMAD4*) suggérant que la progression des différentes lésions vers l'adénocarcinome pourrait impliquer des mécanismes communs (MacGregor-Das & Iacobuzio-Donahue, 2013).

### 1.2.2 Modèles animaux de cancer pancréatique

L'utilisation du promoteur de l'élastase, un gène spécifiquement exprimé dans les cellules acinaires, a permis l'établissement des premiers modèles murins de cancer pancréatique dans les années 80. En effet, l'expression de l'antigène T de SV40 (Ornitz et al., 1987) ou de l'oncogène *Hras* (Quaife et al., 1987) sous le contrôle du promoteur de l'élastase entraîne le développement de carcinomes de type acineux chez la souris. Plus récemment, l'expression du mutant *Kras*<sup>G12D</sup>, fréquemment observé dans le cancer pancréatique, spécifiquement dans les cellules acinaires à l'aide du promoteur de *Mist1* a également été rapportée comme favorisant le développement de carcinomes de type acineux (Tuveson et al., 2006).

Par contre, ces modèles d'expression de transgènes spécifiquement au niveau des cellules acinaires chez la souris n'induisent pas la formation d'adénocarcinome pancréatique (PDAC) qui représente plus de 90% des cancers pancréatiques. Les promoteurs *Pdx-1* ou *p48* (*Ptf1A*), spécifiques aux cellules précurseurs pancréatiques ont permis la génération de souris transgéniques

développant des adénocarcinomes ductaux. D'abord, les souris *Pdx-1-Cre;LoxP-Stop-LoxP(LSL)-Kras<sup>G12D</sup>* (aussi nommées KC) ou *p48-Cre;LSL-Kras<sup>G12D</sup>* expriment le mutant de l'oncogène *Kras* le plus fréquemment observé dans le cancer pancréatique suite à l'excision de la séquence « Stop » par la recombinaison des sites LoxP d'un allèle LSL-*Kras<sup>G12D</sup>* à l'aide de la Cre recombinase sous le contrôle des promoteurs *Pdx-1* ou *p48*. Ces souris développent toutes des lésions PanIN qui progressent, en fonction de l'âge, vers les stades plus avancés, toutefois la progression de celles-ci en adénocarcinome invasif est observée chez seulement 10% des animaux âgés d'un an (Hingorani et al., 2003). Ces résultats suggèrent que la mutation de *Kras* est un évènement précoce de la carcinogenèse pancréatique et que d'autres altérations sont nécessaires pour la progression des lésions PanIN en adénocarcinomes. À cet égard, le croisement des souris *Pdx-1-Cre;LSL-Kras<sup>G12D</sup>* (KC) avec les souris *Cdkn2A<sup>lox/lox</sup>* (Aguirre et al., 2003) ou LSL-*Trp53<sup>R172H/+</sup>* (Hingorani et al., 2005) accélère la progression tumorale, les adénocarcinomes pancréatiques étant respectivement observés dès l'âge de 8 ou 10 semaines. Ces résultats suggèrent que la délétion de *Cdkn2A* ou l'expression du mutant *Trp53<sup>R172H</sup>*, spécifiquement au niveau des cellules pancréatiques précurseurs, favorisent la progression des lésions PanIN en adénocarcinomes. Les souris *Pdx-1-Cre;Cdkn2A<sup>lox/lox</sup>* ne développent pas d'adénocarcinomes pancréatiques suggérant que la perte d'expression de P16<sup>INK4A</sup> n'est pas suffisante pour induire la carcinogenèse pancréatique. Ces modèles possèdent toutefois une limite puisque les différents transgènes sont exprimés à l'état embryonnaire et conjointement, ce qui ne représente pas la progression observée chez les patients (Guerra & Barbacid, 2013).

Récemment, une équipe a généré les souris *Elas-tTA/Tet-Off-Cre;LSL-Kras<sup>G12Vgeo</sup>* exprimant une Cre recombinase inductible à la tétracycline (« Tet-Off ») sous le promoteur de l'élastase qui contrôle l'expression d'un allèle LSL-*Kras<sup>G12V</sup>* (Guerra et al., 2007). Ces animaux ont été maintenus en présence de doxycycline jusqu'à l'âge de 2 mois, temps où l'expression de l'oncogène *Kras<sup>G12V</sup>*

a été induite par le retrait de la doxycycline. L'induction de l'expression de *Kras*<sup>G12V</sup> à l'âge adulte chez ces souris induit la formation de lésions PanIN et d'adénocarcinomes seulement lorsque combiné à l'induction d'une pancréatite (inflammation). Des résultats similaires ont été obtenus à l'aide des souris *p48-Cre;R26-rtTa-IRES-EGFP;Tet-On-Kras*<sup>G12D</sup>, un autre modèle inducible de l'expression de l'oncogène *Kras*<sup>G12D</sup> spécifiquement au niveau des cellules épithéliales pancréatiques (Collins et al., 2012). Les auteurs ont observé que l'induction d'une pancréatite favorise la progression tumorale induite par l'expression de *Kras*<sup>G12D</sup> à l'âge adulte (4 à 6 semaines). Il a été suggéré que les dommages induits au niveau du pancréas suite à une pancréatite pourraient sensibiliser les cellules épithéliales pancréatiques à leur transformation induite par l'oncogène *Kras*. Ces résultats suggèrent que le microenvironnement, notamment l'inflammation, contribue à la progression de la carcinogenèse pancréatique induite par un *Kras* oncogénique. De façon intéressante, Collins M.A. et collaborateurs ont observé que l'inactivation de l'expression de *Kras*<sup>G12D</sup> entraîne la régression des lésions PanIN et des adénocarcinomes formés, ainsi que le remodelage du stroma des tumeurs (Collins et al., 2012). L'oncogène *Kras*<sup>G12D</sup> est donc requis autant pour l'initiation que le maintien du cancer pancréatique.

### 1.2.3 Le cancer pancréatique chez l'humain

Malgré la caractérisation et la reconstitution d'un modèle de tumorigenèse pancréatique, le taux de survie de ce cancer n'a pas été amélioré depuis les 30 dernières années. Jusqu'à présent le seul traitement curatif du cancer pancréatique est la résection de la tumeur, possible chez seulement 15-20% des patients. Depuis les années 90, la gemcitabine un analogue de la déoxycytidine ou le 5-Fluorouracil, deux agents antimétabolites, sont utilisés comme traitements standards du cancer pancréatique, toutefois leur efficacité est limitée (Valsecchi et al., 2014). Afin d'améliorer l'efficacité de ces traitements, différentes combinaisons avec d'autres agents chimiothérapeutiques ont été testées. Une étude clinique de phase III a démontré pour la première fois une augmentation significative de

l'efficacité de la gemcitabine par la combinaison avec l'Erlotinib un inhibiteur d'EGFR (Moore et al., 2007). La gemcitabine seule demeure le traitement standard du cancer pancréatique due au faible bénéfice de cette combinaison, augmentant la survie moyenne de 5,91 à 6,24 mois. Récemment, les combinaisons de la gemcitabine avec le nab-Paclitaxel (Von Hoff et al., 2013) ou le FOLFIRINOX (Conroy et al., 2011) comparativement à la gemcitabine seule ont amélioré la survie moyenne des patients, passant respectivement de 6,7 à 8,5 ou de 6,8 à 11,1 mois. Il est à noter que ces combinaisons démontrent une plus grande toxicité et n'offrent qu'un prolongement de la survie des patients, donc l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques demeure primordiale.

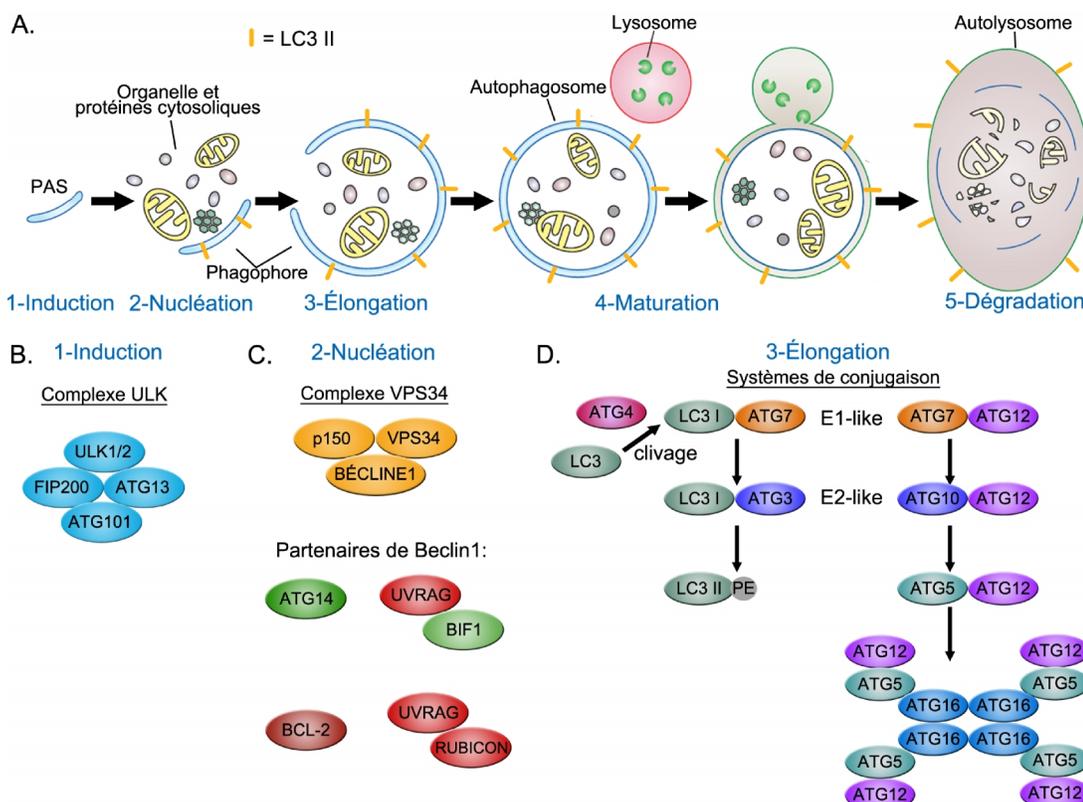
Afin d'identifier de nouvelles caractéristiques génétiques du cancer pancréatique, une équipe a récemment entrepris le séquençage de 24 adénocarcinomes pancréatiques (Jones et al., 2008). L'analyse a identifié en moyenne 63 altérations génétiques par adénocarcinome dont plusieurs distinctes selon les tumeurs. Celles-ci ont été associées à 12 voies de signalisation ou processus cellulaires : les voies de signalisation du TGF $\beta$ , des JNK, des intégrines, des Hedgehog, de KRAS, des petites GTPases et de WNT/Notch, ainsi qu'aux processus d'invasion, d'apoptose, du contrôle des dommages à l'ADN, du contrôle de la transition G1-S et de l'adhésion cellulaire. Ces résultats appuient l'hétérogénéité des tumeurs pancréatiques suggérant qu'il serait bénéfique de cibler les voies identifiées plutôt qu'une altération génétique spécifique. D'autre part, le séquençage de différentes populations de cellules normales ou issues de la tumeur primaire ou des métastases a été réalisé sur 7 patients atteints du cancer pancréatique (Yachida et al., 2010). Les auteurs ont analysé l'évolution des différentes altérations génétiques retrouvées au niveau de ces populations de cellules. À l'aide d'un modèle mathématique, ils ont estimé chez l'humain la durée entre l'initiation et l'apparition de la cellule parentale de la tumeur primaire (11,7 années), puis vers la cellule métastatique (6,8 années) et enfin jusqu'à la mort (2,7 années). Le dépistage tardif de la maladie laissait jusqu'alors croire que le cancer pancréatique se développait très rapidement. Or, cette étude suggère qu'une

intervention plus rapide pourrait être possible à condition d'identifier des biomarqueurs précoces et d'acquérir une meilleure compréhension des mécanismes de régulation impliqués dans la progression et croissance tumorale pancréatique.

## 2. L'autophagie

L'autophagie est un processus de dégradation du contenu intracellulaire ayant été conservé au cours de l'évolution. Ce processus cellulaire permet la dégradation et le recyclage de contenu cytoplasmique, particulièrement les protéines à longue demi-vie et les organites endommagés. Différents types d'autophagie ont été décrits, soit la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie associée aux protéines chaperonnes (Ravikumar et al., 2009). D'abord, la microautophagie consiste à l'incorporation et la dégradation non-sélective de composantes du cytosol au niveau des lysosomes via invagination. Contrairement à la microautophagie, l'autophagie associée aux protéines chaperonnes permettrait le transport sélectif de contenu cytosolique vers l'intérieur des lysosomes. Ce type d'autophagie impliquerait la reconnaissance d'un motif par les protéines chaperonnes et des récepteurs à la surface des lysosomes, possiblement la protéine LAMP2A. Enfin, la macroautophagie est caractérisée par la formation de vésicules à membrane phospholipidique double, autophagosomes, qui séquestrent du contenu cytosolique. Ces autophagosomes fusionneront ensuite avec les lysosomes ce qui permettra la dégradation et le recyclage de leur contenu. La section suivante s'attardera à la macroautophagie et dorénavant le terme « autophagie » désignera ce processus au cours de cet ouvrage.

Le processus d'autophagie comporte plusieurs étapes : 1- l'induction, 2- la nucléation, 3- l'élongation des phagophores/autophagosomes, 4- la maturation des autophagosomes et leur fusion avec les lysosomes et 5- la dégradation du contenu des autolysosomes (Figure 3A). L'induction de la formation des autophagosomes est caractérisée par la formation d'un site d'assemblage d'une structure de



**Figure 3: L'autophagie et les complexes protéiques régulant ses principales étapes.** **A)** L'autophagie débute par l'induction (1) d'un site de pré-assemblage (PAS) qui sera le lieu de formation des phagophores qui deviendront les autophagosomes. Ces structures à membrane phospholipidique double recourbée, les phagophores, sont formés par nucléation (2). L'élongation (3) des phagophores entraîne la séquestration du contenu cellulaire à l'intérieur des autophagosomes nouvellement formés. La maturation et la fusion de ces autophagosomes avec des lysosomes permettent la dégradation (5) et le recyclage de leur contenu. Adapté de Xie & Klionsky, 2007. **B)** L'induction (1) de l'autophagie est régulée par le complexe ULK composé des protéines ULK1/2, ATG13, FIP200 et ATG101. Le rôle de ce complexe demeure à être clarifié, toutefois il régulerait la localisation de la protéine ATG9 au site PAS ainsi que l'activité du complexe VPS34. **C)** Le complexe VPS34 est nécessaire pour la nucléation (2) des phagophores et les protéines VPS34, p150 et BÉCLINE 1 composent son noyau. Plusieurs protéines peuvent s'associer à BÉCLINE 1 et réguler l'activité du complexe VPS34 positivement (ATG14; UVRAG-BIF1) ou négativement (BCL-2; UVRAG-RUBICON). **D)** Deux systèmes de conjugaison similaires à l'ubiquitine régulent l'élongation (3) des phagophores. Brièvement, ils permettent la conjugaison de la protéine LC3 à un phosphatidyléthanolamine (PE) ainsi que de la protéine ATG12 à ATG5. Dans ces systèmes, la protéine ATG7 est équivalente à une E1, alors qu'ATG3 et ATG10 sont similaires à une protéine E2. La protéine ATG12 conjuguée à ATG5 forme un complexe multimérique avec la protéine ATG16. Enfin, le clivage de LC3 par ATG4 est requis pour sa conjugaison et la forme conjuguée au PE, LC3 II, sert de marqueur d'autophagie puisqu'elle est localisée à la membrane des vésicules autophagiques (**A**).

pré-autophagosome (PAS) aussi nommée « phagophore ». La nucléation et l'élongation du phagophore, qui consiste en une structure à membrane phospholipidique double recourbée, permettront la formation de la vésicule autophagique nommée autophagosome. La source lipidique composant la membrane des phagophores/autophagosomes demeure inconnue, toutefois les membranes du réticulum endoplasmique, du réseau trans-golgi, des mitochondries ainsi que la membrane plasmique ont été suggérées comme sources possibles. La maturation du phagophore en autophagosome entraîne la séquestration de contenu cytosolique à l'intérieur de ces vésicules. Par la suite, la fusion de ces autophagosomes avec les lysosomes, formant des autolysosomes, mène à l'acidification de ces vésicules ce qui permet la dégradation et le recyclage du contenu. L'autophagie permet le recyclage d'acides aminés, de lipides, de nucléotides et de glucides ce qui favorise la survie cellulaire particulièrement lors d'un stress métabolique (Rabinowitz & White, 2010). De plus, l'autophagie peut aussi protéger les cellules contre le stress oxydatif via l'élimination des mitochondries endommagées.

## 2.1 Mécanismes moléculaires

L'étude de l'autophagie chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* a mené à l'identification d'une trentaine de gènes *ATG* (« Autophagy related ») impliqués dans la régulation de ce processus (Klionsky et al., 2003; Xie & Klionsky, 2007). Jusqu'à présent, des orthologues pour plus de la moitié de ces gènes *ATG* ont été décrits chez les mammifères. Il existe un ensemble de gènes *ATG* nécessaires pour la formation des autophagosomes et communs à tous les sous-types d'autophagie (Xie & Klionsky, 2007). Ces gènes forment le noyau de la machinerie moléculaire de l'autophagie. Lors de l'induction de l'autophagie, la protéine transmembranaire *ATG9* est retrouvée localisée au niveau des phagophores. L'initiation de l'autophagie semble impliquer la translocation de *ATG9* entre le site d'assemblage des phagophores et un site périphérique, correspondant chez les mammifères au réseau trans-Golgi et les endosomes tardifs (Young et al., 2006).

Toutefois, les mécanismes régulant la localisation d'ATG9 et son rôle précis dans l'induction de l'autophagie demeurent à être identifiés.

De plus, un complexe protéique composé des protéines ULK1/2 (ATG1), ATG13, ATG101 et FIP200 est requis pour l'induction de l'autophagie (Figure 3B). Les protéines « unc-51-like kinase » (ULK1 et ULK2), l'orthologue d'ATG1 chez les mammifères, sont des sérine/thréonine kinases, alors qu'ATG13, ATG101 et FIP200 régulent l'activité du complexe ULK. Chez les mammifères, la « 200-kDa focal adhesion kinase family-interacting protein » (FIP200) semble l'équivalent d'ATG17, alors qu'ATG101 a été identifié comme un nouveau gène *ATG* non conservé chez *Saccharomyces cerevisiae* (Hosokawa et al., 2009; Mercer et al., 2009). L'association d'ATG101 avec la protéine ATG13 protège cette dernière de la dégradation ce qui stabilise son expression. Les phosphorylations observées au niveau du complexe ULK régulent principalement son activité, puisque chez les mammifères le complexe ULK est particulièrement stable. L'activité du complexe ULK est régulée par la phosphorylation d'ULK, d'ATG13 et de FIP200 et sera discutée à la section 2.2.1.1. La fonction précise de l'activation du complexe ULK dans l'induction de l'autophagie demeure à être clarifiée. Le complexe ULK favoriserait la translocation d'ATG9 vers le phagophore, mais peut aussi phosphoryler BÉCLINE 1 sur la sérine 14 ce qui active le complexe VPS34 qui régule la nucléation des phagophores (Russell et al., 2013; Weerasekara et al., 2014; Young et al., 2006).

Ce complexe VPS34 (PI3K de classe III) est requis pour la nucléation des phagophores, toutefois son rôle précis demeure inconnu. Les protéines VPS34, p150 (VPS15), et BÉCLINE 1 (ATG6) forment le noyau de ce complexe, alors que de nombreuses protéines s'associent avec BÉCLINE 1 régulant l'activité du complexe VPS34 (R Kang et al., 2011) (Figure 3C). D'abord, les associations d'ATG14L et de RUBICON avec BÉCLINE 1 sont mutuellement exclusives. L'expression d'ATG14L est requise pour l'autophagie, alors que l'association de RUBICON à BÉCLINE 1 via la protéine « UV radiation resistance-associated

gene » (UVRAG) régule négativement l'autophagie (Matsunaga et al., 2009). À l'inverse, l'interaction de la protéine « Endophilin B1/Bax-interacting factor 1 » (BIF1) avec UVRAG au niveau du complexe VPS34 favorise l'induction de l'autophagie (Takahashi et al., 2007). La présence d'un domaine BH3 de la protéine BÉCLINE 1 permet l'interaction de cette dernière avec les homologues anti-apoptotiques, BCL-2 et BCL-XL, ce qui entraîne sa dissociation du complexe VPS34 et l'inhibition de l'autophagie (Sinha & B, 2009). Bref, les différentes interactions de la protéine BÉCLINE 1 régulent l'activité du complexe VPS34 et selon les protéines impliquées peuvent soit induire ou inhiber l'autophagie.

D'autre part, l'élongation des phagophores requiert deux systèmes de conjugaison similaires à celui de l'ubiquitine. Les protéines LC3 (ATG8) et ATG12 possèdent une structure similaire à celle de l'ubiquitine et elles sont conjuguées respectivement avec un phosphatidyléthanolamine (PE) ou la protéine ATG5 (Figure 3D). La protéine LC3 doit d'abord subir un clivage protéolytique par la cystéine protéase ATG4 ce qui génère LC3 I. Ce clivage en C-terminal de LC3 expose la glycine nécessaire à la conjugaison du PE. La protéine ATG7 est responsable de l'activité équivalente à celle d'une protéine activatrice E1 pour les protéines LC3 I et ATG12. Ensuite, les protéines similaires aux protéines E2 sont ATG3 pour LC3 et ATG10 pour ATG12. La liaison de la glycine en c-terminal d'ATG12 s'effectue de façon covalente avec une lysine d'ATG5. La protéine ATG5 conjuguée se lie également à la protéine ATG16L formant un complexe multimérique avec ATG12. Les complexes ATG12-ATG5-ATG16L se retrouvent localisés au niveau de la membrane extérieure des phagophores et ils sont relâchés dans le cytosol une fois l'autophagosome formé. Ces complexes possèderaient une activité équivalente à une enzyme E3 et seraient impliqués dans la conjugaison de LC3 I au PE (Hanada et al., 2007; Xie & Klionsky, 2007). Enfin, la protéine LC3 conjuguée au PE (LC3 II) sert de marqueur d'autophagie puisqu'elle est localisée au niveau des membranes des phagophores, des autophagosomes ainsi que des autolysosomes (Figure 3A).

Plusieurs des autres protéines ATG seraient également impliquées dans la formation des autophagosomes de façon plus spécifique selon le contexte ou le type d'autophagie (Xie & Klionsky, 2007). Quelques protéines ont été identifiées comme récepteur pour différents cargos ciblés pour la dégradation sélective par l'autophagie. La protéine p62/SQSTM1 reconnaît plusieurs protéines ou agrégats de protéines polyubiquitinylées et les cible vers les autophagosomes en formation. Le récepteur de cargo p62/SQSTM1 semble commun à plusieurs voies de dégradation sélective par autophagie, alors que l'implication des protéines NIX (mitophagie), NBR1 (agrégation et pexophagie), NPD52 et OPTN (xénophagie) est plus spécifique (Stolz et al., 2014). L'étude des voies d'autophagie sélective permettra de définir les différents mécanismes moléculaires impliqués afin de mieux comprendre la régulation et le rôle de ces processus.

## 2.2 Régulation de l'autophagie :

### 2.2.1 La voie de signalisation mTOR

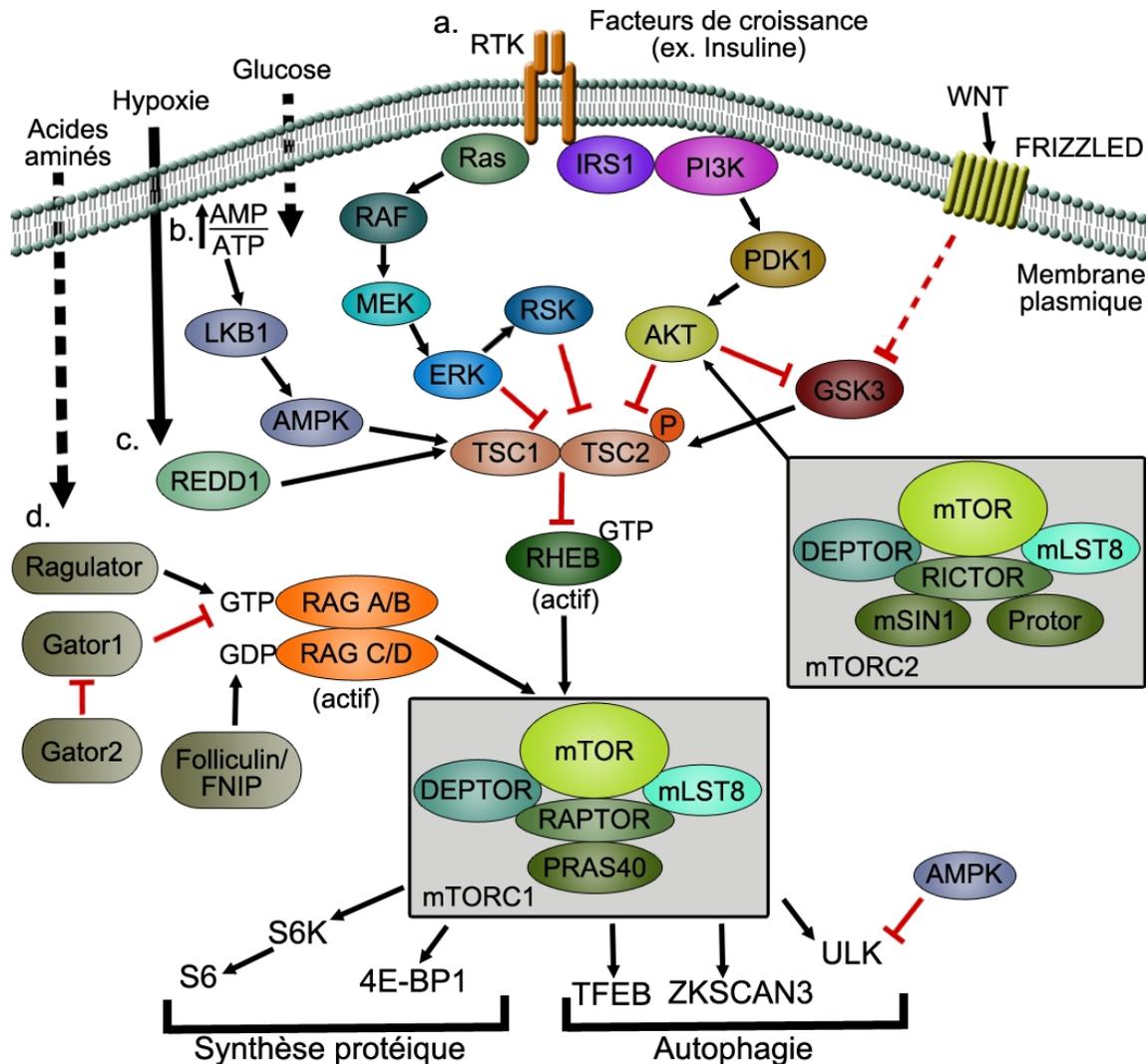
La voie de signalisation « mammalian Target Of Rapamycin » (mTOR) a été décrite pour jouer un rôle central dans le contrôle de l'homéostasie du métabolisme et la croissance cellulaire en régulant la prolifération, la survie cellulaire, la synthèse protéique, le métabolisme et l'autophagie. La sérine/thréonine kinase mTOR est la sous-unité catalytique de 2 complexes, mTORC1 et mTORC2 (Figure 4) (Zoncu et al., 2011). Les protéines « regulatory-associated protein of mTOR » (RAPTOR) et « rapamycin-insensitive companion of mTOR » (RICTOR) servent d'échafaudage pour la formation des complexes mTORC1 et mTORC2 respectivement. La protéine PRAS40, unique au complexe mTORC1, se lie à RAPTOR et agit comme un régulateur négatif de l'activité de ce complexe. Au niveau du complexe mTORC2, les protéines PROTOR et mSIN1 se lient à RICTOR. L'association de PROTOR favoriserait l'assemblage du complexe, tandis que mSIN1 permettrait la localisation de mTORC2 au niveau des membranes. Enfin, deux autres protéines, DEPTOR et mLST8, sont communes aux deux complexes et se lient à mTOR agissant respectivement comme

régulateur négatif et positif. La phosphorylation de DEPTOR par la « Casein kinase 1 » (CK1 $\alpha$ ) et par mTOR entraîne sa dégradation protéasomale via un mécanisme dépendant de la  $\beta$ TrCP ce qui amplifie l'activation de la signalisation mTOR (Duan et al., 2011; Gao et al., 2011).

### 2.2.1.1 Régulation de la signalisation mTOR

La voie de signalisation mTOR intègre un grand nombre de signaux incluant ceux médiés par les facteurs de croissance, ainsi que les stress associés à une privation en acides aminés, en oxygène ou d'énergie. Le complexe « Tuberous sclerosis complex » formé des protéines TSC1 et TSC2 est important pour la régulation de l'activité du complexe mTORC1 en réponse à plusieurs signaux. Le complexe TSC1/2, via l'activité GTPase activatrice de TSC2, convertit la forme active de la protéine RHEB couplée au GTP en sa forme inactive couplée au GDP (Figure 4). La protéine RHEB-GTP interagit avec la protéine mTOR activant le complexe mTORC1, toutefois le mécanisme précis demeure à être élucidé (Long et al., 2005). Il a été suggéré que l'interaction de RHEB avec mTOR pourrait favoriser l'association de RAPTOR avec ses substrats (T. Sato et al., 2009). Le complexe TSC1/2 est donc un régulateur négatif de l'activité du complexe mTORC1.

L'activation de la voie mTOR en réponse aux facteurs de croissance s'effectue via l'activation de récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), qui activent les voies de signalisation PI3K/AKT et RAS/MAPK (Figure 4a). La voie de signalisation RAS entraîne l'activation de la voie MAPK, RAF-MEK-ERK, qui peut aussi mener à la phosphorylation et l'activation de RSK par ERK. Les kinases AKT, ERK et RSK peuvent phosphoryler plusieurs résidus de TSC2 ce qui inhibe son activité GTPase et permet l'accumulation de la forme active RHEB-GTP activant mTORC1. La protéine AKT peut également phosphoryler le régulateur négatif du complexe mTORC1 PRAS40 ce qui favorise son interaction avec les protéines 14-3-3 et empêche l'inhibition de la voie mTOR. D'autres kinases, dont



**Figure 4: Régulation de la voie de signalisation mTOR**

La protéine mTOR forme deux complexes mTORC1 et mTORC2, dont l'activité est régulée en réponse à de nombreux signaux. Tout d'abord, les facteurs de croissance (a.) activent des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) qui induisent à leur tour les voies de signalisation RAS-RAF-MEK-ERK et IRS-PI3K-PDK1-AKT. La phosphorylation du complexe TSC1/2 par les kinases ERK, AKT et RSK inhibe son activité GTPase entraînant l'accumulation de RHEB-GTP actif qui active mTORC1. À l'inverse, l'activité du complexe TSC1/2 peut être favorisée par sa phosphorylation par GSK3, qui est inhibée par AKT et la voie WNT. D'autre part, la déplétion d'ATP lors d'un stress métabolique active LKB1 qui phosphoryle et active l'AMPK (b.). L'AMPK inhibe la voie mTORC1 via la phosphorylation et l'activation du complexe TSC1/2, ainsi qu'en phosphorylant RAPTOR. L'hypoxie (c.) entraîne l'activation de REDD1 qui active le complexe TSC1/2 inhibant mTORC1. Enfin, l'hétérodimère  $RAG(A/B)^{GTP}$ - $RAG(C/D)^{GDP}$  actif est contrôlé par les acides aminés et il favorise l'activation de mTORC1 via RHEB-GTP (d.). Les complexes Ragulator et Gator1 agissent respectivement comme GEF et GAP des RAG A/B, alors que le complexe Folliculine-FNIP est la GAP des RAG C/D. De plus, l'activité GAP de Gator1 est inhibée par le complexe Gator2.

GSK3, peuvent également phosphoryler le complexe TSC1/2 pour réguler négativement l'activité de mTOR. Les GSK3, qui sont en aval entre autres de la voie PI3K/AKT et des WNT, peuvent phosphoryler TSC2 sur des sites activateurs menant à l'inhibition de la voie mTORC1 (Inoki et al., 2006) (Voir section 3.1).

En réponse à une baisse en ATP, la protéine AMPK est activée et peut phosphoryler TSC2 sur la Thr1227 et la Ser1345 (Inoki et al., 2003) (Figure 4b). Contrairement aux phosphorylations inactivatrices par AKT, ERK et RSK, la phosphorylation de TSC2 par l'AMPK favorise l'activité GTPase du complexe TSC1/2 qui inhibe mTORC1. De plus, l'AMPK peut également phosphoryler Raptor, un membre du complexe mTORC1, ce qui favorise son interaction avec les protéines 14-3-3 et contribue à l'inhibition de mTORC1 (Gwinn et al., 2008). Par ailleurs, la privation en oxygène (hypoxie) régule également l'activité du complexe mTORC1 via l'activation de TSC1/2 (Figure 4c). L'hypoxie active la protéine « Regulated in development and DNA damage responses 1 » (REDD1), qui favorise l'activité du complexe TSC1/2 en libérant TSC2 de son interaction inhibitrice avec les 14-3-3 (Brugarolas et al., 2004; Deyoung et al., 2008).

La régulation de mTOR lors d'une privation en acides aminés ne s'effectue pas via le complexe TSC1/2, mais plutôt via la famille de petites protéines GTPases RAG (Efeyan et al., 2012). Les « Ras-related GTP binding protein » (RAG) sont retrouvées sous forme d'hétérodimère d'une protéine RAG A ou B avec une protéine RAG C ou D. En présence d'acides aminés, l'hétérodimère RAG se retrouve sous sa forme active où RAG (A ou B) est lié au GTP et RAG (C ou D) est lié au GDP (Figure 4d). Cet hétérodimère RAG actif,  $RAG(A/B)^{GTP}$ - $RAG(C/D)^{GDP}$ , recrute le complexe mTORC1 à la surface des lysosomes et favorise son activation par RHEB. Récemment, l'équipe de D.M. Sabatini a identifié le complexe responsable de l'activité « Guanine nucleotide exchange factor » (GEF) pour RAG A et B nommé « Ragulator » (Bar-Peled et al., 2012). Ce complexe composé des protéines p18, p14, Mp1, C7orf59 et HBXIP, respectivement renommées LAMTOR 1 à 5, permet le recrutement des RAG à la

surface des lysosomes et active l'hétérodimère RAG via son activité GEF. L'interaction du complexe RAG-Ragulator avec les v-ATPases a été observée suggérant qu'en plus de leur rôle dans l'acidification des lysosomes, les v-ATPases seraient impliquées dans la régulation de mTORC1. Le complexe Gator1, formé des protéines NPRL2, NPRL3 et DEPDC5, est responsable de l'activité « GTPase-activating protein » (GAP) pour RAG A et B et contre-balance l'activité GEF de Ragulator. L'activité GAP de GATOR1, qui induit le transfert d'un GDP à RAG A ou B et inactive l'hétérodimère RAG, est inhibée par Gator2. Ce deuxième complexe Gator2 est composé des protéines Mios, SEH1L, WDR23, WDR59 et SEC13. Enfin, la Folliculine et la « Folliculin-interacting protein » (FNIP) forment un autre complexe, qui démontre une activité GAP pour les RAG C et D, et contribuent à l'activation des RAG en réponse aux acides aminés (Tsun et al., 2013). Bref, la régulation des hétérodimères RAG et du complexe TSC1/2 joue un rôle central dans l'intégration des signaux contrôlant la signalisation mTORC1.

#### 2.2.1.2 Régulation de l'autophagie par les voies de signalisation mTOR et AMPK

Tout d'abord, les voies de signalisation mTOR et AMPK régulent l'activité du complexe ULK impliqué dans l'induction de l'autophagie (Figure 3A-B). À l'état basal, le complexe mTORC1 phosphoryle ULK1 sur la Ser757 et ATG13 ce qui inhibe l'activité du complexe ULK (Hosokawa et al., 2009; J. Kim et al., 2011). Lors d'une privation en glucose, la phosphorylation d'ULK1 est modulée par l'activation de l'AMPK et l'inhibition de mTORC1. La réduction de la phosphorylation mTORC1-dépendante de ULK1 sur la Ser757 favorise l'association de l'AMPK avec ULK1 ce qui contribue à l'activation du complexe ULK. L'AMPK peut phosphoryler ULK1 sur les sérines 317 et 777 favorisant l'activité du complexe ULK ce qui mène à l'induction de l'autophagie. Quelques études ont également observé la phosphorylation d'ULK1 sur d'autres résidus, notamment la Ser555, qui permet l'association d'ULK1 avec les protéines 14-3-3 (Bach et al., 2011; Egan et al., 2011). Chez les mammifères, les phosphorylations au niveau du complexe ULK semblent principalement réguler son activité, puisque sa formation est peu

affectée. De nouvelles études permettront d'améliorer notre compréhension des mécanismes de régulation du complexe ULK et de l'autophagie.

Récemment, des études ont mis en évidence l'importance du facteur de transcription EB (TFEB), en aval de mTORC1, dans la régulation de l'autophagie induite suite à une privation en nutriments. Ce facteur de transcription a été identifié comme un régulateur majeur de gènes impliqués dans la biogenèse des lysosomes ainsi que dans l'autophagie (Settembre, Fraldi, et al., 2013). En effet, TFEB reconnaît une séquence consensus (GTCACGTGAC) nommée « Coordinated Lysosomal Expression And Regulation » (CLEAR) qui est présente sur le promoteur de la majorité des gènes associés aux lysosomes (Sardiello et al., 2009).

La protéine TFEB appartient à la famille des facteurs de transcription à motif basique hélice-boucle-hélice (bHLH) et plus particulièrement elle est un membre, avec TFE3, MiTF et TFEC, de la sous-famille « Microphthalmia-associated Transcriptor Factor » (MiTF/TFE). La surexpression de TFEB dans les cellules HeLa augmente la biogenèse des lysosomes et induit l'autophagie (Sardiello et al., 2009; Settembre et al., 2011). L'étude de Settembre et al. a démontré la translocation de TFEB du cytosol vers le noyau suite à la privation des cellules en facteurs de croissance et en nutriments suggérant la contribution de TFEB dans l'induction de l'autophagie en réponse à ce stress. Les auteurs ont observé des changements au niveau de la phosphorylation de la protéine TFEB suite à la privation en nutriments. De façon intéressante, ils ont démontré qu'un mutant de TFEB où le résidu Ser142 a été changé en alanine, bloquant sa phosphorylation, est plus fortement localisé au noyau comparativement à la localisation majoritairement cytosolique de TFEB de type sauvage. De façon similaire, l'expression d'un mutant TFEB<sup>S211A</sup> est localisée au noyau tandis que le TFEB de type sauvage est localisé au cytosol ce qui suggère que la phosphorylation de la Ser211, comme celle de la Ser142, de TFEB maintient sa localisation au cytosol (Settembre et al., 2012). Quelques études ont démontré l'implication d'ERK2 dans

la phosphorylation de TFEB sur la sérine 142 (Settembre et al., 2011), ainsi que la phosphorylation des sérines 142 et 211 par mTORC1 (Jose a. Martina et al., 2012; Rocznik-Ferguson et al., 2012; Settembre et al., 2012). La phosphorylation de TFEB sur sa sérine 211 favoriserait son interaction avec les protéines 14-3-3 ce qui séquestre TFEB au niveau de cytosol (Jose a. Martina et al., 2012; Rocznik-Ferguson et al., 2012). La phosphorylation de TFEB par mTORC1 semble donc maintenir sa localisation cytosolique. Une étude a également démontré la phosphorylation de trois sérines de TFEB, en C-terminal, par la protéine kinase C (PKC $\beta$ ) ce qui entraîne une augmentation de l'expression de la protéine TFEB. Ces résultats suggèrent que certaines kinases peuvent phosphoryler différents résidus de TFEB et que ces modifications post-traductionnelles régulent sa localisation, mais influencent également sa stabilité. De nouvelles études seront donc nécessaires afin d'élargir notre compréhension des mécanismes de régulation de TFEB.

Récemment, le facteur de transcription ZKSCAN3, membre de la famille à doigts de zinc, a été identifié comme un régulateur négatif de l'autophagie qui semble s'opposer au rôle de TFEB (Chauhan et al., 2013). L'expression de ZKSCAN3 réprime la transcription de plusieurs gènes associés à l'autophagie et à la biogenèse des lysosomes. De façon intéressante, ZKSCAN3 et TFEB sont inversement régulés suite à la privation en nutriments ou l'inhibition de mTOR; c'est-à-dire que ZKSCAN3 transloque du noyau vers le cytosol. Les mécanismes de régulation de ZKSCAN3 et sa possible coopération avec TFEB dans le contrôle de l'autophagie demeurent à être étudiés.

### 2.2.1.3 Autres régulateurs

L'aspect transcriptionnel de la régulation de l'autophagie est un sujet d'étude assez récent et l'implication de plusieurs facteurs de transcription a été proposée. Une étude a démontré que la privation en nutriments peut mener à l'activation de « cAMP response element-binding protein » (Creb) qui induit l'autophagie

dégradant particulièrement les lipides (Seok et al., 2014). L'activation de Creb induit la transcription de nombreux gènes associés à l'autophagie incluant *Atg7*, *Ulk1* et *Tfeb*. À l'inverse, l'activation du récepteur nucléaire « Farnesoid X receptor » (Fxr) par les acides biliaires réprime la transcription dépendante de Creb et inhibe l'autophagie. La combinaison Fxr-Creb semble jouer un rôle dans la régulation physiologique de l'autophagie lors du cycle prise de repas et de jeûne.

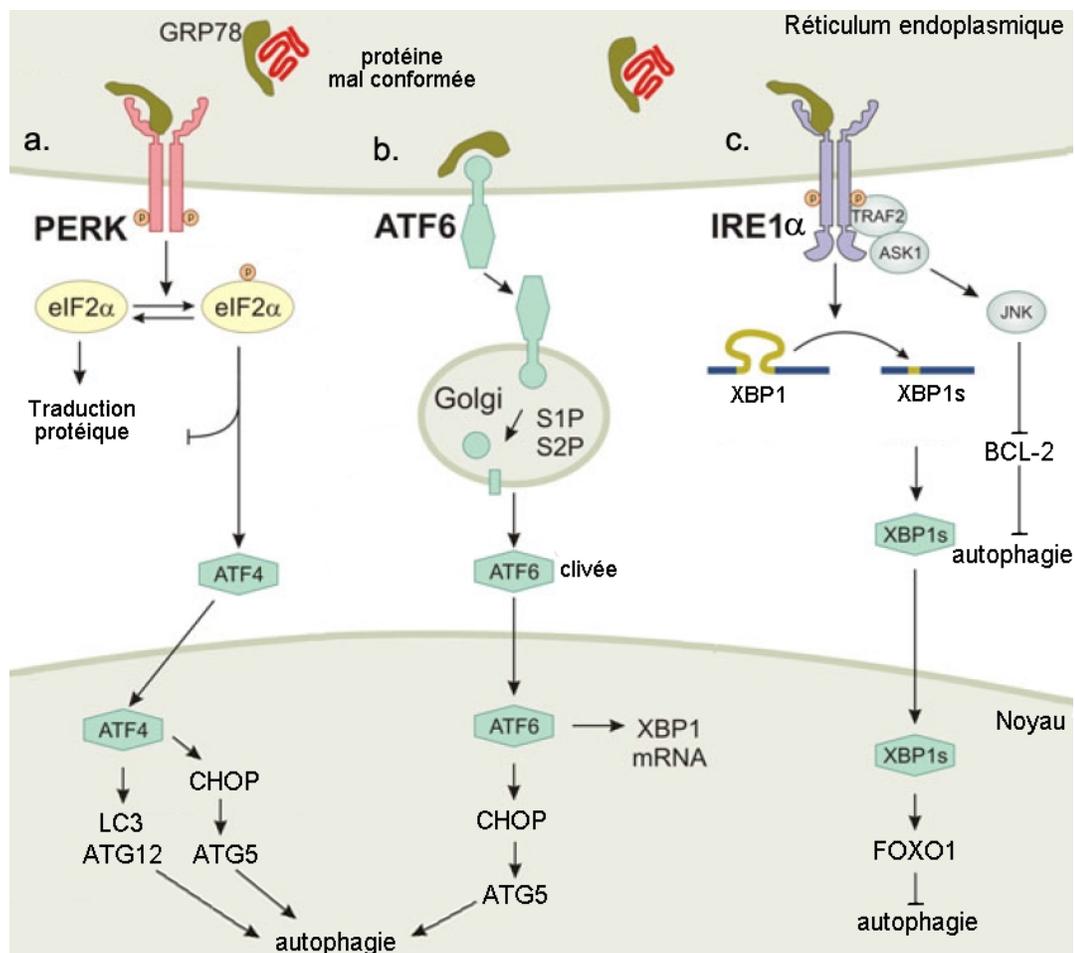
De plus, le stress métabolique peut également activer les facteurs de transcription FOXO ce qui inhibe la voie mTORC1 via BNIP3 et induit l'autophagie (Lin et al., 2013). Les FOXO (FOXO1 et FOXO3a) peuvent également induire la transcription de plusieurs gènes associés à l'autophagie dans différentes conditions (Füllgrabe et al., 2014). L'implication de plusieurs autres facteurs de transcription (dont ATF4,  $\beta$ -CATÉNINE, C/EBP $\beta$ , CHOP, E2F1, HIF1, JUN, NF $\kappa$ B, P53, STAT 1 et 3) dans la régulation de l'autophagie a été observée dans divers contextes cellulaires. D'ailleurs, certains de ces facteurs de transcription sont impliqués dans l'induction de l'autophagie en réponse au stress du réticulum endoplasmique.

### 2.2.2. Le stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique est impliqué dans plusieurs processus cellulaires tels que l'assemblage et la maturation des protéines, l'entreposage et la relâche de calcium, le métabolisme des lipides et des glucides. Une perturbation de l'homéostasie du réticulum endoplasmique engendre un déséquilibre entre la capacité de maturation des protéines et le taux de synthèse protéique. Ce déséquilibre entraîne l'accumulation de protéines insuffisamment ou mal repliées dans la lumière du réticulum endoplasmique menant à un état de stress de ce dernier. En réponse à un stress du réticulum endoplasmique plusieurs voies de signalisation sont activées afin de rétablir l'homéostasie et favoriser la survie cellulaire ou dans le cas d'un stress prolongé, induire l'apoptose. Ces voies incluent l'« unfolded protein response » (UPR), l'« ER-associated degradation »

(ERAD) et l'autophagie, qui sont toutes impliquées dans la dégradation des protéines ayant un défaut de conformation. Le stress du réticulum endoplasmique est détecté par les récepteurs transmembranaires PERK, ATF6 et IRE1 $\alpha$  retrouvés à la membrane du réticulum endoplasmique qui activent chacune des 3 voies de signalisation associées à l'UPR (Deegan et al., 2013; Senft & Ronai, 2015). En condition basale, la protéine chaperonne GRP78 (aussi nommé Bip) est associée au domaine luminal de ces récepteurs transmembranaires résultant en leur inactivation. Lors d'un stress du réticulum endoplasmique, l'accumulation de protéines insuffisamment ou mal repliées dans la lumière du réticulum endoplasmique mène à la dissociation de GRP78 et l'activation des protéines PERK, ATF6 et IRE1 $\alpha$  (Figure 5).

La protéine PERK, une sérine/thréonine kinase, phosphoryle la protéine eIF2 $\alpha$  réduisant la traduction des protéines ce qui favorise indirectement la traduction du facteur de transcription ATF4 via un mécanisme indépendant de la coiffe 5' de l'ARNm (Figure 5a). L'expression d'ATF4 induit la transcription du facteur de transcription *CHOP*, ainsi qu'*ATG12* et *LC3 (ATG8)* impliqués respectivement dans l'apoptose et l'autophagie induite par le stress du réticulum endoplasmique (Deegan et al., 2013). D'une part, la transcription de *CHOP* mène à la répression de l'expression de l'homologue anti-apoptotique BCL-2, tandis que l'expression d'homologues pro-apoptotiques (BIM et PUMA) est augmentée menant à l'induction de l'apoptose. De plus, l'activation de CHOP induit également la transcription d'*ATG5* suggérant son implication dans la régulation de l'autophagie (Rouschop et al., 2010). Par ailleurs, lors de l'induction de l'UPR la dissociation de GRP78 entraîne la translocation d'ATF6 vers l'appareil de Golgi, son clivage par les protéases S1P et S2P et la translocation nucléaire d'ATF6 clivée (Figure 5b). L'activation d'ATF6 induit la transcription de plusieurs gènes dont *CHOP*, *GRP78*, *XBP1* et *PGC1 $\alpha$* . La protéine ATF6 serait donc impliquée dans la régulation de l'autophagie induite par le stress du réticulum endoplasmique en contribuant, avec ATF4, à la régulation de CHOP. De plus, le stress du réticulum endoplasmique mène à l'activation de la protéine IRE1 $\alpha$  une



**Figure 5: Régulation de l'autophagie par le stress du réticulum endoplasmique via l'« unfolded protein response » (UPR).**

Au niveau du réticulum endoplasmique, les trois récepteurs transmembranaires, PERK, ATF6 et IRE1 $\alpha$ , régulent les voies composant l'UPR et leur association à la chaperonne GRP78 les maintient inhibés. Lors d'un stress du réticulum endoplasmique, GRP78 reconnaît les protéines ayant des défauts de conformation activant l'UPR. D'abord, PERK (a.) phosphoryle eIF2 $\alpha$  inhibant la traduction protéique, tout en favorisant spécifiquement celle d'ATF4. La translocation nucléaire d'ATF4 induit la transcription de ces gènes cibles, dont ceux associés à l'autophagie LC3 et ATG12, ainsi que d'ATG5 via l'expression de CHOP. D'autre part, l'activation d'ATF6 s'effectue via son clivage dans l'appareil de Golgi et la translocation nucléaire d'ATF6 clivée (b.). ATF6 induit la transcription de XBP1, ainsi que de CHOP contribuant avec ATF4 à l'expression d'ATG5. Finalement, l'activation d'IRE1 $\alpha$  entraîne l'épissage de l'ARNm de XBP1 ainsi que la phosphorylation de TRAF2. Puis, TRAF2 induit la voie ASK1-JNK qui promeut l'autophagie par la phosphorylation de BCL-2 inhibant son interaction avec Beclin1. L'implication directe d'XBP1s dans l'autophagie reste à être démontrée, toutefois XBP1 pourrait réguler négativement l'autophagie via la répression de l'expression du facteur de transcription FOXO1. Adapté de (Deegan et al., 2013)

sérine/thréonine kinase possédant également une activité endoribonucléase. La protéine IRE1 $\alpha$  phosphoryle, via son domaine sérine/thréonine kinase en C-terminal, la protéine TRAF2 (Figure 5c). La phosphorylation de TRAF2, une protéine adaptatrice, mène au recrutement et l'activation des protéines ASK1 et subséquemment de JNK. Cette activation de JNK est impliquée dans la régulation de l'autophagie (discuté à la section 2.2.3) en réponse au stress du réticulum endoplasmique. L'activation d'IRE1 $\alpha$  mène également à l'épissage d'un intron de l'ARNm de XBP1 via son activité endoribonucléase et permet la traduction du facteur de transcription XBP1s. Bien que l'implication directe de XBP1s dans la régulation de l'autophagie n'a pas été démontrée, il a été observé que la déplétion de l'expression de XBP1 induit l'expression du facteur de transcription FOXO1 (Vidal et al., 2012), un régulateur de l'autophagie tel que décrit précédemment (Voir section 2.2.1.3). En résumé, l'activation de l'UPR lors d'un stress du réticulum endoplasmique peut favoriser la survie cellulaire entre autres via l'induction de l'autophagie. L'activation de l'UPR peut éventuellement mener à l'induction de l'apoptose notamment via la voie JNK-cJUN supportant une étroite régulation entre l'apoptose et l'autophagie.

### 2.2.3 Régulation croisée entre l'apoptose et l'autophagie

La sérine/thréonine kinase JNK est un membre de la famille des « Mitogen-Activated Protein Kinase » (MAPK) et elle est activée par différents stress environnementaux ou cytokines. La voie JNK est caractérisée par une cascade de phosphorylation et d'activation à trois modules communes aux MAPK : 1- une sérine/thréonine kinase (MAP3K), 2- une kinase à double spécificité sérine/thréonine et tyrosine (MAP2K) et 3- une autre sérine/thréonine kinase (MAPK) (R. J. Davis, 2000). De nombreuses protéines MAP3K, dont les MEKK(1-4), MLK, ASK1, TAK1 et TPL2, activent les JNK via les MAP2K, MKK4/SEK1 et MKK7. Les rôles de la signalisation JNK sont nombreux et dépendent du contexte, ainsi que de l'intensité et la durée de l'activation. L'activation prolongée de la signalisation JNK a été associée avec des fonctions pro-apoptotiques, tandis

qu'une activation transitoire favorise la survie cellulaire (Chen et al., 1996; Sánchez-Perez et al., 1998). Les JNK peuvent phosphoryler cJUN sur les sérines 63 et 73 ce qui augmente son activité transcriptionnelle (Dérijard et al., 1994; Smeal et al., 1992), ainsi que les facteurs de transcription JUNB, JUND et ATF2 menant à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle AP1 (R. J. Davis, 2000). L'activation des JNK favorise l'apoptose entre autres par : 1- la transcription de *FASL* et *BIM*, et 2- la phosphorylation des homologues BCL-2 et BCL-XL inhibant leurs fonctions anti-apoptotiques.

La phosphorylation de BCL-2 par les JNK a également été impliquée dans la régulation de l'autophagie en réponse à la privation en nutriments ou aux céramides (Patingre et al., 2009; Y. Wei et al., 2008). La phosphorylation de BCL-2 par les JNK réduit l'association de BCL-2 avec la BÉCLINE 1 ce qui permet à BÉCLINE 1 d'assurer sa fonction autophagique. De plus, une étude a observé une induction de l'autophagie suite à l'activation de JNK combinée à une augmentation de la transcription c-JUN-dépendante de *BÉCLINE 1* (D.-D. Li et al., 2009). La voie de signalisation JNK a aussi été impliquée dans la régulation de la translocation des facteurs de transcription FOXO (notamment FOXO1 et FOXO3a) entre le cytosol et le noyau. L'activation de FOXO et des JNK contribuent à l'apoptose en induisant l'expression de l'homologue pro-apoptotique BIM. Quelques études ont récemment suggéré l'implication des FOXO dans la régulation de l'autophagie entre autres via l'expression de BNIP3 et de gènes *ATG* ( a Lin et al., 2013; Xu et al., 2011). Bref, l'activité JNK pourrait contrôler l'équilibre de l'autophagie et de l'apoptose et ainsi favoriser la survie ou bien la mort cellulaire en réponse à un stress.

Des études ont démontré que les caspases induites lors de l'apoptose peuvent mener au clivage de différentes protéines associées à l'autophagie (Norman et al., 2010; Rubinstein & Kimchi, 2012). (Cho et al., 2009; Wirawan et al., 2010; Y. Zhu et al., 2010). D'abord, le clivage de la protéine BÉCLINE 1 par différentes caspases, notamment les caspases 3 et 6, a été observé (Cho et al.,

2009; Wirawan et al., 2010; Y. Zhu et al., 2010). Ces études ont démontré que le clivage de la BÉCLINE 1 par les caspases inhibe l'autophagie et favorise l'apoptose induite par différents stimuli. De plus, il a été observé que la caspase 3 peut aussi cliver la protéine ATG4D favorisant l'induction de l'apoptose (Betin & Lane, 2009). La protéine ATG3 peut être clivée notamment par la caspase 8 (Norman et al., 2010) et ce clivage inhibe l'autophagie et promeut l'apoptose induite par les ligands  $TNF\alpha$  et TRAIL (Oz-Arslan et al., 2012). Enfin, il a été observé que la protéine ATG5 peut être clivée par la calpaïne ce qui favorise l'induction de l'apoptose (Yousefi et al., 2006). Bref, le clivage de nombreuses protéines ATG par différentes caspases inhibe leur fonction au niveau de l'autophagie et peut favoriser la mort cellulaire. Les mécanismes de régulation impliqués dans le contrôle de l'apoptose et de l'autophagie sont donc étroitement liés.

## 2.3 Rôle de l'autophagie dans la carcinogenèse

### 2.3.1 Fonctions

Le rôle de l'autophagie dans le cancer est complexe et selon le contexte ou le stade de progression, l'autophagie peut favoriser la tumorigenèse ou agir comme suppresseur de tumeur. L'expression de BÉCLINE 1, joueur important dans la nucléation des autophagosomes, est diminuée dans les tissus cancéreux de glandes mammaires comparativement aux tissus normaux (Liang et al., 1999). La délétion d'un seul allèle de *Bécline 1* chez la souris induit la formation de tumeurs solides notamment au niveau du foie et des poumons, ainsi que des lymphomes (Qu et al., 2003; Yue et al., 2003). De plus, la délétion du régulateur positif du complexe Vps34, *Bif1*, augmente la susceptibilité des souris à développer des lymphomes (Takahashi et al., 2007). Ces études supportent un rôle suppresseur de tumeur, toutefois ces régulateurs de l'autophagie possèdent également des fonctions indépendantes de l'autophagie. À cet égard, la délétion chez la souris d'*Atg4c*, un gène spécifique à l'autophagie, accélère le développement de fibrosarcomes induits par un agent carcinogène (Mariño et al., 2007). Également,

la délétion en mosaïque d'*Atg5* ou encore la délétion d'*Atg7* au niveau du foie favorise la formation de tumeurs bénignes chez la souris (Takamura et al., 2011). La délétion d'*Atg7* favorise aussi l'initiation de la tumorigenèse induite par l'oncogène *Braf*<sup>V600E</sup> au niveau du poumon des souris, observé dès l'âge de 5 semaines, toutefois la progression de ces tumeurs est ensuite compromise (Strohecker et al., 2013). L'inhibition de l'autophagie pourrait favoriser la tumorigenèse via une augmentation des dommages à l'ADN et une instabilité du génome (Karantza-Wadsworth et al., 2007; Mathew et al., 2007; Takahashi et al., 2013). Ainsi, l'inhibition de l'autophagie pourrait favoriser la formation initiale de tumeurs bénignes suggérant un rôle suppresseur de tumeur.

À l'opposé, plusieurs études supportent que l'autophagie protège les cellules tumorales contre différents stress cellulaires ce qui favoriserait la progression tumorale. Des niveaux élevés d'autophagie ont été observés dans certains cancers, notamment du côlon et du pancréas (K. Sato et al., 2007; S. Yang et al., 2011). D'ailleurs, l'autophagie semble être particulièrement importante pour la survie des cellules transformées par l'oncogène *RAS*, dont la mutation est fréquente dans le cancer du pancréas et du côlon. En effet, l'inhibition de l'autophagie, notamment via la délétion d'*Atg5* ou *Atg7*, réduit la transformation et la croissance tumorale induite par *Hras*<sup>G12V</sup> ou *Kras*<sup>G12V</sup> au niveau de cellules de rein, du sein et du poumon (Guo et al., 2011, 2013; M. J. Kim et al., 2011). La déplétion d'*Atg7* dans des modèles de cancer du poumon induits par les oncogènes *Kras*<sup>G12V</sup> ou *Braf*<sup>V600E</sup> prévient la progression de tumeurs bénignes en adénomes ou en carcinomes (Guo et al., 2013; Strohecker et al., 2013). Ceci suggère que l'autophagie serait nécessaire à la progression des tumeurs vers des stades plus avancés. Il a été suggéré que l'autophagie favoriserait la tumorigenèse induite par *RAS* en supportant le métabolisme, particulièrement la phosphorylation oxydative au niveau des mitochondries (Guo et al., 2011; Strohecker et al., 2013; Weinberg et al., 2010). De plus, des niveaux élevés d'autophagie ont été observés dans le cancer colorectal et ils protègent les cellules tumorales contre la privation en nutriments (K. Sato et al., 2007). Bref, l'autophagie semble jouer un rôle double

dans la carcinogenèse selon le contexte, c'est-à-dire une fonction suppresseur de tumeur lors de l'initiation, tandis qu'au niveau de la progression sa fonction serait pro-tumorale.

### 2.3.2 Implication de l'autophagie dans la carcinogenèse pancréatique

Récemment, quelques études se sont particulièrement intéressées aux rôles de l'autophagie dans le cancer pancréatique. Tout d'abord, des niveaux élevés d'autophagie ont été observés au niveau des adénocarcinomes pancréatiques (PDAC) autant au niveau de tissus humains que dans plusieurs lignées de cellules humaines de PDAC (S. Yang et al., 2011). Il a été démontré que l'inhibition de l'autophagie augmente les dommages à l'ADN, altère la phosphorylation oxydative et réduit la croissance des cellules pancréatiques tumorales. Cette étude suggère que les cellules pancréatiques tumorales requièrent l'autophagie afin de fournir des intermédiaires métaboliques nécessaires pour la phosphorylation oxydative et de les protéger contre le stress oxydatif et ainsi assurer leur croissance.

Deux études, chez la souris, ont démontré que l'inhibition de l'autophagie par la délétion d'*Atg7* ou *Atg5* au niveau du pancréas n'est pas létale chez l'embryon. Cependant, une destruction des tissus endocrine et exocrine est observée vers l'âge de 3 mois (Rosenfeldt et al., 2013; A. Yang et al., 2014). Ces souris n'ont pas développé de lésions précurseurs (PanIN), toutefois l'analyse au niveau de souris plus âgées n'a pas été effectuée en raison de la destruction du tissu pancréatique. La combinaison de la délétion d'*Atg7* ou *Atg5* avec l'expression de l'oncogène *Kras<sup>G12V</sup>* au niveau du pancréas a mené à une augmentation du nombre de lésions préneoplasiques PanIN de grade I. Malgré cette augmentation du nombre de lésions PanIN de bas grade, aucun adénocarcinome pancréatique (PDAC) n'a été observé chez ces souris âgées de 150 jours. Ceci suggère que l'autophagie est nécessaire pour la progression des lésions PanIN vers l'adénocarcinome. Malgré les résultats similaires de ces deux études, elles ont rapporté des effets contradictoires de l'inhibition de l'autophagie lorsque combinée avec une délétion

de *Trp53*. D'une part, l'étude de Rosenfeldt et al. a démontré que la délétion d'*Atg7* accélère le développement de PDAC et la mort chez les souris exprimant le *Kras*<sup>G12V</sup> combinée avec la délétion homozygote de *Trp53* (Rosenfeldt et al., 2013). Par contre, les résultats de Yang et al. ont démontré que la délétion d'*Atg5* chez les souris exprimant le *Kras*<sup>G12V</sup> combiné avec la délétion hétérozygote de *Trp53* réduit la progression de PanIN vers les stades avancés (PDAC) (A. Yang et al., 2014). Les résultats contradictoires obtenus par ces deux études pourraient s'expliquer par un rôle distinct d'*Atg7* ou d'*Atg5*, indépendant de l'autophagie. Une autre différence de ces deux modèles murins de cancer pancréatique est la perte de *Trp53* par délétion homozygote (Rosenfeldt et al., 2013) ou par la perte d'hétérozygotie (LOH) (A. Yang et al., 2014), cette dernière représentant l'évènement observé chez l'humain. De plus, le groupe de Kimmelman a observé que l'inhibition de l'autophagie dans plusieurs cellules pancréatiques tumorales ayant différents génotypes pour *Trp53* réduit la croissance cellulaire (A. Yang et al., 2014). L'inhibition de l'autophagie semble favoriser la formation des lésions précurseurs PanIN alors que le rôle de l'autophagie dans la progression et le maintien des tumeurs pancréatiques reste à être clairement défini, mais les études chez l'humain tendent à démontrer un rôle positif dans la progression tumorale.

#### 2.4 Potentiel thérapeutique de l'autophagie

Le consensus général semble appuyer un rôle positif de l'autophagie dans la progression tumorale ce qui suggère un potentiel thérapeutique de l'inhibition de l'autophagie pour le traitement du cancer. D'ailleurs, l'inhibition de l'autophagie sensibilise les cellules cancéreuses colorectales à la privation en nutriments, au 5-FU, à la radiothérapie et à des drogues anti-angiogéniques (J. Li et al., 2009; K. Sato et al., 2007; Schonewolf et al., 2014; Selvakumaran et al., 2013). La sensibilisation à différents traitements par l'inhibition de l'autophagie est observée dans plusieurs types de cancer, incluant les cellules de neuroblastomes, de lymphomes, de cancer de la prostate, de carcinomes hépatiques et de myélomes multiples (Amaravadi et al., 2007; Palacios et al., 2010; H. Pan et al., 2014; Wang

et al., 2014; Wu et al., 2010). De façon intéressante, les agents chimiothérapeutiques, notamment le 5-FU et la gemcitabine, induisent l'autophagie dans les cellules pancréatiques tumorales et leur effet cytotoxique est augmenté par l'inhibition de l'autophagie (Donohue et al., 2013; Hashimoto et al., 2014; Papademetrio et al., 2014). L'inhibition de l'autophagie sensibilise également les cellules pancréatiques tumorales à l'apoptose induite par l'inhibition combinée de la PI3K et mTOR (Mirzoeva et al., 2011). L'hydroxychloroquine, un agent lysosomotrope inhibant l'autophagie, est présentement utilisé en clinique comme agent anti-malaria. Plusieurs essais cliniques ont donc été rapidement débutés afin de tester l'inhibition de l'autophagie seule ou en combinaison avec différents agents chimiothérapeutiques comme traitement contre le cancer (Amaravadi et al., 2011; White & DiPaola, 2009; Z. J. Yang et al., 2011). Les premiers résultats de ces études démontrent que le traitement à l'hydroxychloroquine est toléré par les patients et qu'il mène à une inhibition de l'autophagie, malgré une efficacité variable, appuyant son utilité pour inhiber l'autophagie chez les patients (Rangwala, Chang, et al., 2014; Rangwala, Leone, et al., 2014; Rosenfeld et al., 2014).

Sommairement, la voie de dégradation de l'autophagie possède un rôle à double sens dans la carcinogénèse, elle est suppresseur de tumeur au niveau de l'initiation, tandis qu'elle favorise la progression une fois la tumeur établie. La voie de signalisation mTOR joue un rôle central dans la régulation de ce processus en intégrant de nombreux signaux. Afin de mieux comprendre le rôle complexe de l'autophagie, une meilleure connaissance des voies de signalisation régulant ce processus, mis à part la voie mTORC1, est nécessaire.

### 3. Les Glycogène synthase kinases 3

#### 3.1 Caractérisation et fonctions

Les glycogène synthase kinases 3 (GSK3) sont des sérine/thréonine kinases ubiquitaires initialement découvertes pour leur rôle dans le métabolisme du

glycogène. Il existe deux isoformes, GSK3 $\alpha$  et GSK3 $\beta$ , chez les mammifères et leur séquence possèdent un niveau élevé d'homologie, particulièrement dans le domaine kinase (93%) (Ali et al., 2001). L'isoforme GSK3 $\alpha$  (51kDa) possède une région riche en glycine en N-terminale, absente au niveau de GSK3 $\beta$  (47kDa), distinguant ces deux isoformes. La délétion homozygote de *Gsk3 $\beta$*  chez la souris induit la mort embryonnaire au jour E13,5 suggérant que l'isoforme GSK3 $\alpha$  ne compense pas l'activité de GSK3 $\beta$  (Hoeflich et al., 2000). Quant à *Gsk3 $\alpha$*  sa délétion homozygote chez la souris est viables et augmente la tolérance au glucose ainsi que la sensibilité à l'insuline de ces animaux (MacAulay et al., 2007). Cette étude a observé que la déplétion de GSK3 $\alpha$  affecte le métabolisme du glycogène au niveau du foie, mais pas des muscles suggérant un rôle tissu-spécifique des isoformes GSK3 $\alpha$  et GSK3 $\beta$ . Donc, l'activité de ces deux isoformes, codées par deux gènes indépendants, n'est pas redondante dans leurs fonctions malgré leur très forte homologie. Toutefois, le rôle isoformes spécifiques des GSK3 demeure à être clarifié. Le motif de phosphorylation des substrats des GSK3 consiste en un résidu sérine ou thréonine suivi de trois acides aminés et d'une autre sérine ou thréonine en position +4 (Ser/Thr-X-X-X-Ser/Thr). La phosphorylation initiale de la Ser/Thr située en C-terminale est nécessaire pour plusieurs substrats des GSK3 afin de permettre leur phosphorylation GSK3-dépendante (Cohen & Frame, 2001). Ainsi, l'état initial de phosphorylation de ses substrats peut influencer la capacité des GSK3 à les phosphoryler et donc réguler leurs fonctions (Jope & Johnson, 2004).

L'activité des GSK3 est également influencée par son état de phosphorylation où la phosphorylation de la Ser21 ou Ser9 (GSK3 $\alpha$  et GSK3 $\beta$  respectivement) inhibe son activité. Il a été décrit que l'autophosphorylation de la Tyr279 ou Tyr216 augmenterait l'activité des GSK3 $\alpha$  et GSK3 $\beta$  respectivement, cependant l'impact exact de la phosphorylation de ces résidus sur l'activité des GSK3 demeure à être clarifié (Cohen & Frame, 2001; Jope & Johnson, 2004). Les GSK3 sont majoritairement localisées au cytosol. Néanmoins, des fractions de GSK3 ont été

observées dans les mitochondries et le noyau où les GSK3 démontreraient une activité particulièrement élevée (Bijur & Jope, 2003).

La première fonction décrite pour les GSK3 est l'inhibition de la synthèse du glycogène, et elles ont été découvertes parmi les kinases qui phosphorylent la glycogène synthase et inhibent son activité (Embi et al., 1980). L'activité des GSK3 a également été impliquée dans la régulation de la survie cellulaire via plusieurs de ses cibles. D'une part, la phosphorylation du facteur de transcription cJun par les GSK3 peut inhiber sa liaison à l'ADN (Boyle et al., 1991), ainsi que favoriser sa dégradation (W. Wei et al., 2005) régulant négativement la survie cellulaire. Les GSK3 peuvent également inhiber la survie cellulaire via la phosphorylation des facteurs de transcription CREB (Grimes & Jope, 2001) et HSF1 (Xavier et al., 2000) inhibant leur liaison à l'ADN. De plus, il a été observé que les GSK3 peuvent interagir avec P53 et promouvoir sa fonction apoptotique (Watcharasit et al., 2003). D'ailleurs, la surexpression de GSK3 $\beta$  induit l'apoptose des cellules PC12 et des fibroblastes de rat (Pap & Cooper, 1998). Contrairement, l'activité de GSK3 $\beta$  est essentielle à la survie cellulaire dans certains contextes. Par exemple, une apoptose massive des hépatocytes est observée chez les souris ayant une délétion de *Gsk3 $\beta$* , causée principalement par une hypersensibilité au TNF $\alpha$  (Hoeflich et al., 2000). D'ailleurs, plusieurs études ont démontré que l'inhibition des GSK3 promeut l'apoptose induite par différents ligands tels FAS, TNF $\alpha$  et TRAIL (Eléonore Beurel & Jope, 2006; Hoeflich et al., 2000; Liao et al., 2003; Song et al., 2004). Les GSK3 peuvent également favoriser la survie cellulaire en phosphorylant et stabilisant NF $\kappa$ B/p105 (Demarchi et al., 2003). Bref, les nombreux substrats des GSK3 sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires pouvant soit favoriser la survie ou induire la mort cellulaire, ce qui suggère que la régulation des GSK3 est cruciale pour le maintien de l'homéostasie cellulaire.

### 3.2 Les mécanismes de régulation des GSK3

Contrairement à la plupart des kinases, les GSK3 ont la particularité d'être constitutivement actives puis inactivées suite à différents stimuli. Les GSK3 sont en aval de plusieurs voies de signalisation, entre autres celle de l'insuline (PI3K/AKT) et des WNT, dont l'activation mène à l'inhibition de l'activité des GSK3 (Figure 6). Différents mécanismes interviennent dans la régulation des GSK3 afin d'assurer le contrôle de leurs nombreux substrats et des fonctions cellulaires associées. L'activité des GSK3 est principalement régulée par leur phosphorylation par différentes kinases ou leur interaction avec d'autres protéines et leur séquestration. La localisation cellulaire des GSK3 pourrait également influencer leur activité ainsi que la disponibilité de leurs différents substrats.

#### 3.2.1 Phosphorylation et régulation des GSK3 par la voie PI3K/AKT

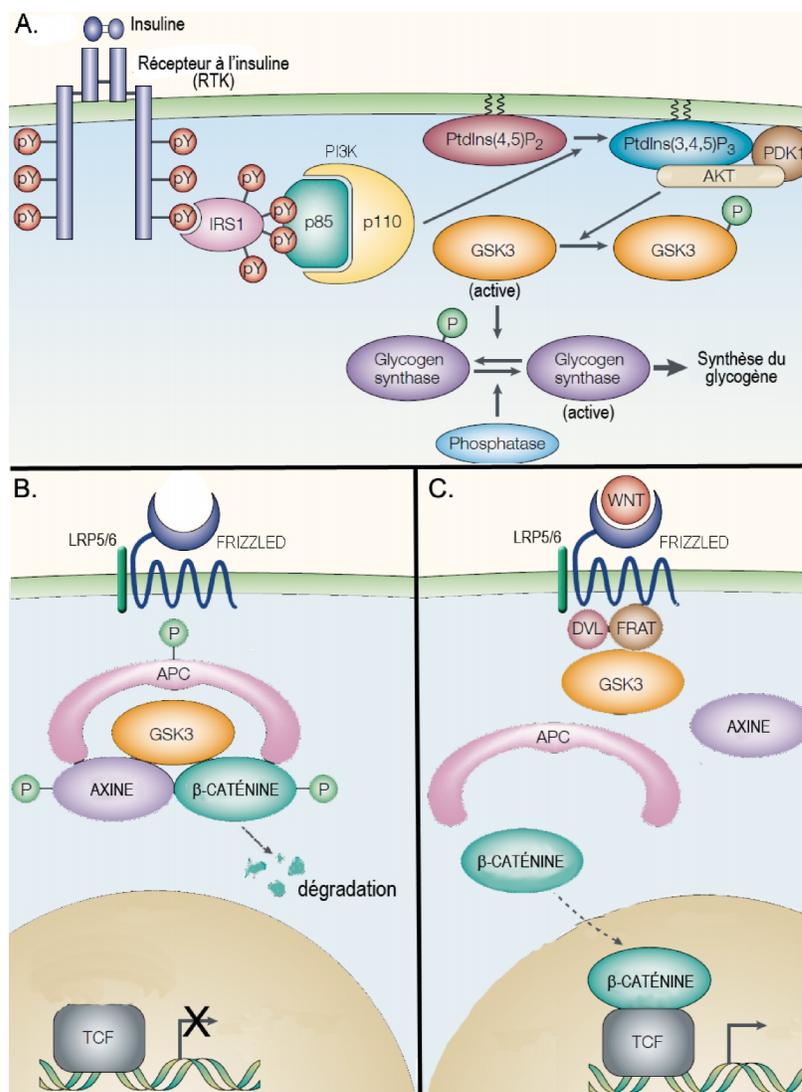
Il a été démontré qu'un traitement à l'insuline mène à l'inhibition de l'activité des GSK3 dans des cellules ovariennes suggérant que ces kinases sont en aval de la signalisation de l'insuline (Welsh & Proud, 1993). En effet, l'activation de la signalisation de l'insuline induit la phosphorylation inhibitrice des GSK3 sur la sérine 21 ou 9 de l'isoforme GSK3 $\alpha$  et GSK3 $\beta$  respectivement par la kinase AKT (Cross et al., 1995). Brièvement, la liaison de l'insuline à son récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) induit son autophosphorylation, activant ce dernier (Figure 6A). L'activation des RTK permet leur interaction avec les protéines « Insulin Receptor Substrate » (IRS1 et IRS2) au niveau de leur domaine « Phospho-Tyrosine Binding » (PTB) qui lie une tyrosine phosphorylée du récepteur. Suite à leur recrutement à la membrane plasmique, les IRS sont phosphorylés par les RTK menant à leur association avec les domaines SH2 de la sous-unité p85 de la PI3K. Ceci entraîne la phosphorylation de phospholipides PIP<sub>2</sub> de la membrane plasmique en PIP<sub>3</sub> par la PI3K permettant le recrutement des kinases PDK1 et AKT. Ceci permet à la kinase PDK1 de phosphoryler AKT ce qui active celle-ci

menant à l'inactivation des GSK3 via la phosphorylation des Ser21 (GSK3 $\alpha$ ) et Ser9 (GSK3 $\beta$ ) (Cohen & Frame, 2001).

Les GSK3, constitutivement actives, sont inactivées via la phosphorylation de leur sérine 21( $\alpha$ ) ou 9( $\beta$ ) par la protéine AKT, toutefois cette phosphorylation peut également être effectuée par d'autres kinases. En réponse à différents stimuli, la PKA, la PKC et la p90RSK peuvent phosphoryler la sérine inhibitrice des GSK3 (Eleonore Beurel et al., 2015; Jope & Johnson, 2004). Par ailleurs, la phosphorylation d'un autre résidu des GSK3, la tyrosine 279(GSK3 $\alpha$ ) ou 216(GSK3 $\beta$ ), favoriserait l'activité maximale des GSK3 (Hughes et al., 1993; Jope & Johnson, 2004). La phosphorylation des tyrosines 279/216 des GSK3 s'effectuerait via une autophosphorylation suite à leur traduction lors de leur maturation (A. Cole et al., 2004; Lochhead et al., 2006).

### 3.2.2 Régulation de l'activité des GSK3 par la voie de signalisation des WNT

Les GSK3 sont également associées à la voie de signalisation WNT/ $\beta$ -CATÉLINE (voie canonique) qui est cruciale lors du développement embryonnaire et est fréquemment altérée dans la tumorigenèse. Un complexe de dégradation formé des protéines GSK3, « Adenomatous Polyposis Coli » (APC), AXINE et  $\beta$ -CATÉLINE est impliqué dans la dégradation de cette dernière (Figure 6B). Ce complexe de dégradation est formé en absence de ligands WNT et permet aux GSK3 de phosphoryler la  $\beta$ -CATÉLINE. Cette phosphorylation entraîne l'ubiquitination et la dégradation de la  $\beta$ -CATÉLINE via  $\beta$ -TrCP et le protéasome ce qui maintient un faible niveau cytoplasmique de celle-ci (Cohen & Frame, 2001; Doble & Woodgett, 2003). La phosphorylation de la  $\beta$ -CATÉLINE par les GSK3, comme celle de nombreux de ses substrats, requiert qu'elle soit initialement phosphorylée par la CK1. De façon intéressante, les GSK3 peuvent également phosphoryler l'AXINE (Yamamoto et al., 1999) et APC (Rubinfeld et al., 1996) influençant leur fonction d'échafaudage pour la formation du complexe de dégradation. L'activité des GSK3 contribue à l'assemblage de ce complexe en



**Figure 6: Mécanismes de régulation de l'activité des GSK3 par les voies de l'insuline et des WNT.**

**A)** La liaison de l'insuline à son récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) induit son autophosphorylation qui permet le recrutement d'IRS1 sur une tyrosine phosphorylée. Puis, IRS1 est phosphorylé sur tyrosines par le RTK menant au recrutement de la PI3K à la membrane plasmique permettant à celle-ci de phosphoryler le PIP<sub>2</sub> en PIP<sub>3</sub> assurant l'activation de PDK1. La PDK1 active phosphoryle AKT. Enfin, AKT peut phosphoryler les GSK3  $\alpha$  et  $\beta$  respectivement sur la Ser21 et Ser9 inhibant leur activité. **B)** En absence de ligand WNT, les GSK3 forment un complexe avec APC, AXINE et la  $\beta$ -CATÉLINE favorisant la phosphorylation de cette dernière par les GSK3 menant à sa dégradation. **C)** La liaison du ligand WNT au récepteur FRIZZLED et co-récepteurs LRP5/6 induit le recrutement de Dishevelled (DVL). La protéine DVL ainsi que FRAT s'associent avec les GSK3 entraînant la dissolution du complexe de dégradation de la  $\beta$ -CATÉLINE permettant à celle-ci de s'accumuler, transloquer au noyau et induire la transcription de ses gènes cibles. Adapté de P Cohen & Frame, 2001

stabilisant l'AXINE et favorisant l'association d'APC avec la  $\beta$ -CATÉNINE. La régulation de l'activité des GSK3 par la signalisation WNT diffère de celle précédemment décrite par l'insuline, c'est-à-dire qu'elle n'implique pas la phosphorylation de GSK3.

Suite à l'interaction d'un ligand WNT avec le récepteur FRIZZLED et co-récepteurs LRP5/6, le complexe de dégradation formé de GSK3-AXINE-APC- $\beta$ -CATÉNINE se dissocie (Figure 6C). L'activation par les WNT entraîne le recrutement de la protéine « Dishevelled » (DVL), qui interagit avec l'AXINE, à la membrane plasmique (Cliffe et al., 2003; L. Li et al., 1999). La dissociation des GSK3 du complexe de dégradation implique DVL, mais également la protéine « Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas » (FRAT) (L. Li et al., 1999). L'association de l'AXINE avec les GSK3 est inhibée suite à la liaison de ces dernières à FRAT1 empêchant la phosphorylation de l'AXINE et de la  $\beta$ -CATÉNINE par les GSK3 (Thomas et al., 1999). Par contre, les souris ayant une délétion des *Frat* se développent normalement et ne présentent pas de défaut d'activation de la voie WNT suggérant qu'elles ne sont pas essentielles à la régulation de la voie WNT (Van Amerongen et al., 2005). Tout comme FRAT, la « GSK3 interaction protein » (GSKIP) se lie avec GSK3 ce qui bloque l'interaction avec l'AXINE et permet l'accumulation de la  $\beta$ -CATÉNINE (Chou et al., 2006). Ces protéines s'associant aux GSK3, FRAT et GSKIP, agiraient comme inhibiteurs endogènes des GSK3. D'autre part, DVL permet le recrutement des complexes AXINE-GSK3 à la membrane plasmique ce qui les séquestre et permet l'accumulation de la  $\beta$ -CATÉNINE (Cliffe et al., 2003; L. Li et al., 1999).

Récemment, le système endosomal a été impliqué dans la séquestration des GSK3 à l'intérieur de vésicules régulant l'activité des GSK3 dans la signalisation WNT. Une relocalisation de GSK3 $\beta$  au niveau des corps multivésiculaires (MVB) a été observée suite à l'activation de la signalisation WNT et elle dépendrait du complexe « Endosomal sorting complexes required for transport » (ESCRT) (Dobrowolski et al., 2012; Taelman et al., 2010). Ceci suggère que la régulation du

système endosomal pourrait jouer un rôle important dans le contrôle de l'activité des GSK3 au niveau de la voie des WNT. Il a également été démontré que l'activation de la voie de signalisation WNT entraîne la dissociation de p120-CATÉNINE/E-CADHÉRINE des co-récepteurs LRP5/6, qui serait requise pour permettre l'internalisation des GSK3 dans les MVB (Vinyoles et al., 2014). Le mécanisme de régulation de l'activité des GSK3 via leur séquestration dans les MVB demeure à être clarifié, mais il est fort probable que ce mode de régulation coexiste avec celui de l'interaction protéique.

Des études ont suggéré que les mécanismes d'inhibition de l'activité des GSK3 par les voies signalisation WNT et PI3K/AKT sont indépendants. L'inactivation des GSK3 via la phosphorylation inhibitrice des sérines 21 et 9 de GSK3  $\alpha$  et  $\beta$  respectivement peut être bloquée en mutant ces résidus en alanine empêchant leur phosphorylation. Les souris homozygotes pour ces mutants ( $Gsk3\alpha^{21A/21A}\beta^{9A/9A}$ ) ont été générées et se développent normalement (McManus et al., 2005). Or, la voie de signalisation des WNT est cruciale pour l'embryogenèse et l'altération de celle-ci mène à d'importants défauts de développement (Klaus & Birchmeier, 2008). Ceci suggère donc que la régulation de l'activité de ces mutants Gsk3 par la voie WNT demeure possible chez les souris  $Gsk3\alpha^{21A/21A}\beta^{9A/9A}$ . À cet égard, l'ajout de ligand Wnt3A réduit les niveaux de phosphorylation de la  $\beta$ -CATÉNINE et induit une augmentation de son expression totale dans les cellules souches embryonnaires issues des souris  $Gsk3\alpha^{21A/21A}\beta^{9A/9A}$  suggérant l'inactivation des mutants Gsk3 (McManus et al., 2005). De plus, cette activation de la voie WNT induit l'activité transcriptionnelle  $\beta$ -CATÉNINE-dépendante de façon similaire dans les cellules souches d'embryons des souris  $Gsk3\alpha^{21A/21A}\beta^{9A/9A}$  et de type sauvage. Il a également été observé que la phosphorylation des GSK3  $\alpha$  et  $\beta$  sur les sérines 21 et 9 respectivement n'est pas modulée suite aux traitements avec les ligands WNT (Ding et al., 2000; McManus et al., 2005). L'inhibition de la voie PI3K/AKT n'influence pas l'augmentation de l'activité transcriptionnelle  $\beta$ -CATÉNINE-dépendante induite par le traitements aux ligands Wnt1 ou Wnt3a (Ng et al., 2009). Ces observations démontrent que la régulation

des GSK3 par la signalisation WNT s'effectue indépendamment de la régulation par la phosphorylation des Ser21/9 (notamment via la voie PI3K/AKT).

D'autre part, une réduction de seulement environ 40% de l'activité des GSK3 est observée suite au traitement à l'insuline de muscles isolés des souris de type sauvage (McManus et al., 2005). De façon similaire, le traitement des cellules HEK293 avec l'insuline ou des ligands WNT inhibe environ 40% de l'activité totale des GSK3 (Ding et al., 2000). De plus, l'activité du mutant GSK3 $\beta^{S9A}$  est inhibée par le traitement avec des ligands WNT mais non par l'insuline suggérant que la régulation des GSK3 par ces voies implique des mécanismes distincts. D'ailleurs, l'augmentation de l'expression de la  $\beta$ -CATÉNINE induite suite à l'inactivation des GSK3 par WNT n'est pas observée suite au traitement à l'insuline. À l'inverse, l'activation de la signalisation WNT ne module pas l'activité de la glycogène synthase, alors qu'elle est augmentée suite à l'ajout d'insuline. Ceci suggère donc que les voies des WNT et de PI3K/AKT réguleraient différentes populations de GSK3 dans la cellule. À cet égard, le traitement avec l'insuline ou un inhibiteur de PI3K/AKT n'influence pas les niveaux de phosphorylation sur Ser9 de la fraction de GSK3 $\beta$  associée avec l'AXINE (Ding et al., 2000; Ng et al., 2009). Ceci suggère que la fraction de GSK3 qui est liée à l'AXINE représente la population associée à la voie de signalisation WNT. Les fractions de GSK3 semblent associées de façon distincte aux différentes voies de régulation, mais leur localisation pourrait aussi les distinguer.

Des fractions de GSK3 ayant une activité élevée ont été observées au niveau du noyau et des mitochondries (Bijur & Jope, 2003). De plus, l'accumulation nucléaire de GSK3 a été observée en réponse à différents signaux (Meares & Jope, 2007; Zmijewski & Jope, 2004). La liaison de FRAT avec GSK3, précédemment impliquée dans la voie de signalisation WNT, peut également entraîner l'exportation de GSK3 du noyau vers le cytosol (Franca-Koh et al., 2002). Bref, les différences de localisation et d'association avec les voies de signalisation

au sein des distinctes fractions de GSK3 pourraient signifier une régulation spécifique de certains substrats ou fonctions selon la fraction impliquée.

### 3.3 Implication des GSK3 dans la tumorigenèse

Des altérations au niveau des voies de signalisation PI3K/AKT et des WNT sont fréquemment observées dans différents cancers. Puisque ces voies mènent à l'inhibition des GSK3, on pourrait envisager que l'inhibition des GSK3 favorise la carcinogénèse. Cependant, une expression accrue et une activité plus élevée des GSK3 ont été observées au niveau de plusieurs cellules cancéreuses, dont celles issues d'un cancer colorectal (Mai et al., 2007, 2009; Shakoori et al., 2005). De plus, l'inhibition des GSK3 inhibe la prolifération et induit l'apoptose de différentes cellules cancéreuses humaines, notamment les cellules de myélome, de cancer colorectal et de cancer gastrique (Mai et al., 2007, 2009; Y. Zhou et al., 2008). D'ailleurs, l'inhibition des GSK3 réduit la croissance des tumeurs issues de xénotreffes de cellules de cancer de l'ovaire et du côlon suggérant que l'activité des GSK3 contribue à la tumorigenèse (Cao et al., 2006; Mai et al., 2009; Shakoori et al., 2007).

Plusieurs évidences suggèrent que l'activité des GSK3 pourrait également contribuer à la carcinogénèse pancréatique. Une expression plus élevée de GSK3 $\beta$  a été observée par immunohistochimie au niveau de l'adénocarcinome pancréatique comparativement aux tissus de pancréas normaux (Ougolkov et al., 2006). La surexpression de GSK3 $\beta$  (2,4 fois,  $p=0,01$ ), ainsi que la diminution de FRAT1 (0,6 fois,  $p=0,013$ ), un inhibiteur endogène de GSK3, a également été observée dans les tissus d'adénocarcinomes pancréatiques par rapport aux tissus normaux (Pasca di Magliano et al., 2007). Plusieurs cellules pancréatiques tumorales et environ 51% des adénocarcinomes pancréatiques démontrent une accumulation nucléaire de GSK3 (Ougolkov et al., 2006). Les GSK3 démontrent une activité particulièrement élevée dans le noyau (Bijur & Jope, 2003) suggérant une activité plus élevée des GSK3 dans les cellules pancréatiques tumorales. Une

activité accrue des GSK3 dans ces cellules suggèrerait un rôle potentiel des GSK3 dans la carcinogenèse pancréatique.

Mes résultats antérieurs, ainsi que ceux de d'autres groupes, ont montré que l'inhibition de l'activité des GSK3 réduit la croissance des cellules pancréatiques tumorales humaines et induit leur mort par apoptose (Mamaghani et al., 2009; Marchand et al., 2012; Ougolkov et al., 2006, 2005). Plusieurs équipes ont démontré la contribution d'une diminution de l'activité transcriptionnelle NF $\kappa$ B dans l'inhibition de la croissance des cellules pancréatiques tumorales suivant l'inhibition des GSK3 (Mamaghani et al., 2009; Ougolkov et al., 2005; Wilson & Baldwin, 2008). D'ailleurs, l'expression de plusieurs cibles de la voie NF $\kappa$ B, dont BCL-2, BCL-XL, XIAP et la cycline D1, est diminuée suite à l'inhibition des GSK3. Quant à mes travaux, ils ont permis d'impliquer la voie de signalisation JNK/cJUN dans la régulation GSK3-dépendante de la survie des cellules pancréatiques tumorales. En effet, nous avons observé une activation rapide et soutenue de la voie de signalisation JNK/cJUN suite à l'inhibition des GSK3 dans les cellules pancréatiques tumorales (Marchand et al., 2012). L'inhibition de la voie JNK/cJUN, à l'aide de l'inhibiteur des JNK SP600125 ou d'un shARN ciblant cJUN, a prévenu l'induction de l'apoptose des cellules pancréatiques tumorales induite par l'inhibition des GSK3. Malgré que l'activation de la voie JNK/cJUN soit nécessaire pour l'apoptose induite par l'inhibition des GSK3, une activation spécifique de la voie MEKK1/JNK/cJUN n'est pas suffisante pour mener à la mort apoptotique des cellules pancréatiques tumorales humaines. Ceci suggère que l'inhibition des GSK3 induit l'apoptose des cellules pancréatiques tumorales via l'activation de la signalisation JNK/cJUN en coopération avec d'autres signaux.

### 3.4 Rôle des GSK3 dans la régulation de l'autophagie

Des niveaux élevés d'autophagie ont été observé dans les cellules pancréatiques cancéreuses et ce processus est requis pour leur croissance (S. Yang et al., 2011). Les agents chimiothérapeutiques tels le 5-FU et la gemcitabine

induisent l'autophagie, notamment dans les cellules pancréatiques tumorales, et l'inhibition de ce processus augmente l'effet cytotoxique de ces traitements (Donohue et al., 2013; Hashimoto et al., 2014; Papademetrio et al., 2014). Le potentiel thérapeutique de l'inhibition des GSK3 est présentement à l'étude, toutefois peu d'études ont analysé l'impact des GSK3 sur l'autophagie. Récemment, une équipe a observé que l'inhibition des GSK3 induit l'autophagie et la mort cellulaire via l'accumulation de l'expression de BIF-1 dans les cellules de cancer de la prostate (J. Yang et al., 2010). Il a également été observé que l'inhibition des GSK3 peut induire l'autophagie et favoriser la dégradation de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) impliquée dans la maladie d'Alzheimer (Parr et al., 2012). De plus, l'inhibition des GSK3 peut favoriser l'autophagie induite par une inhibition du protéasome dans les cellules mammaires tumorales MCF7 (Gavilán et al., 2013). Par contre une étude a rapporté un effet inverse, c'est-à-dire que l'activité des GSK3 contribuent à l'induction de l'autophagie lors d'une privation en sérum en favorisant l'activité de l'acétyltransférase TIP60 (S.-Y. S.-C. Lin et al., 2012). L'activité d'ULK1 qui est impliquée dans l'initiation de l'autophagie est favorisée par son acétylation via TIP60. Plusieurs évidences suggèrent que l'inhibition des GSK3 induit l'autophagie, toutefois le rôle des GSK3 dans l'autophagie pourrait dépendre du contexte cellulaire. L'implication des GSK3 dans le contrôle de l'autophagie nécessite d'être étudié plus en détail afin de mieux comprendre son impact sur la survie cellulaire.

#### 4. Hypothèse et objectifs

Nos travaux antérieurs démontrent que l'inhibition de l'activité des GSK3 induit un signal pro-apoptotique spécifiquement dans les cellules pancréatiques tumorales supportant le potentiel thérapeutique de l'inhibition des GSK3 pour le cancer pancréatique. Il a été démontré que de nombreux agents chimiothérapeutiques induisent l'autophagie et que l'inhibition de cette autophagie peut accroître leur efficacité, entre autres au niveau du cancer pancréatique. Des études ont récemment suggéré que l'inhibition des GSK3 peut activer l'autophagie, notamment dans les cellules de cancer de la prostate.

L'hypothèse de mon projet est que l'inhibition de l'activité des GSK3 induit l'autophagie dans les cellules pancréatiques tumorales humaines et que l'inhibition de l'autophagie promeut l'apoptose induite par l'inhibition des GSK3.

Mes objectifs étaient de :

- 1) Déterminer si l'activité des GSK3 régule l'autophagie dans les cellules pancréatiques épithéliales ductales humaines et définir le rôle de cette autophagie dans la survie cellulaire.
  
- 2) Déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'autophagie par les GSK3 dans ces cellules pancréatiques.

## II - Matériel et méthodes

### 1. Matériel

Les inhibiteurs pharmacologiques spécifiques des GSK3 : le SB216763 (Tocris; 1616) et le CHIR99021 (Selleckchem; S2924) ont été utilisés. Les inhibiteurs de mTOR et de S6K ont été achetés de Selleckchem, soit la Torin1 (S2827) et le PF-4708671 (S2163) respectivement. Les inhibiteurs pharmacologiques de JNK et des caspases, le SP600125 et l'inhibiteur I respectivement, proviennent de Calbiochem® (EMD Millipore; 420128 et 627610). Les agents lysosomotropes suivant, la Chloroquine (Sigma-Aldrich; C6628) et la Bafilomycine A1 (LC Laboratories; B-1080), ont été utilisés pour inhiber l'autophagie et ont permis d'analyser le flux autophagique. L'inhibiteur de sérine/thréonine phosphatases, la Calyculine A (9902), a été obtenu de Cell Signaling Technology. Le solvant diméthyl sulfoxyde (DMSO) (Fisher; BP231) a été utilisé comme contrôle pour les différents traitements effectués avec les drogues énumérées ci-haut. La thapsigargine (T9033), la tunicamycine (T7765), le méthyle pyruvate (371173) et l'acide oxaloacétique (O7753) ont été achetés chez Sigma Aldrich. Tous les autres produits, sauf si précisé, proviennent de chez Bio Basic inc.

### 2. Culture cellulaire

Les expériences ont été effectuées à l'aide de cellules pancréatiques tumorales humaines, de cellules épithéliales pancréatiques immortalisées humaines, de fibroblastes d'embryons de souris ou des cellules HEK293T. Le milieu de culture des cellules a été changé tous les 2-3 jours et le passage des cellules a été effectué tous les 4-5 jours. Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées dans un environnement humide (5% CO<sub>2</sub> et 95% air) à 37°C. Lors du traitement prolongé des cellules, le milieu de culture contenant les inhibiteurs pharmacologiques a été changé toutes les 24h.

## 2.1 Lignées pancréatiques tumorales humaines

Les lignées BxPC3, MIA PaCa2 et PANC1 proviennent de l'American Type Culture Collection (CRL-1687, CRL-1420 et CRL-1469) et sont toutes des cellules pancréatiques tumorales humaines isolées de tumeurs primaires. D'abord, les cellules BxPC3 ont la particularité d'exprimer un *KRAS* de type sauvage, tandis que les gènes *TP53*, *CDKN2A* (délétion homozygote) et *SMAD4* sont mutés (Sipos et al., 2003). Quant aux cellules MIA PaCa2 et PANC1, elles ont une délétion homozygote pour *CDKN2A* et expriment une forme mutée de *KRAS* et *TP53*, mais un *SMAD4* de type sauvage.

Les cellules BxPC3 ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Wisent; 350-002-CL) supplémenté avec 10% de sérum de bovin foetal (FBS) (Wisent; 095-150), 10mM HEPES (Wisent; 330-050-EL), 2mM glutamax (Life Technologies; 35050-61), 1mM pyruvate de sodium (Wisent; 600-110-EL) et du glucose à une concentration finale de 25mM (Wisent; 609-036-EL). Les cellules MIA PaCa2 et PANC1 ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modification Eagle's Medium) (Wisent; 319-015-CL) supplémenté avec 10% de FBS, 10mM HEPES, 2mM glutamax et 1mM pyruvate de sodium.

## 2.2 HPDE

La lignée de cellules épithéliales ductales pancréatiques humaines (HPDE) a été obtenue de Dr. Ming-Sound Tsao (Ontario Cancer Institute, Toronto, ON, Canada). La lignée HPDE est constituée de cellules issues de l'épithélium canalaire pancréatique qui ont été immortalisées à l'aide des gènes *E6* et *E7* du virus papillome humain 16 (Furukawa et al., 1996; Ouyang et al., 2000). Les cellules HPDE ont été cultivées dans du milieu Kératinocyte-SFM (Life technologies; 17005-042) supplémenté avec de l'extrait bovin d'hypophyse 50µg/mL (BPE) et de l'EGF 5ng/mL. Elle représente la lignée cellulaire

pancréatique se rapprochant le plus des cellules pancréatiques ductales normales (Ouyang et al., 2000).

### 2.3 HEK293T

Les HEK293T sont des cellules épithéliales de rein embryonnaire humain et proviennent de l'American Type Culture Collection (CRL-3216). Les cellules HEK293T ont été cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% FBS, 10mM HEPES, 2mM glutamax et 1mM pyruvate de sodium. Ces cellules expriment l'antigène grand T du virus SV40 ce qui leur confère une efficacité élevée pour la transfection (section 5.2) ou la production virale (section 9).

### 2.4 Fibroblastes d'embryon de souris

Les fibroblastes isolés à partir d'embryons de souris (MEF) possédant ou non ( $Gsk3\beta^{+/+}$ ) une délétion du gène  $Gsk3\beta$  ( $Gsk3\beta^{-/-}$ ) nous ont été gracieusement fournis par J.R. Woodgett (The Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute, Toronto) (Hoeflich et al., 2000). Ces cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% FBS, 10mM HEPES, 2mM glutamax et 1mM pyruvate de sodium. Ces populations cellulaires ont été établies en tant que lignée cellulaire immortalisée et elles sont caractérisées par une perte d'expression de P53 (S. Liu et al., 2008).

## 3. Préparation des extraits protéiques

### 3.1 Extraction des protéines totales

#### 3.1.1 Lyse Triton

Les cellules ont été rincées deux fois au PBS froid, puis lysées à l'aide d'un tampon de lyse Triton (1% triton X-100, 50mM tris-HCl pH 7,5, 100mM NaCl, 5mM EDTA pH 8,0, 40mM  $\beta$ -glycérophosphate, 50mM NaF, 10% glycérol, 200 $\mu$ M de sodium orthovanadate, 1mM PMSF, 0,5 $\mu$ g/mL aprotinine, 0,5 $\mu$ g/mL leupeptine et

0,7 $\mu$ g/mL pepstatine) pendant 10 minutes sur glace. Puis, les extraits ont été centrifugés 10 minutes à 10 000rpm à 4°C et le surnageant a été récupéré. La concentration des protéines a été déterminée à l'aide de la méthode BCA (Pierce; 23225) et les échantillons ont été dosés en triplicata. Une courbe standard a été établie avec l'albumine de sérum bovin (BSA), effectuée en parallèle à chaque dosage. Les extraits protéiques ont été conservés à -20°C.

### 3.1.2 Lyse avec haute concentration en sel (HS)

La lyse HS, en raison de la forte concentration en sel du tampon, favorise la solubilisation de protéines nucléaires dans l'extrait. Cette lyse a donc été principalement utilisée lors de l'étude du facteur de transcription EB (TFEB). Brièvement, les cellules ont été rincées deux fois au PBS froid, puis lysées à l'aide d'un tampon de lyse HS (1% Nonidet P-40, 50mM tris-HCl pH 7,5, 300mM NaCl, 150mM KCl, 5mM EDTA pH 8,0, 10mM NaF, 10% glycérol, 200 $\mu$ M de sodium orthovanadate, 1mM PMSF, 0,5 $\mu$ g/mL aprotinine, 0,5 $\mu$ g/mL leupeptine et 0,7 $\mu$ g/mL pepstatine) pendant 10 minutes sur glace avant d'être soniqué 5 secondes à 25% d'intensité. Le lysat a ensuite été centrifugé 10 minutes à 10 000rpm à 4°C et le surnageant a été récupéré. Puis, la concentration des protéines a été déterminée à l'aide de la méthode BCA telle que décrit à la section 3.1.1. Les extraits protéiques ont été conservés à -20°C.

### 3.2 Fractionnement subcellulaire: protéines cytosoliques et nucléaires

Les cellules ont été rincées deux fois au PBS froid, puis lysées à l'aide du tampon A (10mM Hepes pH 7,9, 10mM KCl, 0,1mM EDTA pH 8,0, 0,1mM EGTA, 1mM DTT, 10mM NaF, 10mM  $\beta$ -glycérophosphate, 200 $\mu$ M de sodium orthovanadate, 1mM PMSF, 0,5 $\mu$ g/mL aprotinine, 0,5 $\mu$ g/mL leupeptine et 0,7 $\mu$ g/mL pepstatine) pendant 15 minutes sur glace. Puis, 0,625% de Nonidet P-40 a été ajouté aux lysats qui ont été ensuite vortexés 15sec. Les extraits ont été centrifugés 30 secondes à 12 000g à 4°C et le surnageant, composé des protéines

cytosoliques, a été récupéré. Par la suite, le culot a été resuspendu dans du tampon B (20mM Hepes pH 7,9, 0,4M NaCl, 1mM EDTA pH 8,0, 1mM EGTA, 1mM DTT, 10mM NaF, 10mM  $\beta$ -glycérophosphate, 5% glycérol, 200 $\mu$ M de sodium orthovanadate, 1mM PMSF, 0,5 $\mu$ g/mL aprotinine, 0,5 $\mu$ g/mL leupeptine et 0,7 $\mu$ g/mL pepstatine). L'extrait a été centrifugé 10 minutes à 10 000rpm à 4°C et le surnageant enrichi en protéines nucléaires a été récupéré. Enfin, la concentration des protéines a été déterminée à l'aide de la méthode BCA et les extraits protéiques ont été conservés à -20°C.

#### 4. Immunobuvardage

Des quantités équivalentes d'échantillons ont d'abord été préparées. De 20 à 60 $\mu$ g d'extraits protéiques ont été utilisés. Les protéines ont été dénaturées via l'ajout de Laemmli 4X et le volume a été ajusté uniformément afin d'obtenir une concentration finale de Laemmli 1X (62,5mM tris-HCl pH 6,8, 2,3% SDS, 10% glycérol, 1mM PMSF, 0,005% bleu de bromophénol et 5%  $\beta$ -mercaptoéthanol). Puis, les échantillons préparés ont été chauffés 5 minutes à 95°C. Les échantillons protéiques, ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire maison (phosphorylase B (94kDa) 0,35mg/mL, BSA (66kDa) 0,15mg/mL, ovalbumine (45kDa) 1mg/mL, carbonic anhydrase (32kDa) 0,2mg/mL, trypsinogène (24kDa) 0,3mg/mL,  $\beta$ -lactoglobuline (18kDa) 0,2mg/mL et lysosyme (14kDa) 0,3mg/mL dans du Laemmli 2X) ont ensuite été séparés sur gel SDS-PAGE (acrylamide/bis 37,5:1 7,5, 10 ou 12,5%, 375mM tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% ammonium persulfate, 0,033% TEMED). La migration des gels a été effectuée à 10mA/gel pendant 14 à 16h à 4°C dans un tampon de migration (25mM tris, 192mM glycine, 0,1% SDS). Par la suite, les protéines migrées ont été transférées à 250mA pendant 4 à 6h à 4°C sur membrane PVDF (polyvinylidene fluoride) (Perkin Elmer; NEF1002) ou de nitrocellulose (GE healthcare; 10600002) par électrotransfert dans un tampon de transfert (25mM tris, 192mM glycine et 10% éthanol). Puis, les membranes ont été colorées au rouge de Ponceau (0,2% Ponceau S, 3% acide trichloroacétique) afin de visualiser les protéines et de vérifier l'efficacité et l'uniformité du transfert. Les

membranes ont été décolorées dans l'eau avant d'être bloquées 1h à 25°C dans la solution de blocage (PBS 1X, 0,05% Tween-20 et 5% de lait en poudre). Après le blocage, les membranes ont été incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (Voir Tableau 1) dilué dans la solution de blocage. Les membranes ont été lavées 3 fois pendant 10 minutes dans du PBS-T (PBS 1X, 0,05% Tween-20) avant d'être incubées 1h à 25°C avec l'anticorps secondaire (Voir Tableau 2) conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) dilué dans la solution de blocage. Enfin, les membranes ont été lavées 3 fois pendant 10 minutes dans du PBS-T et 10 minutes dans du PBS avant d'être incubées 1 minute dans la solution de révélation (0,1M tris pH 8,5, 225µM acide coumarique, 1,25mM luminol et 0,009% peroxyde d'hydrogène). Les protéines ont été détectées par chemiluminescence en utilisant les films HyBlot CL (Denville scientific inc.; E3012).

**Tableau 1: Anticorps primaires utilisés pour les immunobuvardages**

Protéine reconnue	anticorps	dilution	espèce	compagnie
14-3-3 (pan)	#8312	1/1000	Lapin	Cell signaling
70S6K1 (49D7)	#2708	1/2000	Lapin	Cell signaling
ACTINE	MAB1501	1/20 000	Souris	Millipore
ATG5	#2630	1/1000	Lapin	Cell signaling
BÉCLINE 1	#3738	1/1000	Lapin	Cell signaling
CASPASE 7 clivée (Asp198)	#9491	1/500	Lapin	Cell signaling
c-JUN	sc-1694	1/1000	Lapin	Santa cruz biotechnology
ERK1	sc-93	1/2000	Lapin	Santa cruz biotechnology
GAPDH	#2118	1/10 000	Lapin	Cell signaling
GFP (B-2)	sc-9996	1/2000	Souris	Santa cruz biotechnology
GLYCOGEN SYNTHASE	#3886	1/1000	Lapin	Cell signaling
GRP78 (Bip) (C50B12)	#3177	1/1000	Lapin	Cell signaling
GSK3 $\alpha/\beta$ (D75D3) XP	#5676	1/5 000	Lapin	Cell signaling

GSK3 $\beta$	610201	1/4000	Souris	BD transduction laboratories
HISTONE H3	#9715	1/1000	Lapin	Cell signaling
IRE1 $\alpha$ (14C10)	#3294	1/1000	Lapin	Cell signaling
LAMINE B (M-20)	sc-6217	1/1000	Chèvre	Santa cruz biotechnology
LAMP1 (D2D11) XP	#9091	1/15 000	Lapin	Cell signaling
LC3B	#2775	1/1000	Lapin	Cell signaling
LC3B (D11) XP	#3868	1/10 000	Lapin	Cell signaling
p70S6K1 (Thr389) (108D2)	#9234	1/1000	Lapin	Cell signaling
PARP	#9542	1/1000	Lapin	Cell signaling
PARP clivée (Asp214)	#9541	1/500	Lapin	Cell signaling
pcJUN (Ser63)	#9261	1/500	Lapin	Cell signaling
pERK1/2 (Thr202/Tyr204)	#9101	1/1000	Lapin	Cell signaling
Phospho-(Ser) 14-3-3 binding motif (4E2)	#9606	1/750	Souris	Cell signaling
pS6 (Ser235-236) XP	#4858	1/4000	Lapin	Cell signaling
S6 ribosomal protein (5G10)	#2217	1/4000	Lapin	Cell signaling
TFEB	#4240	1/500	Lapin	Cell signaling

**Tableau 2: Anticorps secondaires utilisés pour les immunobuvardages**

Protéine reconnue	anticorps	dilution	espèce	compagnie
IgG Lapin (couplé à la HRP)	111-035-003	1/2500	Chèvre	Jackson immuno-research laboratories
IgG Souris (couplé à la HRP)	115-035-003	1/2500	Chèvre	
IgG Chèvre (couplé à la HRP)	sc-2953	1/2500	Poulet	Santa cruz biotechnology

## 5. Transfections transitoires

### 5.1 Transfection de siARN

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits et le lendemain elles ont été transfectées à l'aide de la méthode de lipofection. Brièvement, 3 $\mu$ L de Lipofectamine 2000 (Life technologies; 11668027) ont été incubés 5 minutes dans 100 $\mu$ L d'Opti-MEM (Life technologies; 31985-070) (Solution A). Entre-temps, 100nM/puit de siARN contrôle (Dharmacon; D-001210-03-05) ou dirigé contre ATG5 (Santa cruz; sc-41445) ont été ajoutés à 100 $\mu$ L d'Opti-MEM (Solution B). Puis, les solutions A et B ont été combinées et incubées 20 minutes à température ambiante. Les cellules ont été rincées 1 fois avec de l'Opti-MEM et 800 $\mu$ L/puits d'Opti-MEM ont été ajoutés. Le volume final a été complété à 1mL avec l'ajout du 200 $\mu$ L de la solution A+B. Six heures plus tard, le milieu a été remplacé par du DMEM contenant 10% de FBS. Enfin, 24h post-transfection, les cellules ont été traitées avec la Bafilomycine A1 pendant 24 ou 48h avant d'être lysées (Section 3.1).

### 5.2 Transfection d'ADN

Les cellules ont étéensemencées soit dans des plaques de 6 puits ou des pétris de 100mm. Le lendemain, les cellules ont été transfectées à l'aide de la Lipofectamine 2000. Un ratio de 2:1 ou 3:1  $\mu$ L de Lipofectamine 2000 par  $\mu$ g d'ADN a été utilisé, pour les cellules HEK293T et PANC1 respectivement. La solution A, contenant la Lipofectamine 2000, a été préparée selon le tableau 3 et incubée 5 minutes à température ambiante. Entre-temps, la solution B a été préparée à l'aide de l'ADN du vecteur d'expression EGFP-N1-TFEB (Tableaux 3 et 4). Puis, les solutions A et B ont été combinées et incubées 20min à température ambiante. Les cellules ont été rincées 1 fois avec de l'Opti-MEM et du milieu Opti-MEM a été ajouté (Tableau 3). Par la suite, le mélange de Lipofectamine+ADN (A+B) a été ajouté. Après 4h (HEK293T) ou 6h (PANC1), le milieu de culture a été

remplacé par du DMEM contenant 10% de FBS. Enfin, 24 à 48h post-transfection, les cellules ont été traitées ou non, puis lysées (Section 3.1).

**Tableau 3: Transfection d'ADN**

		6 puits	100mm
Solution A	Lipofectamine 2000 ( $\mu\text{L}$ )	1 (2:1) ou 1,5 (3:1)	6 (2:1) ou 9 (3:1)
	Opti-MEM ( $\mu\text{L}$ )	100	500
Solution B	ADN ( $\mu\text{g}$ )	0,5	3
	Opti-MEM ( $\mu\text{L}$ )	100	500
Volume de milieu Opti-MEM (mL) ajouté par puit		0,8	6

### 5.3 Vecteurs et gènes rapporteurs

**Tableau 4: Liste des vecteurs**

plamide	Caractéristique	Provenance
EGFP-N1-TFEB	Code la protéine TFEB fusionnée à l'EGFP	Addgene #38119
pcDNA3-AU1-mTOR-WT	Code la protéine mTOR de type sauvage	Addgene #26036
pcDNA3-AU1-mTOR-E2419K	Code la protéine mTOR mutée E2419K	Addgene #19994
pLKO.1-puro-shNonTarget	shARN non ciblant	Sigma; SHC-16
pLKO.1-puro-shGSK3 $\beta$	shARN ciblant GSK3 $\beta$	Sigma; TRCN0000040001
pLKO.1-puro-shGSK3 $\alpha$	shARN ciblant GSK3 $\alpha$	Sigma; TRCN0000039766
pLKO.1-puro-shTFEB	shARN ciblant TFEB	OpenBioSystems; TRCN0000013111
pLP1	Gènes des protéines virales gag (nucléocapside) et pol (réplication) sous le promoteur CMV	Life Technologies (don du Dre Julie Carrier,

pLP2	Gène de la protéine virale rev (régule l'expression de gag et pol) sous le promoteur CMV	Département de Médecine, Université de Sherbrooke, Qc, Canada)
VSV-G	Gène d'une protéine d'enveloppe virale sous le promoteur CMV	

## 6. Immunoprécipitation

Tout d'abord, les billes GFP-Trap (Chromotek; gta) ont préalablement été lavées 3 fois dans le tampon de lyse approprié (Section 3.1) et agitées à 4°C. Puis, de 1 à 2mg d'extraits protéiques de cellules transfectées avec EGFP-N1-TFEB (Section 5.2) ont été utilisés et complétés à un volume final de 600µL avec le tampon de lyse. Ensuite, 10µL de billes GFP-Trap par mg de protéines ont été ajoutés aux échantillons avant d'être incubés pendant 1-2h sous agitation à 4°C. Par la suite, les extraits ont été centrifugés 45 secondes 3000rpm et le premier surnageant a été conservé. Les immunocomplexes ont été lavés 3 fois dans le tampon de lyse avant d'être resuspendus dans 40µL de Laemmli 4X. Finalement, les immunocomplexes ont été chauffés 5 minutes à 95°C et séparés par SDS-PAGE (Section 4), avec en parallèle un extrait protéique du lysat cellulaire ayant servi à l'immunoprécipitation.

## 7. Essais kinase et phosphatase

### 7.1 Essai phosphatase

La protéine TFEB-EGFP a été immunoprécipitée (Section 6) à partir de 1mg d'extrait protéique des échantillons. Pour cet essai, les lavages ont été effectués dans du tampon de lyse sans inhibiteur de phosphatase. Suite aux lavages des immunocomplexes, ceux-ci ont été préparés pour l'essai phosphatase c'est-à-dire ils ont été lavés 2 fois dans le tampon phosphatase PMP (NEB; B0761) et puis séparés en 2 fractions équivalentes. Ces dernières ont été incubées sans ou avec 200U de Lambda phosphatase (NEB; P0753) pendant 30 minutes à 30°C. Enfin, les immunocomplexes ont été resuspendus dans 40µL de Laemmli 4X, chauffés 5

minutes à 95°C et séparés par SDS-PAGE (Section 4), avec en parallèle un extrait protéique du lysat cellulaire ayant servi à l'immunoprécipitation.

## 7.2 Essai kinase GSK3

La protéine TFEB-EGFP a été immunoprécipitée (Section 6) à partir de 1 à 2mg d'extrait protéique des lysats cellulaires. Suite aux lavages des immunocomplexes, ils ont été préparés pour l'essai kinase c'est-à-dire ils ont été lavés 2 fois dans le tampon kinase pour GSK3 (NEB; B6040) et séparés en 3 fractions équivalentes. Ces dernières ont été incubées sans et avec 125U de GSK3 active (NEB; P6040) avec ou sans l'inhibiteur des GSK3 (CHIR99021; 5 $\mu$ M) pendant 1h à 30°C. Les immunocomplexes ont été resuspendus dans 25 $\mu$ L de Laemmli 4X. Finalement, les immunocomplexes ont été chauffés 5 minutes à 95°C avant d'être séparés par SDS-PAGE (Section 4).

## 8. Immunofluorescence

### 8.1 Marquage des autophagosomes

Les cellules ont étéensemencées sur des lamelles insérées dans les puits de plaques à 6 puits. Le lendemain, les cellules ont été traitées 24h avec l'inhibiteur des GSK3 CHIR99021 et l'inhibiteur de mTOR, Torin1. D'abord, les cellules ont été rincées avec du PBS et fixées avec 2% paraformaldéhyde (PFA) dans du PBS pendant 20 minutes. Ensuite, les cellules ont été lavées 3 fois 5 minutes avec du TBS-T (50mM tris pH7,5, 150mM NaCl et 0,1% Tween20) avant d'être perméabilisées avec du méthanol 100% pendant 10 minutes à -20°C. Suite à 3 lavages de 5 minutes avec du TBS-T, les cellules ont été bloquées pendant 15 minutes dans du PBS contenant 10% de FBS. Par la suite, les cellules ont été incubées 2-3h avec une dilution 1/150 de l'anticorps dirigé contre LC3B (Cell signaling; 3868) dans du TBS-T avec 0,1% Triton à température ambiante. Les cellules ont été lavées 3 fois 5 minutes avec du TBS-T et ont été incubées pendant 1h dans la noirceur et à température ambiante avec l'anticorps secondaire

conjugué à l'Alexa488 (Molecular probes; 21206) dilué 1/400 dans du TBS-T. Ensuite, les cellules ont été lavées 5 minutes avec du TBS-T et incubées 5 minutes avec du 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Enfin, les lamelles ont été montées sur des lames à l'aide d'Immu-Mount (Thermo Scientific; 9990402).

Les cellules ont été observées à l'aide d'un microscope confocal Zeiss LSM700 équipé d'objectifs de 20x et à l'immersion à l'huile de 63x et 100x. Les échantillons ont été excités séquentiellement avec un laser à 488nm et 405nm. Des photos de sections (5-6 pour 20x, 7-9 pour 63x et 15-18 pour 100x) à intervalle de 0,3µm ont été prises à une résolution de 512x512 pixels en mode d'acquisition de la moyenne de 2 balayages par ligne.

## 8.2 Marquage des Lysosomes

Les cellules ont étéensemencées sur lamelles insérées dans les puits de plaques à 6 puits. Le lendemain, les cellules ont été traitées 24h avec l'inhibiteur CHIR99021 (GSK3), la Torin1 (mTOR) et la Bafilomycine A1 (autophagie). Pendant la dernière heure de traitements, les cellules ont été incubées avec 50nM de lysotracker® Red DND-99 (Molecular probes; L-7528). Ensuite, les cellules ont été rincées avec du PBS et fixées avec 2% PFA dans du PBS pendant 30 minutes à 4°C. Puis les cellules ont été lavées avec du PBS, incubées 5 minutes avec du DAPI et lavées à nouveau avec du PBS. Les lamelles ont été montées sur des lames à l'aide d'Immu-Mount.

Les cellules ont été observées à l'aide d'un microscope confocal Zeiss LSM700 avec l'objectif à l'immersion à l'huile de 63x. Les échantillons ont été excités séquentiellement avec un laser à 555nm et 405nm. Des photos de 7-9 sections à intervalle de 0,3µm ont été prises à une résolution de 512x512 pixels en mode d'acquisition de la moyenne de 2 balayages par ligne.

### 8.3 Visualisation TFEB-EGFP

Les cellules ont étéensemencées sur lamelles insérées dans les puits de plaques à 6 puits et elles ont été transfectées le lendemain avec le plasmide EGFP-N1-TFEB (Section 5.2). Vingt-quatre heures post-transfection, les cellules ont été traitées 1h sans ou avec l'inhibiteur CHIR99021 et Torin1. Par la suite, les cellules ont été rincées avec du PBS et fixées avec 2% PFA dans du PBS pendant 20 minutes. Puis les cellules ont été lavées avec du TBS-T, incubées 5 minutes avec du DAPI et lavées à nouveau avec du TBS-T. Les lamelles ont été montées sur des lames à l'aide d'Immu-Mount.

### 9. Production et infection lentivirale

Des cellules HEK293T ont étéensemencées dans des pétris 100mm pour obtenir une confluence de 50-60% le lendemain. En résumé, 48 $\mu$ L de Lipofectamine 2000 ont été dilués dans 500 $\mu$ L d'Opti-MEM et incubés pendant 5 min à température ambiante. Puis, aux 500 $\mu$ L de lipofectamine 2000 préparés ont été ajoutés 6 $\mu$ g de vecteur du shARN d'intérêt ainsi que 6 $\mu$ g des vecteurs pour les particules virales, pLP1, pLP2 et VSVG (Tableau 4), dilués dans 500 $\mu$ L d'Opti-MEM. Le tout a été incubé 30 minutes à température ambiante. Ensuite, les cellules ont été incubées 4h avec 5mL d'Opti-MEM auxquels a été ajouté le 1mL comprenant la Lipofectamine 2000 et les ADN. Puis, le milieu a été remplacé pour 7mL de DMEM contenant 10% de FBS et 2 jours plus tard, le milieu contenant les lentivirus a été récolté et filtré à l'aide d'un filtre 0,45 $\mu$ m pour être ultérieurement conservé à -80°C.

Pour l'infection lentivirale, les cellules ont étéensemencées dans des pétris 60mm de façon à obtenir une confluence de 50-60%, le lendemain. Elles ont ensuite été incubées 1h avec 0,7mL de virus supplémenté avec du polybrène 8 $\mu$ g/mL. Puis, 2,3mL de milieu DMEM contenant 10% de FBS supplémenté avec du polybrène 8 $\mu$ g/mL ont été ajoutés. Le milieu contenant les virus a été remplacé

2 jours plus tard avec du milieu DMEM contenant 10% de FBS. Le lendemain, les cellules ont été soit lysées (Section 3.1) ou sélectionnées afin d'établir des populations stables. Les populations de cellules PANC1 exprimant le shTFEB ou le shNonTarget de façon stable ont été obtenues suite à une sélection de 10 jours avec du milieu de culture supplémenté avec 5 $\mu$ g/mL de puromycine (Wisent; 400-160-EM).

## 10. Croissance en agarose mou

Le fond des puits de plaques à 6 puits a été couvert de 1,5mL d'un mélange (1:1) de DMEM 2x sans rouge de phénol et d'agarose de type VII 1,4% (Sigma; A9045). Puis aux plaques préalablement préparées, 2mL/puit du même mélange de DMEM-agarose (1:1) contenant 7 500 cellules/mL ont été ajoutés. Après solidification, du milieu de culture DMEM 1x sans rouge de phénol supplémenté avec 10% de FBS a été ajouté à la surface d'agarose et changé tous les 2-3 jours. Lors de traitements, le milieu de culture contenant les inhibiteurs spécifiés a été changé à tous les jours. Après 3 semaines, les colonies ont été colorées en incubant les cellules pendant 3h à 37°C 5% CO<sub>2</sub> avec 500 $\mu$ L de PBS contenant 0,5mg/mL de MTT (Calbiochem; 475989). Des images ont été prises et les colonies ont été dénombrées à l'aide du logiciel ImageJ version 1.47d.

## 11. Spectrométrie de masse

### 11.1 Préparation des échantillons

L'approche protéomique quantitative « Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture » (SILAC) d'analyse par spectrométrie de masse a été utilisée. Celle-ci repose sur l'incorporation d'acides aminés marqués avec différents isotopes dans les protéines de cellules en culture. Une fois les acides aminés marqués incorporés dans les protéines, elles peuvent être distinguées en fonction des isotopes lors de l'analyse par spectrométrie de masse. Notre approche consistait à l'utilisation d'arginine et de lysine marquées avec différents isotopes

dans le milieu de culture afin d'obtenir 3 conditions SILAC. Les cellules HEK293T ont été maintenues pendant au moins 6 passages dans du milieu DMEM sans arginine et lysine (Life technologies; A14431-01) supplémenté avec 10% de sérum dialysé (Life technologies; 26400-044), 2mM L-Glutamax, 100U/mL pénicilline/streptomycine (Wisent; 450-201-EL), et de l'arginine et de la lysine soit légère (L) (Arg0, Lys0; Sigma; A5006 et L5501), moyenne (M) (Arg6, Lys4; Cambridge Isotope Laboratories; CNM-2265 et DLM-2640) ou lourde (H) (Arg10, Lys8; Cambridge Isotope Laboratories; CNLM-539 et CNLM-291). Par la suite, les cellules HEK293T cultivées dans le milieu léger (L), moyen (M) et lourd (H) ont étéensemencées dans des pétris de 15cm. Le lendemain, les cellules en milieu moyen et lourd ont été transfectées avec de l'effectene (Qiagen; 301425) en suivant les instructions du fabricant. Brièvement, une solution de 5 $\mu$ g/Pétri du plasmide EGFP-N1-TFEB dans 750 $\mu$ L de tampon EC a été incubée avec 40 $\mu$ L d'enhancer pendant 5 minutes à température ambiante. Puis, 60 $\mu$ L d'effectene ont été ajoutés et la solution a été incubée 10 minutes à température ambiante. Entre temps, les cellules ont été rincées avec du PBS et 10mL de milieu DMEM SILAC (moyen ou lourd) ont été ajoutés. Enfin, 7,5mL de milieu DMEM SILAC (moyen ou lourd) ont été ajoutés à la solution de transfection qui a ensuite été ajoutée aux cellules. Vingt-quatre heures post-transfection, les cellules en condition de milieu lourd (H) ont été traitées 1h soit avec le CHIR99021 ou la Torin1, alors que du DMSO a été ajouté aux cellules en milieu moyen (M). Donc, la condition L représente les cellules contrôles non transfectées et non traitées, la condition M les cellules exprimant TFEB-EGFP traitées avec du DMSO et la condition H les cellules exprimant TFEB-EGFP et traitées avec le CHIR99021 ou la Torin1. Les cellules ont été lysées dans du tampon Triton (Section 3.1.1).

## 11.2 Préparation et analyse des peptides

La protéine TFEB-EGFP a été immunoprécipitée (Section 6) à l'aide de billes GFP-Trap à partir de 5mg d'extraits protéiques des différents lysats cellulaires préparés en 11.1. Les immunocomplexes des échantillons des conditions L, M et H

ont été combinés dans un ratio de 1:1:1. Afin de préparer les peptides, une digestion sur billes a été effectuée avec de la trypsine. Brièvement, les billes ont été lavées 5 fois avec une solution de 20mM ammonium bicarbonate ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ). Puis, les protéines ont été réduites pendant 30 minutes à 60°C dans un volume équivalent à celui des billes à l'aide d'une solution de 10mM DTT, 20mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Les protéines ont ensuite été alkylées en ajoutant un volume égal à celui des billes d'une solution de 15mM iodoacetamide, 20mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pendant 1h à température ambiante. La concentration en DTT des échantillons a été augmentée à 15mM et les protéines ont été digérées avec 1 $\mu\text{g}$  de Trypsine Gold (Promega; V5280) pendant 16-18h à 37°C. La digestion a été arrêtée en ajoutant de l'acide formique 10% afin d'obtenir une concentration finale de 1%. Les échantillons ont été centrifugés à 3000rpm pendant 1 minute et le surnageant contenant les peptides a été transféré dans des tubes LoBind (Eppendorf; 13-698-794). Les billes ont été rincées pendant 5 minutes avec une solution de 60% acétonitrile, 0,1% acide formique, centrifugées et le surnageant a été combiné avec le précédent. Les peptides ont été lyophilisés à l'aide d'un Speed Vac et resuspendus dans 20 $\mu\text{L}$  de 0,1% acide trifluoroacétique. Afin de réduire la concentration en sels des échantillons, les peptides ont été passés dans des ZipTip (Millipore; ZTC18S096) et ils ont été resuspendus dans 25 $\mu\text{L}$  d'acide formique 1%. Les échantillons ont été envoyés pour analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) à la Plateforme de protéomique de l'Université de Sherbrooke. Brièvement, les peptides ont été séparés à l'aide du système Easy nLC et 5 $\mu\text{L}$  d'échantillon ont été injectés. Les peptides ont été élués par un gradient de 10 à 60% de solvant B (90% acétonitrile et 0,1% acide formique) à débit constant de 250nL/min pendant 240 minutes. Le système de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été couplé avec un spectromètre de masse QExactive Orbitrap via une interface nanoscale LC (Dionex Ultimate 3000; Thermo Fisher Scientific). La vaporisation a été effectuée à un voltage de 2kV et une température du capillaire de 270°C. L'acquisition du spectre ratio masse/charge ( $m/z$ ) de 350 à 1600 a été réalisée à une résolution de 70 000 à une  $m/z$  de 400 en mode d'ions positifs suite à

l'accumulation de 1 000 000 d'ions. Jusqu'à 10 ions les plus intenses ont été séquencés par HCD « higher energy collisional dissociation » dans l'Orbitrap. L'état de charge des ions précurseurs ont été évalués et les peptides ayant une charge non assignée ou de 1, 7, 8 et >8 ont été exclues. La liste d'exclusion dynamique a été limitée à un maximum de 500 entrées avec une période de rétention maximale de 40 secondes et une fenêtre de masse relative de 10ppm. Les mesures par l'Orbitrap ont été réalisées en mode de calibrage « lock mass » afin d'améliorer la précision des masses. Les données ont été acquises à l'aide du logiciel Xcalibur (version 2.1) et quantifiées à l'aide du logiciel MaxQuant (version 1.4.1.2). La recherche dans les banques de données a été effectuée dans le répertoire *Homo sapiens* d'Uniprot à l'aide d'Andromeda. Les tolérances de la masse initiale et de MS/MS ont été respectivement fixées à 20ppm et 0,5Da. La carbamidométhylation des cystéines a été considérée comme une modification fixe. Le taux de faux positif a été fixé à 0,01 et les peptides ayant un minimum de 7 résidus ont été analysés.

## 12. Mesure des niveaux intracellulaire d'ATP et d'ADP

Les cellules PANC1 ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits à une densité de 10 000 cellules par puit. Le lendemain, les cellules ont été traitées pendant 24h avec les différentes drogues. Les niveaux d'ATP et d'ADP ont été mesurés à l'aide du kit ApoSENSOR™ (BioVision; K255-200) en suivant les instructions du fabricant. Dans une plaque à 96 puits pour lecteur luminomètre, une solution de 5µL de « ATP monitoring enzyme » et 95µL de « Nucleotide releasing buffer » (NRB) a été ajoutée par puit et une lecture du bruit de fond a été prise. Entre temps, le milieu de culture a été aspiré et les cellules ont été incubées avec 50µL/puit de la solution NRB 5 minutes à température ambiante. Ensuite, ces 50µL de NRB ont été ajoutés aux puits de la plaque à luminomètre précédemment préparée et la plaque a été incubée 10 minutes à température ambiante dans la noirceur. Une lecture des échantillons a été prise pour mesurer les niveaux d'ATP (donnée A). Pour mesurer les niveaux d'ADP, une deuxième

lecture (donnée B) a été prise 10 minutes après la lecture A puis 10µL/puit de « ADP converting enzyme » dilué 1:10 dans le tampon NRB ont été ajoutés. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante une dernière lecture (donnée C) a été prise. Le ratio ATP/ADP des échantillons est obtenu par le calcul suivant : 
$$\frac{D \text{ (donnée A)}}{D \text{ (donnée C-D)} \text{ (donnée B (A))}}$$

### 13. Coloration à l'acide périodique de Schiff

Les cellules ont étéensemencées sur des lamelles insérées dans les puits de plaques à 6 puits. Le lendemain, les cellules ont été traitées ou non (DMSO) avec l'inhibiteur des GSK3 CHIR99021 pendant 24h. Afin d'évaluer le contenu en glycogène des cellules, elles ont été colorées à l'aide du « Periodic acid Schiff » (PAS) (Sigma Aldrich; 395B). Brièvement, les cellules ont été rincées avec du PBS et fixées avec 2% PFA dans du PBS pendant 20 minutes. Ensuite, les cellules ont été rincées avec du PBS puis incubées avec de l'acide périodique pendant 5 minutes. Par la suite, les cellules ont été rincées à l'eau pendant 2 minutes et incubées avec le réactif de Schiff pendant 15 minutes. Enfin, les cellules ont été rincées deux fois dans de l'eau pendant 2 minutes et les lamelles ont été montées sur des lames à l'aide d'Immu-Mount.

### 14. Densitométrie et statistiques

La densitométrie a été effectuée à l'aide du logiciel ImageJ version 1.47d sur les immunobuvardages présentés d'une expérience représentative en calculant le ratio de l'expression de la protéine d'intérêt sur l'expression de la GAPDH. Lorsque spécifié, la densitométrie a été effectuée sur plusieurs expériences et cumulées.

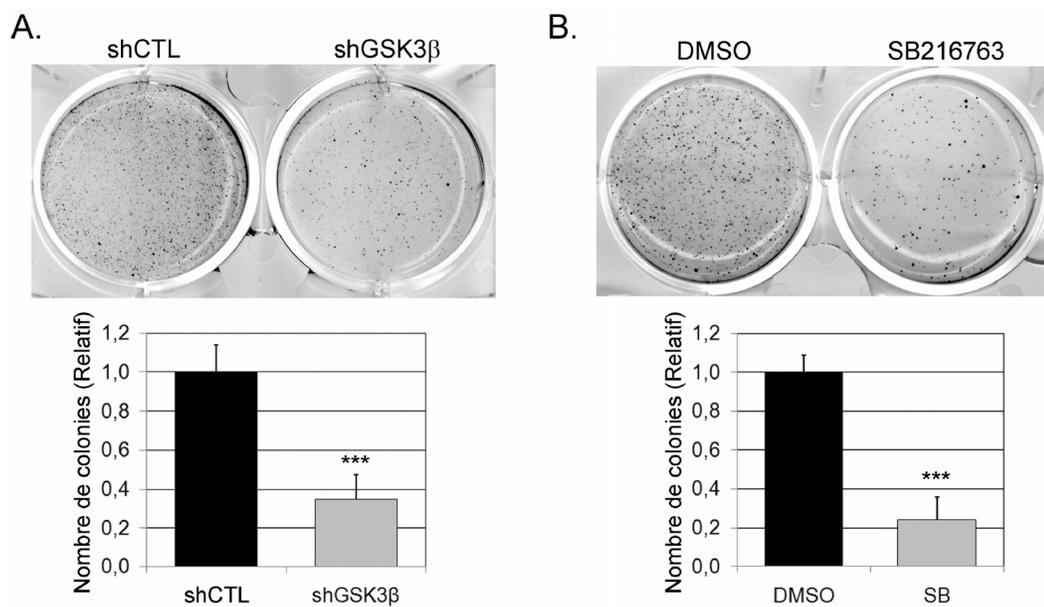
Toutes les statistiques ont été calculées avec soit le logiciel Microsoft Excel ou GraphPad Prism6 à l'aide du test de Student. Un  $p \leq 0,05$  a été considéré comme statistiquement significatif.

### III- Résultats:

#### 1- L'inhibition de l'activité des GSK3 induit l'apoptose et l'autophagie dans les cellules épithéliales pancréatiques tumorales

Pour supporter un rôle positif des GSK3 dans la croissance des cellules pancréatiques tumorales humaines, nous avons évalué l'impact de l'inhibition des GSK3 sur leur capacité de croissance en indépendance d'ancrage, une caractéristique de cellules transformées. Les cellules pancréatiques tumorales PANC1 ont été infectées avec des lentivirus codant soit un shARN contrôle (shCTL) ou un shGSK3 $\beta$ . Puis, ces cellules exprimant le shCTL ou le shGSK3 $\beta$  ont été ensemencées dans du milieu de culture contenant de l'agarose (agarose mou) et ont été cultivées pendant 3 semaines. Nous avons observé que la déplétion de l'expression de GSK3 $\beta$  a réduit de 65% le nombre de colonies formées par rapport aux cellules shCTL (Figure 7A). Ce résultat a été confirmé dans les cellules PANC1 ensemencées en agarose mou et traitées avec l'inhibiteur des GSK3, le SB216763. En effet, le nombre de colonies formées par les cellules PANC1 est réduit de 76% suite à l'inhibition pharmacologique des GSK3 (Figure 7B). L'activité des GSK3 est donc requise pour la croissance en indépendance d'ancrage des cellules pancréatiques tumorales. De plus, nous avons démontré que l'inhibition prolongée des GSK3 induit une réponse apoptotique dans les cellules pancréatiques tumorales (Marchand et al., 2012). En effet, le traitement des cellules pancréatiques tumorales PANC1 pendant 72h avec les inhibiteurs pharmacologiques spécifiques des GSK3 (SB216763 et CHIR99021) induit le clivage de PARP et de la caspase 7, deux marqueurs d'apoptose (Figure 8A-B). L'induction de l'apoptose pourrait contribuer à la diminution de croissance en agarose mou observée dans les cellules PANC1 suite à l'inhibition des GSK3 (Figure 7).

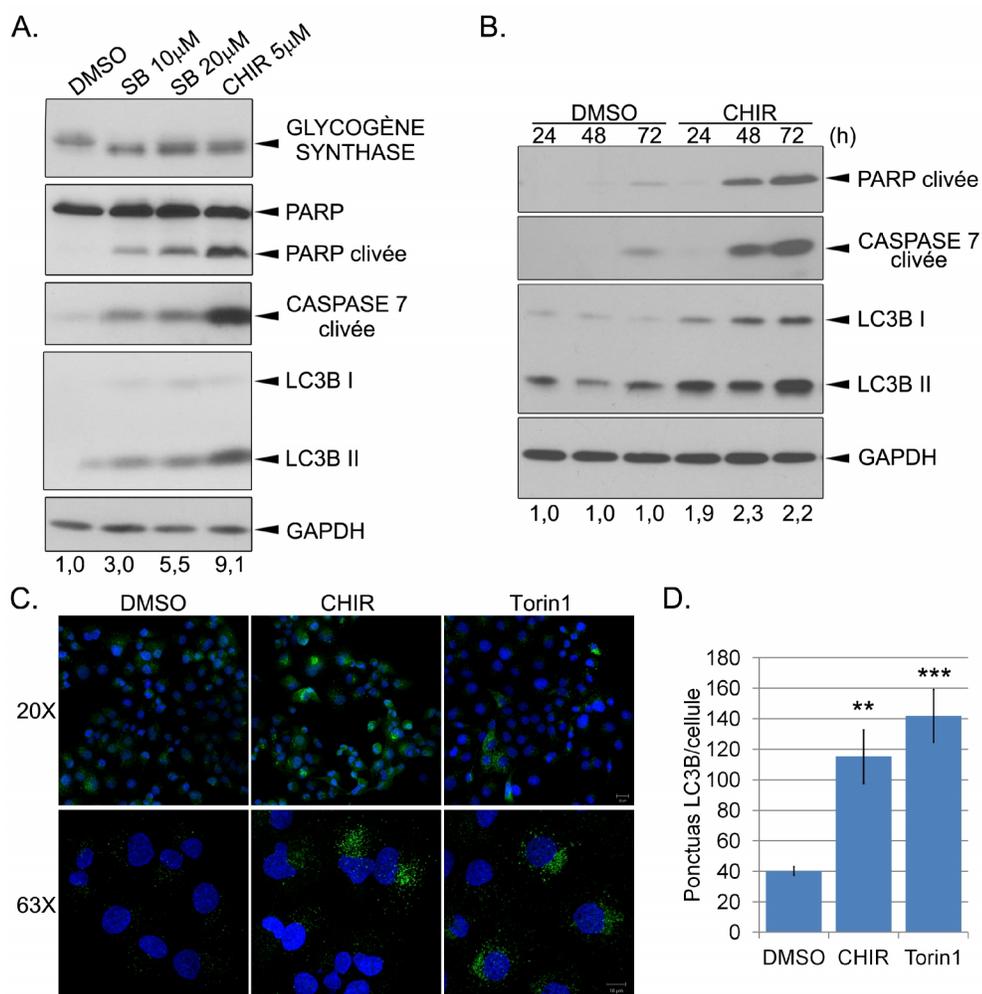
Précédemment, une étude a démontré dans les cellules de cancer de la prostate que l'inhibition des GSK3 peut induire la mort cellulaire tout en menant à



**Figure 7 : L'inhibition de l'activité des GSK3 réduit la croissance en indépendance d'ancrage des cellules pancréatiques tumorales. A)** Les cellules PANC1 ont été infectées avec des lentivirus codant soit un shARN non ciblant (shCTL) ou un shGSK3β. Quarante-huit heures post-infection, les cellules ont étéensemencées dans du milieu de culture contenant de l'agarose (en agarose mou). **B)** Les cellules PANC1 ont étéensemencées en agarose mou et à partir du lendemain traitées avec l'inhibiteur des GSK3, SB216763 20μM (SB), ou sans (DMSO). **A-B)** Les cellules ont été cultivées en agarose mou pendant 3 semaines avant la coloration des colonies à l'aide de MTT. La photo d'une expérience représentative est montrée. Les colonies formées ont été dénombrées à l'aide du logiciel ImageJ. Le nombre de colonies dans les cellules contrôles (shCTL ou DMSO) a été fixé à 1. \*\*\* p<0,001. n=3-7

une accumulation de l'expression de BIF1 associée à l'induction de l'autophagie (J. Yang et al., 2010). Une induction de l'autophagie suite à l'inhibition de l'activité des GSK3 a également été observé dans des cellules mammaires tumorales et de neuroblastomes (Azoulay-Alfaguter et al., 2014; Parr et al., 2012). Afin d'évaluer l'influence de l'activité des GSK3 sur le processus d'autophagie dans les cellules pancréatiques tumorales, nous avons analysé l'expression de la protéine LC3B, un marqueur de l'autophagie. Lors de l'induction de l'autophagie, la protéine LC3 (LC3 I) est modifiée sous sa forme II permettant son association avec la membrane des vésicules autophagiques. Tout d'abord, nous avons observé que l'expression de la protéine LC3B II est augmentée dans les cellules PANC1 suite à l'inhibition de l'activité des GSK3, par les traitements aux SB216763 et CHIR99021 (CHIR), suggérant une induction de l'autophagie (Figure 8A-B). De façon intéressante, l'augmentation de l'expression de LC3B II induite par le traitement au CHIR est observée dès 24h et devance l'augmentation du clivage de PARP et de la caspase 7 qui sont observées qu'à partir de 48h (Figure 8B). Ceci suggère que l'autophagie induite suite à l'inhibition de l'activité des GSK3 précéderait la réponse apoptotique. Afin de mieux visualiser l'induction de l'autophagie suite à l'inhibition des GSK3, nous avons effectué une immunofluorescence dirigée contre la protéine LC3B. Dans les cellules PANC1 non traitées (DMSO), un signal ponctué de LC3B est observé, témoignant de sa localisation aux autophagosomes, et suggérant donc un certain niveau d'autophagie à l'état basal dans les cellules PANC1 (Figure 8C). Le traitement des cellules PANC1 pendant 24h avec l'inhibiteur CHIR a augmenté le nombre de ponctua de LC3B (autophagosomes) par cellules comparativement aux cellules contrôles (DMSO) (Figure 8C-D). Une augmentation similaire des ponctuas LC3B est également observée suite au traitement des cellules avec un inducteur d'autophagie, l'inhibiteur de mTOR (Torin1).

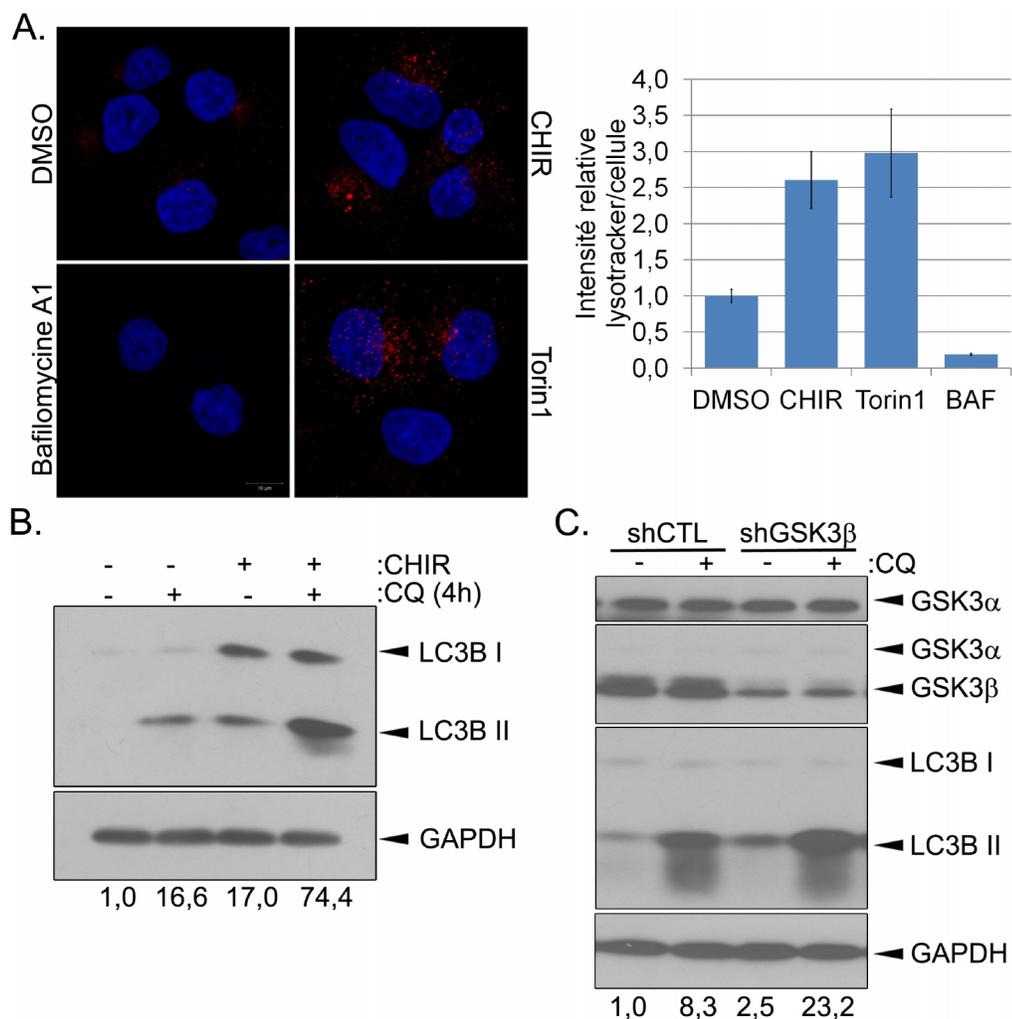
Puisqu'un défaut de la dégradation lysosomale pourrait également entraîner une augmentation d'expression de la protéine LC3B et fausser l'interprétation de nos résultats, nous avons donc approfondi l'analyse de l'induction de l'autophagie. Pour ce faire, nous avons premièrement procédé au marquage des lysosomes à



**Figure 8 : L'inhibition des GSK3 augmente les niveaux de LC3B II et sa localisation aux autophagosomes dans les cellules PANC1. A)** Les cellules PANC1 ont été traitées pendant 72h sans (DMSO) ou avec les inhibiteurs de GSK3 SB216763 (SB) et CHIR99021 (CHIR) aux concentrations indiquées. **B)** Les cellules PANC1 ont été traitées avec le CHIR (5  $\mu$ M) pour les périodes de temps spécifiées. **A-B)** L'expression des marqueurs d'apoptose (PARP et caspase 7 clivées) et d'autophagie (LC3B) a été évaluée par immunobuvardage. La densitométrie a été calculé à l'aide du logiciel imageJ et le ratio LC3B II/GAPDH relatif aux contrôles DMSO est indiqué. **C)** Les cellules PANC1 ont été traitées pendant 24h sans (DMSO) ou avec l'inhibiteur des GSK3 (CHIR; 5  $\mu$ M) ou de mTOR (Torin1; 250nM). L'expression de LC3B a été visualisée par immunofluorescence et les noyaux ont été marqués avec du DAPI. Les autophagosomes (signal ponctué de LC3B) ont été observés par microscopie confocale avec des objectifs de 20x et 63x. Les images correspondent à une série de 6-7 (20x) ou de 5-11 (63x) plans focaux à intervalle de 1 ou 0,33  $\mu$ m respectivement. **D)** Les ponctuas LC3B des immunofluorescences à 63x de l'expérience représentée en **C)** ont été dénombrés à l'aide du logiciel imageJ pour 10-16 cellules. Le nombre moyen de ponctuas LC3B par cellule et le SEM sont montrés \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

l'aide du lysotracker dans les cellules PANC1. Nous avons observé un marquage plus important des lysosomes dans les cellules où les GSK3 (CHIR) ou mTOR (Torin1) sont inhibés pendant 24h (Figure 9A). La spécificité du signal du lysotracker a été confirmée par l'utilisation de la Bafilomycine A1 (BAF), un inhibiteur des V-ATPases, qui bloque l'acidification des lysosomes. En effet, le traitement avec la Bafilomycine A1 a entraîné la perte du marquage des lysosomes. Nos résultats suggèrent que l'inhibition des GSK3 ou de mTOR favorise la formation de lysosomes dans les cellules pancréatiques tumorales humaines.

Jusqu'à présent, nous avons analysé l'autophagie à l'aide de mesures statiques, c'est-à-dire nous avons évalué l'expression de LC3B à un moment précis. Or, l'autophagie est un processus très dynamique, ce qui signifie que la simple mesure du niveau de LC3B à un temps précis n'est pas nécessairement représentative de l'activité autophagie. Nous avons donc mesuré le flux autophagique, une technique qui permet l'évaluation dynamique du processus autophagique donnant une mesure plus fiable. Le flux autophagique a été évalué en mesurant les niveaux de LC3B II avant et après une courte inhibition de la dégradation du contenu des autophagosomes à l'aide de la chloroquine (CQ) ou de la Bafilomycine A1 qui bloquent l'acidification de lysosomes. Dans un premier temps, les GSK3 ont été inhibées dans les cellules PANC1 à l'aide de l'inhibiteur CHIR (Figure 9B) ou du shGSK3 $\beta$  (Figure 9C) pendant 48 et 72h respectivement. La chloroquine a ensuite été ajoutée durant les 4 dernières heures de l'inhibition des GSK3. Tout comme observé aux figures 8A et B, l'inhibition des GSK3, en absence de chloroquine, a augmenté les niveaux d'expression de LC3B II. L'ajout de la chloroquine a permis l'accumulation de la protéine LC3B II dans les cellules contrôles (DMSO et shCTL) (Figure 9B-C). Cette accumulation de LC3B II démontre que le processus d'autophagie est actif dans les cellules PANC1 à l'état basal. De plus, l'ajout de chloroquine dans les cellules où les GSK3 ont été inhibées (CHIR ou shGSK3 $\beta$ ) a augmenté l'expression de LC3B II pour atteindre des niveaux d'expression plus élevés que ceux dans les cellules contrôles avec

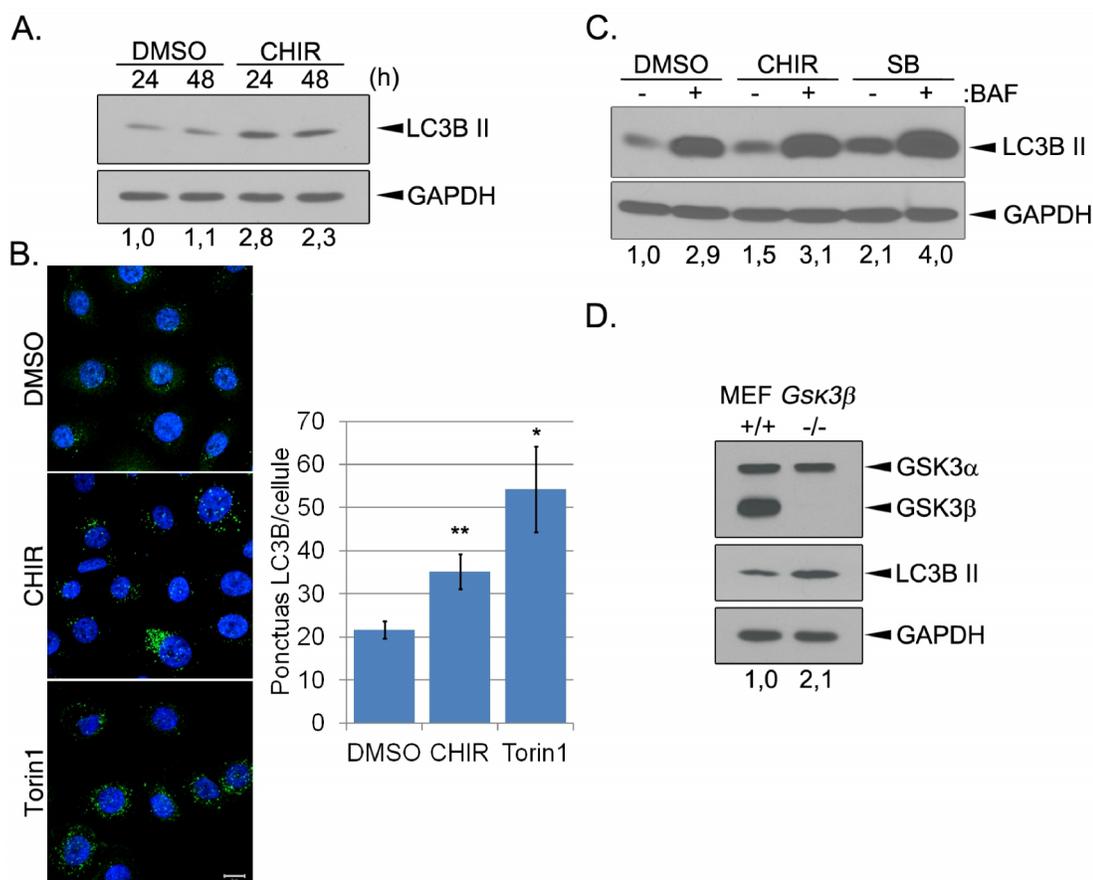


**Figure 9: L'analyse du flux autophagique dans les cellules PANC1 suite à l'inhibition des GSK3.** **A)** Les cellules PANC1 ont été traitées 24h sans (DMSO) ou avec l'inhibiteur des GSK3 (CHIR99021; CHIR; 5 $\mu$ M), de mTOR (Torin1; 250nM) ou la Bafilomycine A1 (BAF; 50nM). Les lysosomes ont été marqués à l'aide du lysotracker (50nM) et ont été visualisés par microscopie confocale à 63x. Les noyaux ont été marqués avec du DAPI. Les images correspondent à une série de 7-9 plans focaux à intervalle de 0,3 $\mu$ m. L'intensité du signal lysotracker a été mesurée à l'aide du logiciel imageJ pour 2-19 cellules. L'intensité du signal lysotracker des cellules contrôles (DMSO) a été fixée à 1. L'intensité du lysotracker par cellule et le SEM sont montrés. **B)** Les cellules PANC1 ont été traitées 48h sans (DMSO) ou avec l'inhibiteur CHIR 5 $\mu$ M. **C)** Les cellules PANC1 ont été infectées avec des lentivirus codant pour un shcontrôle ou un shGSK3 $\beta$ . **B-C)** La chloroquine (CQ; 25 $\mu$ M) a été ajoutée 4h avant la lyse des cellules afin de mesurer l'accumulation de LC3B II (flux autophagique). L'expression de LC3B et de la GAPDH a été évaluée par immunobuvardage. Les niveaux d'expression de LC3B II normalisée avec la GAPDH ont été calculés par densitométrie avec ImageJ et les valeurs relatives à la piste contrôle sont indiquées.

chloroquine. Ce résultat démontre que l'augmentation de LC3B II observée suite à l'inhibition des GSK3 dans les cellules PANC1 provient d'une induction de l'autophagie et non d'un problème de dégradation des autophagosomes. Nos résultats démontrent que l'inhibition de l'activité des GSK3 induit le flux autophagique dans les cellules pancréatiques tumorales.

## 2- La stimulation de l'autophagie induite suite à l'inhibition des GSK3 n'est pas restreinte aux cellules pancréatiques tumorales humaines

Précédemment, nous n'avons pas observé de clivage de PARP ni de la caspase 7 suivant l'inhibition des GSK3 dans les cellules humaines pancréatiques ductales épithéliales immortalisées (HPDE) suggérant que la réponse apoptotique induite par l'inhibition des GSK3 est spécifique aux cellules pancréatiques tumorales (Marchand et al., 2012). Donc, les niveaux d'autophagie ont été analysés suite à l'inhibition de l'activité des GSK3 dans des cellules pancréatiques non tumorales HPDE. D'abord, le traitement des cellules HPDE avec l'inhibiteur des GSK3 (CHIR) a induit dès 24h une augmentation de l'expression de la protéine LC3B II par rapport aux cellules non traitées (DMSO) (Figure 10A). De plus, nous avons observé, comme illustré en figure 10B, que le traitement des cellules HPDE pendant 24h avec le CHIR augmente le signal ponctué de LC3B (autophagosomes) comparativement aux cellules non traitées (DMSO), tel que visualisé par immunofluorescence. D'ailleurs, de façon similaire au traitement CHIR, le traitement des cellules pendant 24h avec la Torin1, un inducteur connu de l'autophagie, a augmenté le marquage ponctué de LC3B par cellules. L'induction de l'autophagie suite à l'inhibition des GSK3 dans les cellules HPDE est également confirmée par une analyse du flux autophagique. En effet, l'ajout de Bafilomycine A1 dans les cellules traitées aux inhibiteurs des GSK3 (CHIR et SB216763) a mené à une accumulation de l'expression de LC3B II (Figure 10C). Ceci suggère que l'augmentation de l'expression de LC3B II dans les cellules traitées avec le CHIR99021 et le SB216763 n'est pas due à un problème de dégradation des autophagosomes, mais plutôt liée à une induction de l'autophagie.



**Figure 10: L'inhibition des GSK3 induit l'autophagie dans les cellules non tumorales HPDE et dans des fibroblastes d'embryons de souris, MEF. A)** Les cellules HPDE ont été traitées sans (DMSO) ou avec l'inhibiteur de GSK3 CHIR99021 (CHIR; 5 μM) pour les périodes de temps spécifiées. L'expression de LC3B et de la GAPDH a été évaluée par immunobuvardage. **B)** Les cellules HPDE ont été traitées 24h sans (DMSO) ou avec le CHIR (5 μM) ou l'inhibiteur de mTOR (Torin1; 250 nM). L'expression de LC3B a été visualisée par immunofluorescence et les noyaux ont été marqués avec du DAPI. Les autophagosomes (signal ponctué de LC3B) ont été observés par microscopie confocale à 63x. Les images correspondent à une série 7-9 (63x) plans focaux à intervalle de 0,3 μm. Les ponctuas LC3B des immunofluorescences de l'expérience représentée ont été dénombrés à l'aide du logiciel imageJ pour 7-30 cellules. Le nombre moyen de ponctuas LC3B par cellule et le SEM sont montrés \* p<0,05, \*\* p<0,01. **C)** Les cellules HPDE ont été traitées 24h sans (DMSO) ou avec les inhibiteurs de GSK3 SB216763 (SB; 20 μM) et CHIR (5 μM). La Bafilomycine A1 (BAF; 50 nM) a été ajoutée 5h avant la lyse des cellules afin de mesurer l'accumulation de LC3B II (flux autophagique). **D)** Les MEF *Gsk3β*<sup>+/+</sup> et *β*<sup>-/-</sup> ont été lysées et une quantité équivalente de protéines a été séparée par SDS-PAGE. **C-D)** L'expression de LC3B et de la GAPDH a été évaluée par immunobuvardage. **A,C-D)** La densitométrie a été calculé à l'aide du logiciel imageJ et normalisé par rapport à la GAPDH. Les valeurs du ratio LC3B II/GAPDH relatif aux contrôles (DMSO ou *Gsk3β*<sup>+/+</sup>) sont indiquées.

Afin d'évaluer l'effet de la délétion spécifique de *Gsk3 $\beta$*  sur l'autophagie dans un autre modèle de cellules non tumorales, nous avons utilisé les fibroblastes embryonnaires immortalisés issues des souris ayant une délétion pour *Gsk3 $\beta$*  (MEF *Gsk3 $\beta$ <sup>-/-</sup>*) ou des souris de type sauvage (MEF *Gsk3 $\beta$ <sup>+/+</sup>*). Les niveaux d'expression de LC3B II dans les MEF *Gsk3 $\beta$ <sup>-/-</sup>* sont plus élevés que dans les MEF *Gsk3 $\beta$ <sup>+/+</sup>* (Figure 10D). Ces résultats suggèrent donc que l'inhibition des GSK3 mène à la stimulation de l'autophagie dans plusieurs types cellulaires différents et que l'induction de l'autophagie, contrairement à celle de l'apoptose, ne semble pas spécifique aux cellules pancréatiques tumorales.

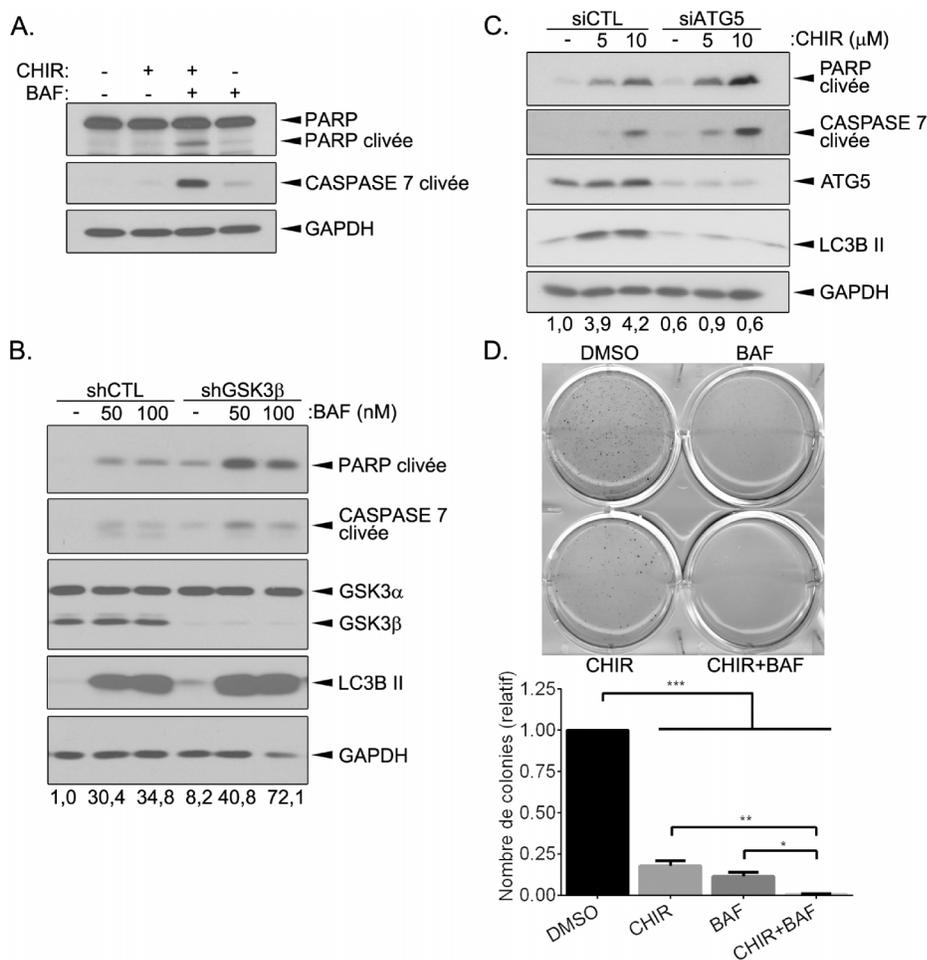
### 3- L'inhibition de l'autophagie sensibilise les cellules pancréatiques tumorales à l'apoptose induite par l'inhibition des GSK3.

Le rôle de l'autophagie dans la carcinogenèse est complexe et ce processus a été associé à des rôles pro- et anti-tumoraux selon le contexte (Gukovsky et al., 2013; Rui Kang & Tang, 2012; Morselli et al., 2009; Rubinsztein et al., 2012; White & DiPaola, 2009). Afin d'évaluer le rôle de l'autophagie dans les cellules pancréatiques tumorales humaines, nous avons évalué l'effet de son inhibition sur la survie. Nous avons inhibé l'autophagie en empêchant l'acidification des lysosomes et la dégradation du contenu des vésicules à l'aide de la Bafilomycine A1. Pour ce faire, les cellules PANC1 ont été traitées avec l'inhibiteur des GSK3 (CHIR) pendant 24h en présence ou non de Bafilomycine A1. Un traitement de 24h a été choisi puisque le clivage de PARP et de la caspase 7 ne sont pas observés à ce temps dans les cellules traitées au CHIR (Marchand et al., 2012 et Figure 8B). Nous avons observé que le traitement combiné du CHIR avec la Bafilomycine A1 induit le clivage de PARP et de la caspase 7 dans les cellules PANC1 comparativement aux traitements non combinés (Figure 11A). De façon similaire, le traitement des cellules PANC1 avec la Bafilomycine A1 a promu le clivage de PARP et de la caspase 7 induits par la déplétion de l'expression de GSK3 $\beta$  pendant 72h à l'aide d'un shARN spécifique (Figure 11B). À noter que nous avons observé que le traitement pendant 24h avec la Bafilomycine A1 seulement induit le

clivage de PARP et de la caspase 7 dans les cellules PANC1 infectées avec le shARN contrôle. Donc, nos résultats suggèrent que l'inhibition de l'autophagie sensibilise les cellules pancréatiques tumorales à l'apoptose induite par l'inhibition des GSK3.

Par la suite, nous avons inhibé l'autophagie de manière plus spécifique à l'aide d'un siARN ciblant la protéine ATG5 qui est requise pour l'élongation des autophagosomes. Les cellules PANC1 ont été transfectées avec le siATG5, puis 24h post-transfection elles ont été traitées 48h avec l'inhibiteur des GSK3 (CHIR). L'inhibition de l'autophagie par la déplétion de l'expression d'ATG5 est confirmée par le blocage de l'augmentation de l'expression de LC3B II induite par le CHIR (Figure 11C). La déplétion d'ATG5 dans les cellules PANC1 a promu le clivage de PARP et de la caspase 7 induit par le traitement CHIR en comparaison aux cellules exprimant un siARN contrôle. Ces résultats démontrent que l'inhibition de l'autophagie sensibilise les cellules pancréatiques tumorales à l'apoptose induite par l'inhibition des GSK3 et suggèrent donc que dans ce contexte, l'autophagie favorise la survie cellulaire.

Finalement, nous avons évalué l'effet de l'inhibition de l'autophagie sur la capacité de croissance en indépendance d'ancrage des cellules pancréatiques tumorales. Les cellules PANC1 ont étéensemencées en agarose mou et elles ont été traitées tous les jours avec l'inhibiteur CHIR, la Bafilomycine A1 ou la combinaison des deux. Après 3 semaines de croissance, le nombre de colonies formées a été mesuré. L'inhibition des GSK3 à l'aide du CHIR et l'inhibition de l'autophagie par la Bafilomycine A1 ont individuellement réduit le nombre de colonies formées par rapport aux cellules contrôles (DMSO) de 82% et 88% respectivement (Figure 11D). Ce résultat suggère que l'autophagie est nécessaire pour la croissance en indépendance d'ancrage des cellules PANC1. De plus, la combinaison du traitement avec le CHIR et la Bafilomycine A1 a réduit de 99% la formation de colonies par les cellules PANC1. Ainsi, la capacité de croissance en indépendance d'ancrage des cellules pancréatiques tumorales est davantage



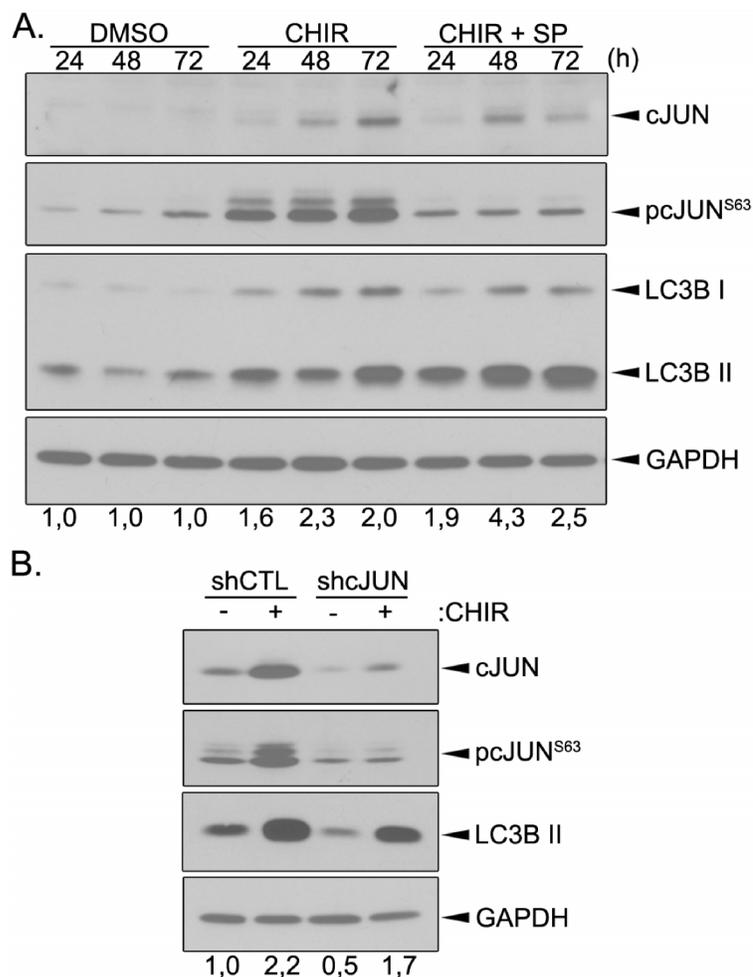
**Figure 11: L'inhibition de l'autophagie sensibilise les cellules pancréatiques tumorales à l'apoptose induite par l'inhibition des GSK3.** **A)** Les cellules PANC1 ont été traitées 24h sans (DMSO) et avec l'inhibiteur des GSK3 CHIR99021 (CHIR; 5 μM) seul ou combiné avec la Bafilomycine A1 (BAF; 50 nM). **B)** Les cellules PANC1 ont été infectées avec les lentivirus codant pour un shCTL ou shGSK3β. Quarante-huit heures post-infection, la Bafilomycine A1 a été ajoutée aux concentrations indiquées et les cellules ont été lysées après 24h. **C)** Les cellules PANC1 ont été transfectées avec un siATG5 ou un siARN contrôle (siCTL). Le lendemain, les cellules ont été traitées 48h sans (DMSO) et avec l'inhibiteur CHIR aux concentrations spécifiées. **A-C)** L'expression protéique a été évaluée par immunobuvardage avec les anticorps indiqués. **B-C)** La densitométrie a été calculée à l'aide du logiciel imageJ et normalisée par rapport à la GAPDH. Les valeurs du ratio LC3B II/GAPDH relatif aux contrôles sont indiquées. **D)** Les cellules PANC1 ont été ensemencées en agarose mou et à partir du lendemain traitées sans (DMSO) et avec le CHIR (5 μM) seul ou combiné avec la BAF (5 nM). Les cellules ont été cultivées en agarose mou pendant 3 semaines avant la coloration des colonies à l'aide de MTT. La photo d'une expérience représentative est montrée. Les colonies formées ont été dénombrées à l'aide du logiciel ImageJ et le nombre de colonies dans les cellules contrôles (DMSO) a été fixé à 1. \*\*\* p < 0,001, \*\* p < 0,01 et \* p < 0,05 (n=3-5)

réduite par l'inhibition combinée de l'autophagie et des GSK3 comparativement à leur inhibition individuelle.

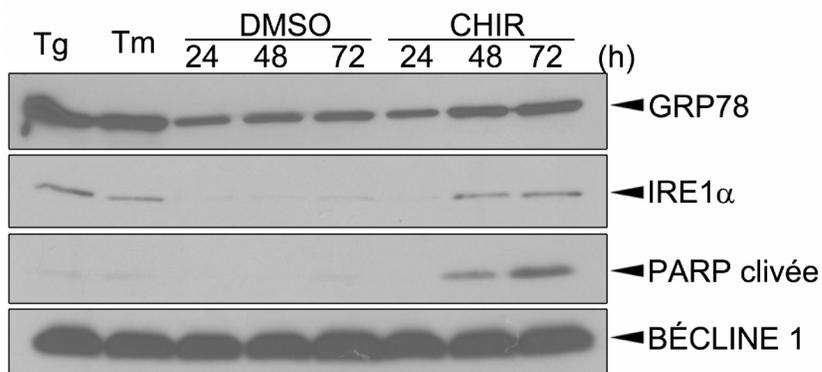
#### 4- L'inhibition des GSK3 induit l'autophagie indépendamment de la voie JNK-cJUN

Nous nous sommes par la suite intéressés plus particulièrement aux mécanismes moléculaires de la régulation de l'autophagie par les GSK3. Nous avons préalablement démontré que l'inhibition des GSK3 mène à l'activation de la voie JNK-cJUN qui est requise pour la réponse apoptotique (Marchand et al., 2012). Nous avons donc vérifié si l'activation de la voie JNK-cJUN contribue aussi à la stimulation de l'autophagie induite suite à l'inhibition des GSK3. Les cellules PANC1 ont été traitées de 24 à 72h avec l'inhibiteur CHIR seul ou combiné avec l'inhibiteur de JNK, le SP600125. L'inhibition de JNK n'a pas prévenu l'augmentation de l'expression de LC3B II induite par le CHIR (Figure 12A). Par la suite, nous avons évalué l'impact de l'inhibition des GSK3 dans les populations de cellules PANC1-shCTL et PANC1-shcJUN. Le traitement des cellules avec le CHIR a induit une augmentation de l'expression de LC3B II autant dans les populations PANC1-shCTL que PANC1-shcJUN (Figure 12B). Ces résultats suggèrent donc que l'autophagie est induite suite à l'inhibition des GSK3 indépendamment de la voie JNK-cJUN.

Il a été observé que la voie JNK peut être induite en réponse à un stress du réticulum endoplasmique, notamment via la voie de l'UPR IRE1 $\alpha$  (F. Urano et al., 2000). Lors d'un stress du réticulum endoplasmique, l'activation des voies de l'UPR peut induire l'apoptose, ainsi que l'autophagie (Senft & Ronai, 2015). Afin d'évaluer si l'inhibition des GSK3 menait à un stress du réticulum endoplasmique, nous avons évalué l'expression de protéines associées à l'UPR. Nous avons observé une augmentation de l'expression des protéines GRP78 et IRE1 $\alpha$  suite aux traitements de 48 et 72h avec l'inhibiteur des GSK3 (Figure 13). D'ailleurs, ces augmentations ont été observées à des temps d'inhibition des GSK3 induisant une



**Figure 12: L'activation de la voie JNK-cJUN n'est pas nécessaire pour l'induction de l'autophagie suite à l'inhibition des GSK3. A)** Les cellules PANC1 ont été traitées sans (DMSO) ou avec l'inhibiteur des GSK3 CHIR99021 (CHIR; 5 $\mu$ M) seul ou combiné avec l'inhibiteur de JNK SP600125 (SP; 25 $\mu$ M) pour les périodes de temps indiquées. **B)** Les populations stables de cellules PANC1-shCTL et PANC1-shcJUN ont été traitées 72h sans (DMSO; -) ou avec l'inhibiteur CHIR. **A-B)** L'expression protéique a été évaluée par immunobuvardage en utilisant les anticorps spécifiés. La densitométrie a été calculé à l'aide du logiciel imageJ et normalisé par rapport à la GAPDH. Les valeurs du ratio LC3B II/GAPDH relatif aux contrôles (DMSO ou shCTL) sont indiquées.

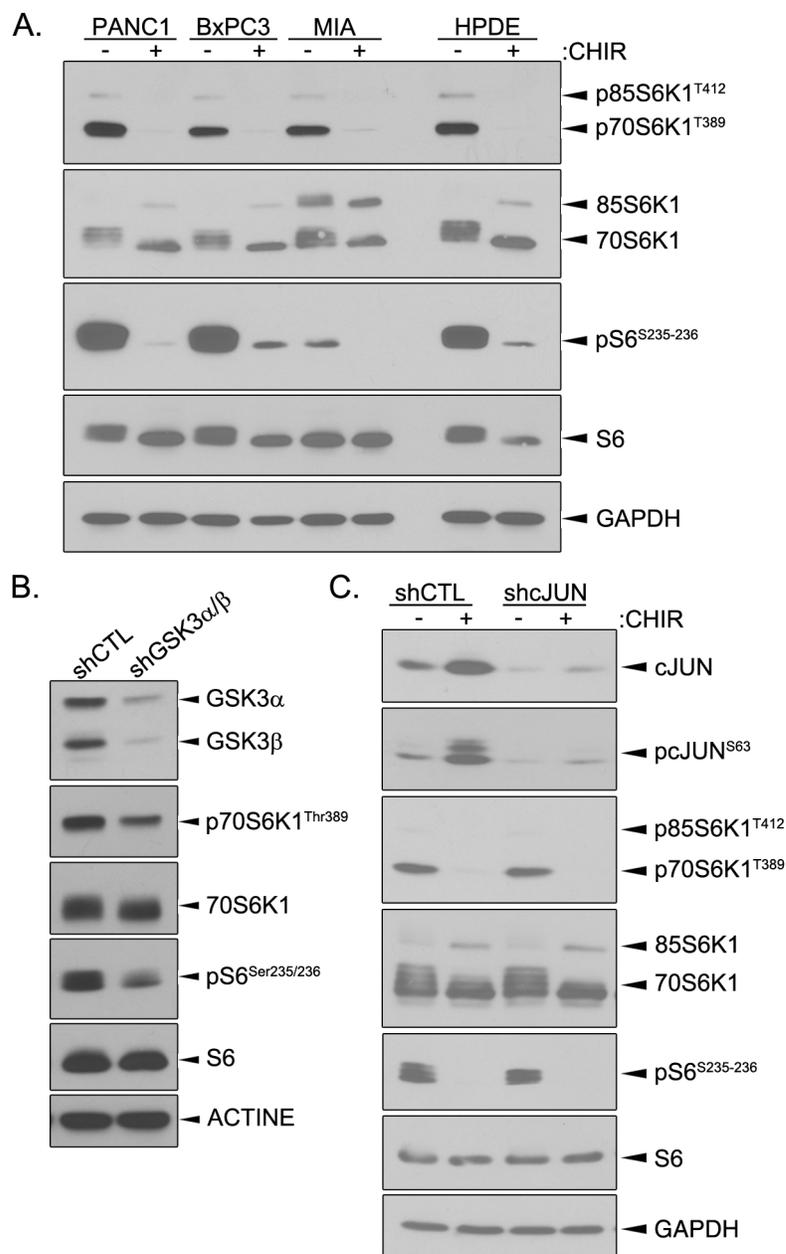


**Figure 13: L'inhibition des GSK3 augmente l'expression de protéines impliquées dans la réponse au stress du réticulum endoplasmique. A)** Les cellules PANC1 ont été traitées sans (DMSO) ou avec l'inhibiteur des GSK3 CHIR99021 (CHIR; 5 $\mu$ M) aux temps indiqués. Les cellules PANC1 ont également été traitées pendant 24h avec des inducteurs de stress du réticulum, la Thapsigargine (Tg; 200nM) ou la tunicamycine (Tm; 1 $\mu$ g/mL). L'expression protéique a été évaluée par immunobuvardage en utilisant les anticorps spécifiés.

augmentation du clivage de PARP. Une augmentation similaire de GRP78 et IRE1 $\alpha$  a aussi été observée suite aux traitements des cellules PANC1 pendant 24h avec deux inducteurs de stress du réticulum endoplasmique, la thapsigargine et la tunicamycine. Nos résultats suggèrent que l'inhibition prolongée (48h) de l'activité des GSK3 pourrait induire un stress du réticulum endoplasmique. Ceci suggère qu'il est possible que l'induction de l'autophagie observée dès 24h suite à l'inhibition des GSK3 (Figures 8B-C et 9B) ne soit pas due à une induction d'un stress du réticulum endoplasmique observée à 48h (Figure 13).

#### 5- L'inhibition de l'activité des GSK3 mène à l'inhibition de la voie mTOR

La voie mTOR, plus spécifiquement mTORC1, est une voie de signalisation connue pour jouer un rôle central dans la régulation de l'autophagie (Rabinowitz & White, 2010). Afin d'analyser l'activité de la signalisation mTORC1, nous avons évalué les niveaux de phosphorylation d'une cible en aval de mTORC1 la protéine S6K ainsi que de son substrat la protéine S6. Dans un premier temps, nous avons traité les cellules tumorales PANC1, BxPC3, MIA PaCa2 et non tumorales HPDE pendant 24h avec le CHIR. L'inhibition des GSK3 a réduit les niveaux de phosphorylation des protéines S6K1 et S6 (Figure 14A). De plus, la déplétion de l'expression des GSK3 à l'aide du shGSK3 $\alpha/\beta$  dans les cellules PANC1 a mené à une diminution de la phosphorylation des protéines S6K1 et S6 comparativement aux cellules exprimant le shARN contrôle (Figure 14B). Ces résultats suggèrent que l'inhibition des GSK3 mène à l'inhibition de la voie mTORC1 dans les cellules épithéliales pancréatiques. Des études ont démontré que la voie mTOR peut être régulée par la voie JNK-cJUN, notamment via la phosphorylation de Raptor par JNK (Fujishita et al., 2011). Malgré que l'activation de la voie JNK-cJUN ne soit pas requise pour l'induction de l'autophagie suite à l'inhibition des GSK3 (Figure 12), nous avons toutefois analysé si celle-ci influence la régulation de la voie mTOR par les GSK3. Afin d'exclure un impact de la régulation directe de cJUN par les GSK3, l'activité

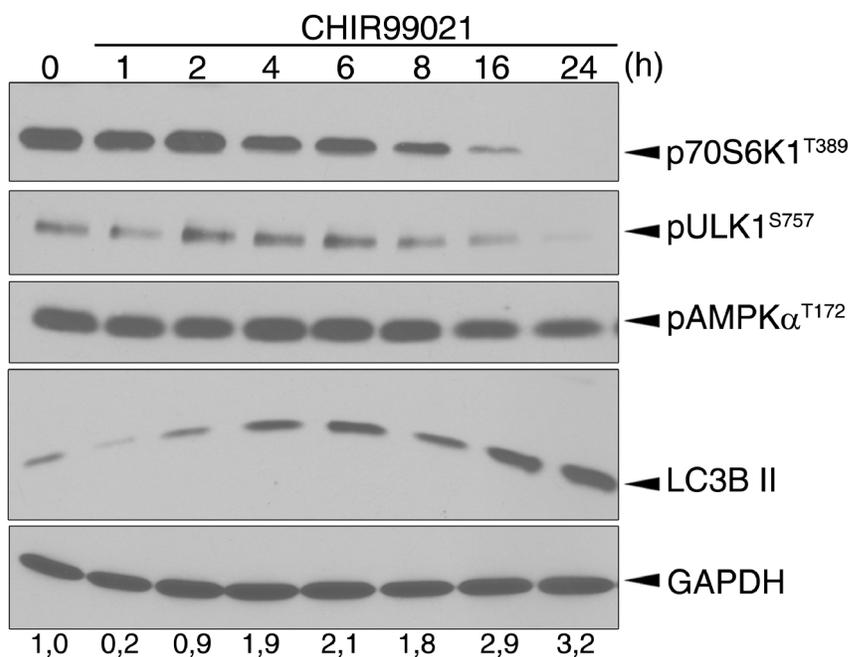


**Figure 14 : L'inhibition de l'activité des GSK3 inhibe l'axe S6K1-S6 en aval de mTORC1. A)** Les cellules PANC1, BxPC3, MIA PaCa2 (MIA) et HPDE ont été traitées 24h sans (DMSO) ou avec l'inhibiteur des GSK3 CHIR99021 (CHIR; 5 μM). **B)** Les cellules PANC1 ont été infectées avec des lentivirus codant pour un shcontrôle (shCTL) ou un shGSK3α + un shGSK3β (shGSK3α/β), puis elles ont été lysées 72h post-infection. **C)** Les populations stables de cellules PANC1-shCTL et PANC1-shcJUN ont été traitées 72h sans (DMSO) ou avec l'inhibiteur CHIR. **A-C)** L'expression protéique a été évaluée par immunobuvardage en utilisant les anticorps spécifiques.

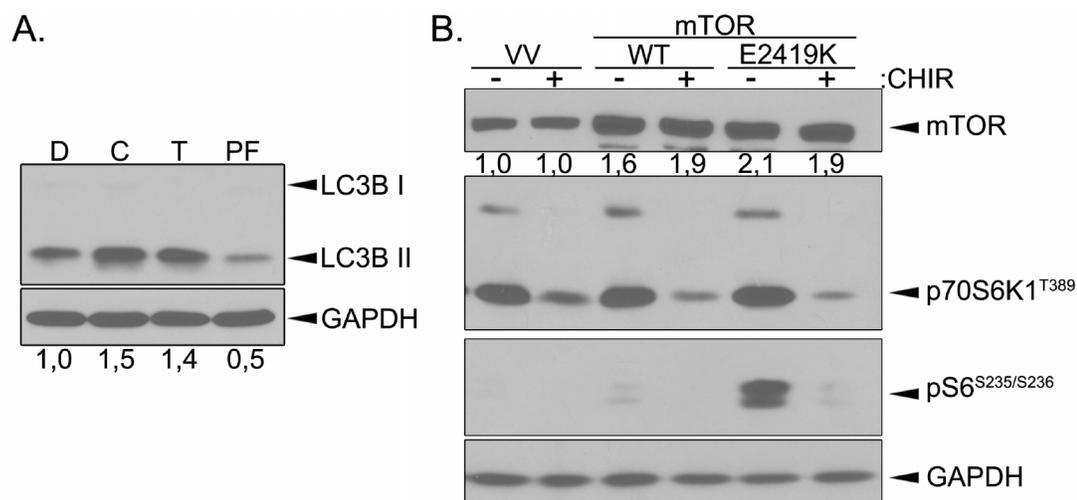
de la voie mTORC1 a été évaluée dans les cellules PANC1-shcJUN et PANC1-shCTL suite à l'inhibition des GSK3. Nous avons observé que la réduction de la phosphorylation des protéines S6K1 et S6 induites par le CHIR est équivalente dans ces deux populations de cellules (Figure 14C). La régulation par les GSK3 des voies de signalisation JNK-cJUN et S6K1-S6 semble donc s'effectuer de façon distincte.

Nous avons ensuite effectué une cinétique plus rapprochée de l'inhibition des GSK3 à l'aide de l'inhibiteur CHIR99021 dans les cellules PANC1. Nous avons observé une diminution de la phosphorylation de la protéine S6K1 à partir de 4h suite à l'inhibition des GSK3 (Figure 15). Cette inhibition corrèle avec une augmentation de l'expression de LC3B II. Il a été observé que la voie mTORC1 inhibe l'initiation de l'autophagie entre autres via la phosphorylation de la protéine ULK1 sur la sérine 757 (J. Kim et al., 2011). À cet égard, nous avons observé une réduction du niveau de phosphorylation d'ULK1 suite à l'inhibition des GSK3 (Figure 15). Par ailleurs, l'activité d'ULK1 peut également être favorisée par sa phosphorylation par l'AMPK (Egan et al., 2011; J. Kim et al., 2011), toutefois nous n'avons pas observé d'augmentation de la phosphorylation de l'AMPK $\alpha$  suite à l'inhibition des GSK3 (Figure 15). Nos résultats suggèrent que les GSK3 pourraient réguler l'autophagie dans les cellules pancréatiques tumorales humaines via la voie mTORC1 et possiblement la phosphorylation d'ULK1.

Puisque nos résultats démontraient l'inhibition de l'activité de la protéine S6K1 suite à l'inhibition des GSK3, nous avons évalué si l'inhibiteur de S6K1, le PF-4708671 (PF), était suffisant pour induire l'autophagie dans les cellules PANC1. Tel qu'observé précédemment, le traitement des cellules PANC1 pendant 48h avec le CHIR ou la Torin1 a induit une augmentation de l'expression de LC3B II comparativement aux cellules non traitées (DMSO) (Figure 16A). Par contre, l'inhibition de la S6K1 à l'aide du PF n'a pas induit d'augmentation de l'expression de LC3B II. Ce résultat suggère que l'inhibition de la protéine S6K1 est insuffisante pour induire l'autophagie dans les cellules pancréatiques tumorales. Afin d'évaluer



**Figure 15 : L'inhibition de l'activité des GSK3 réduit la phosphorylation d'ULK1 et de S6K1.** Les cellules PANC1 ont été traitées avec l'inhibiteur des GSK3 CHIR99021 (5 $\mu$ M) ou sans (DMSO; 0) pour les temps indiqués. L'expression protéique a été évaluée par immunobuvardage en utilisant les anticorps spécifiés. La densitométrie a été calculé à l'aide du logiciel imageJ et normalisé par rapport à la GAPDH. Les valeurs du ratio LC3B II/GAPDH relatif au contrôle (DMSO; 0) sont indiquées.



**Figure 16: L'expression d'un mutant mTOR E2419K ne prévient pas l'inhibition de l'axe S6K-S6 par l'inhibition des GSK3.** **A)** Les cellules PANC1 ont été traitées 48h avec l'inhibiteur des GSK3 CHIR99021 (CHIR; C; 5 $\mu$ M), de mTOR la Torin1 (T; 250nM) ou de la S6K1 le PF4708671 (PF; 20 $\mu$ M) ou sans (DMSO; D). **B)** Les cellules HEK293T ont été transfectées avec un vecteur vide (VV) ou le vecteur d'expression de la protéine mTOR de type sauvage (WT) ou mutée (E2419K). Vingt-quatre heures post-transfection, les cellules ont été traitées 24h avec l'inhibiteur CHIR99021 (CHIR; 5 $\mu$ M; +) ou sans (DMSO; -). **A-B)** L'expression protéique a été évaluée par immunobuvardage en utilisant les anticorps spécifiés. La densitométrie a été calculé à l'aide du logiciel imageJ et normalisé par rapport à la GAPDH. Les valeurs du ratio **A)** LC3B II/GAPDH ou **B)** mTOR/GAPDH relatif aux contrôles sont indiquées.

la contribution de l'axe S6K1-S6 dans la stimulation de l'autophagie induite suite à l'inhibition des GSK3, nous avons exprimé une protéine mTOR de type sauvage ou le mutant mTOR E2419K. Il a été observé que le mutant mTOR E2419K s'associe aux composantes des complexes mTORC1 et mTORC2 de façon similaire au mTOR de type sauvage (J. Urano et al., 2007). De façon intéressante, le mutant mTOR E2419K démontre une activation constitutive du complexe mTORC1 même lors d'une privation en nutriments qui mène généralement à l'inhibition de la voie mTOR. De légères augmentations de l'expression de mTOR sont observées dans les cellules transfectées avec un mTOR de type sauvage ou muté (Figure 16B). Nous avons observé une augmentation des niveaux de phosphorylation de la protéine S6 dans les cellules exprimant le mutant mTOR E2419K suggérant l'activation de sa signalisation en aval. Or, l'expression d'une protéine mTOR de type sauvage ou du mutant E2419K dans les cellules HEK293T ne prévient pas la réduction des niveaux de phosphorylation de S6K1 et de S6 induite par l'inhibition des GSK3 (Figure 16B). Ce résultat suggère que l'activité du mutant mTOR E2419K, comme celle de la protéine mTOR de type sauvage, est inhibée suite à l'inhibition des GSK3. Ainsi, l'expression de ce mutant mTOR ne permettrait pas de prévenir l'inhibition de la voie mTORC1 suite à l'inhibition des GSK3. Toutefois, il est à noter que la régulation de la S6K1 par les GSK3 pourrait également s'effectuer indépendamment de la voie mTOR.

#### 6- Les GSK3 et mTOR régulent le facteur de transcription EB (TFEB)

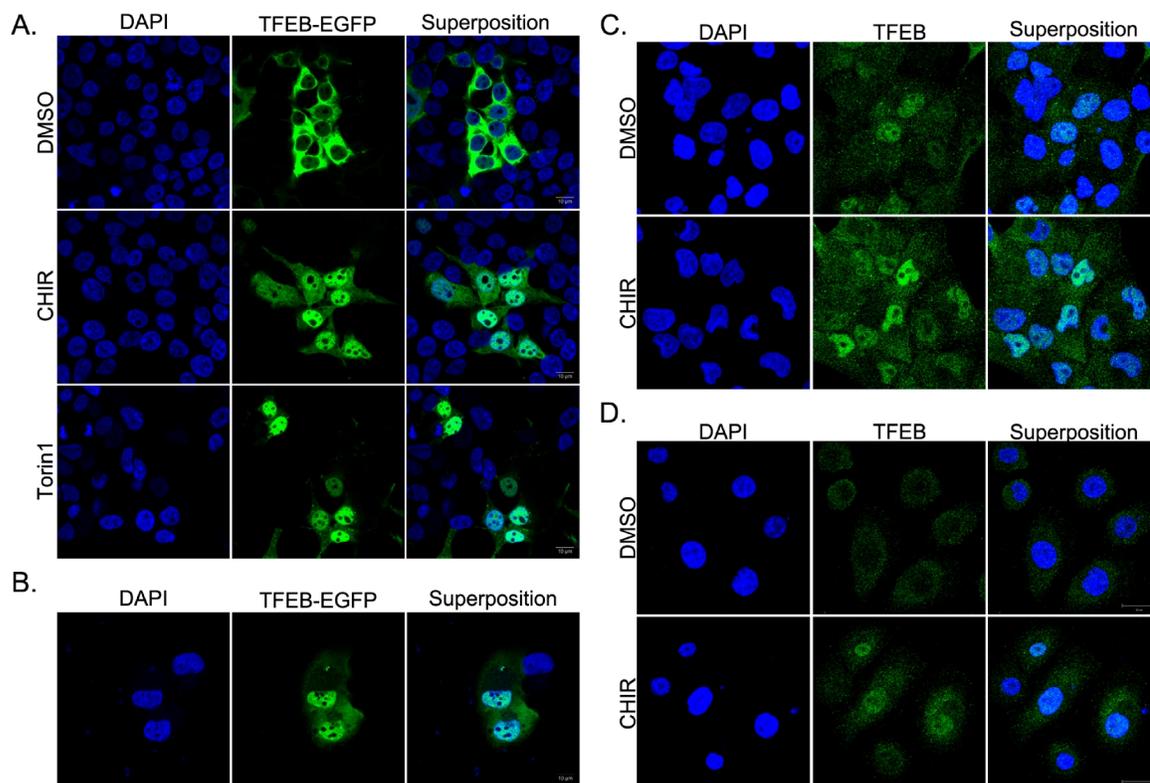
Récemment, quelques études ont démontré que la voie mTOR inhibe l'activité du facteur de transcription EB (TFEB), identifié comme un régulateur majeur de l'autophagie et de la biogenèse des lysosomes (Settembre, Fraldi, et al., 2013). La phosphorylation de TFEB par le complexe mTORC1 maintiendrait son expression au niveau du cytosol inhibant la transcription de ses gènes cibles associés à l'autophagie et aux lysosomes (Jose a. Martina et al., 2012). Nous avons donc évalué si les GSK3 régulaient TFEB puisque nos résultats suggéraient que l'inhibition des GSK3 mène à l'inactivation de la voie mTORC1.

### 6.1- Régulation de la localisation subcellulaire de TFEB par les GSK3 et mTOR

Nous avons premièrement analysé l'effet de l'inhibition des GSK3 sur la localisation subcellulaire de TFEB. Les cellules HEK293T et PANC1 ont été transfectées avec un vecteur d'expression d'une protéine TFEB fusionnée avec l'EGFP. Suite aux traitements de ces cellules pendant 1h avec l'inhibiteur des GSK3 (CHIR) et de mTOR (Torin1), la localisation de la protéine TFEB-EGFP a été visualisée par microscopie confocale. Dans les cellules HEK293T non traitées (DMSO), nous avons observé que la protéine TFEB-EGFP est majoritairement localisée au cytosol. De façon intéressante, la translocation nucléaire de la protéine TFEB-EGFP est observée suite aux traitements avec le CHIR ou la Torin1 (Figure 17A). De plus, la localisation de la protéine TFEB-EGFP observée à l'état basal dans les cellules PANC1 (Figure 17B) est majoritairement nucléaire contrairement aux cellules HEK293T où TFEB-EGFP est principalement retrouvée dans le cytosol (Figure 17A). Par la suite, la localisation de la protéine TFEB endogène a été visualisée par immunofluorescence afin de confirmer les résultats obtenus avec la protéine TFEB-EGFP. Tout comme l'expression de TFEB-EGFP, une expression nucléaire du TFEB endogène est observée dans la majorité des cellules PANC1 non traitées (Figure 17C). De plus, le traitement de ces cellules PANC1 avec le CHIR ou la Torin1 semble favoriser la localisation nucléaire de TFEB. Nous avons ensuite évalué la localisation de la protéine TFEB endogène dans les cellules pancréatiques non tumorales HPDE. Dans ces cellules, la protéine TFEB est localisée majoritairement au niveau du cytosol (Figure 17D). L'inhibition des GSK3 pendant 1h à l'aide du CHIR favorise la localisation nucléaire de TFEB (Figure 17D). Nos résultats démontrent que la présence au noyau de TFEB à l'état basal semble spécifique aux cellules pancréatiques tumorales (PANC1) et suggèrent que l'activité des GSK3 régulerait la localisation de TFEB.

### 6.2- Régulation de la phosphorylation de la protéine TFEB par les GSK3 et mTOR

Des études ont récemment démontré que la phosphorylation du facteur de



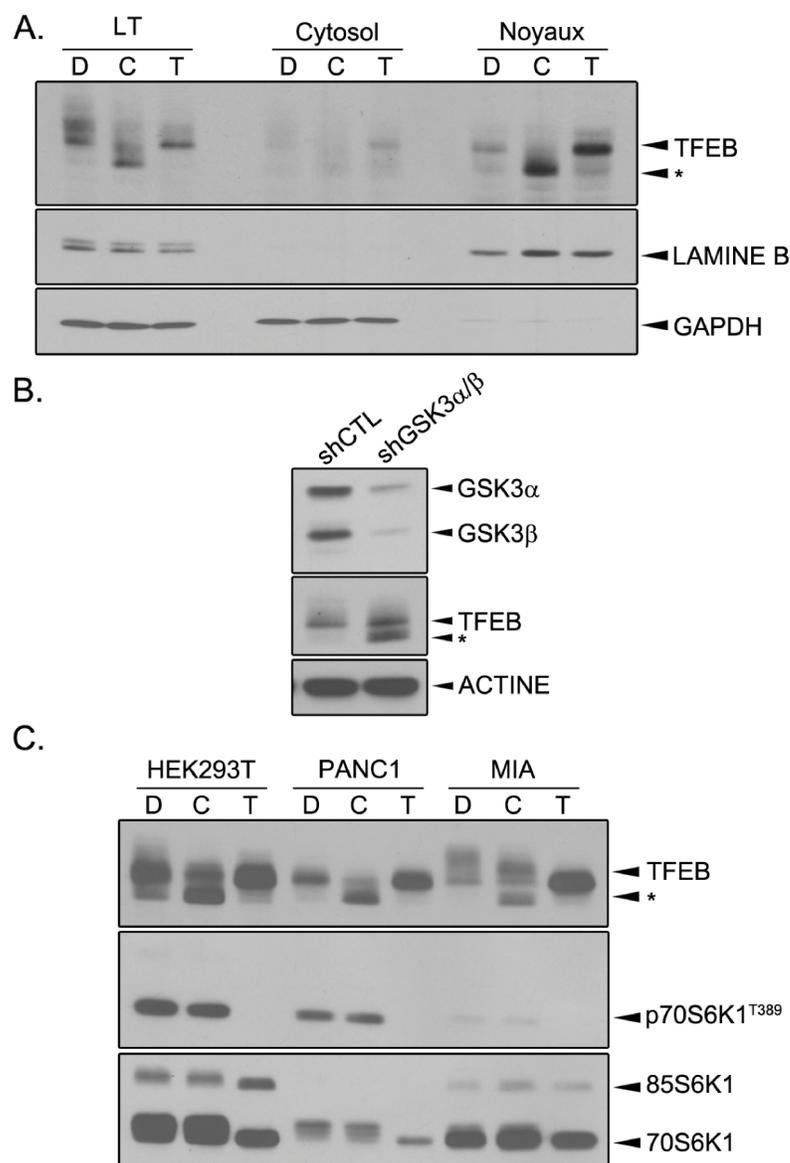
**Figure 17: L'inhibition des GSK3 et de mTOR favorise la localisation nucléaire de TFEB. A)** Les cellules HEK293T ont été transfectées avec le plasmide codant pour la protéine TFEB-EGFP. Le lendemain, ces cellules ont été traitées 1h sans (DMSO) ou avec l'inhibiteur des GSK3 (CHIR99021; CHIR; 5 $\mu$ M) ou l'inhibiteur de mTOR (Torin1; 250nM). **B)** Les cellules PANC1 ont été transfectées avec le plasmide codant pour la protéine TFEB-EGFP et n'ont pas été traitées. Les cellules **C)** PANC1 et **D)** HPDE ont été traitées 1h sans (DMSO) ou avec l'inhibiteur CHIR99021 (CHIR; 5 $\mu$ M). **A-D)** Les noyaux ont été marqués avec du DAPI. La localisation de la protéine **A-B)** TFEB-EGFP ou **C-D)** TFEB endogène (immunofluorescence) a été observée par microscopie confocale à 63X.

transcription TFEB, entre autres par mTORC1, maintient sa localisation cytosolique, notamment en favorisant son association avec les protéines 14-3-3, inhibant son activité (Jose a. Martina et al., 2012; Roczniak-Ferguson et al., 2012; Settembre et al., 2011, 2012). Nous avons donc évalué l'effet de l'inhibition

des GSK3 sur les niveaux de phosphorylation de la protéine TFEB. Tout d'abord, nous avons analysé le profil d'expression de la protéine TFEB dans les cellules PANC1 traitées 1h sans (DMSO) ou avec les inhibiteurs CHIR ou Torin1 par immunobuvardage. Nous avons observé l'expression de formes de plus faibles poids moléculaires de la protéine TFEB suite aux traitements avec le CHIR et la Torin1 comparativement aux cellules non traitées (Figure 18A). Les niveaux de TFEB ont aussi été évalués suite au fractionnement des protéines cytosoliques et nucléaires des mêmes échantillons. En accord avec nos résultats d'immunofluorescence de TFEB, la protéine TFEB est principalement détectée dans les extraits nucléaires (Figure 18A). D'ailleurs, dans les extraits nucléaires des cellules PANC1, un niveau élevé de TFEB est observée suite aux traitements avec le CHIR ou la Torin1 confirmant nos résultats obtenus par immunofluorescence suggérant une plus forte localisation nucléaire de TFEB suite à l'inhibition des GSK3. De façon intéressante, le signal associé à TFEB observée dans les extraits nucléaires correspond à des formes de plus faibles poids moléculaires. Dans les cellules PANC1, l'accélération de migration de la protéine TFEB observée suite à la déplétion des GSK3 pendant 72h à l'aide du shGSK3 $\alpha/\beta$  confirme les résultats obtenus avec le CHIR (Figure 18B). Enfin, les formes de plus faibles poids moléculaires de la protéine TFEB observées suite aux traitements avec le CHIR et la Torin1 dans les cellules PANC1 ont également été observées dans les cellules MIA PaCa2 et HEK293T (Figure 18A et C). Il est à noter que malgré que le CHIR et la Torin1 aient tous les deux induits une migration plus rapide de TFEB, le profil de migration de TFEB diffère entre les deux traitements suggérant une différence possible dans le mécanisme de régulation de TFEB (Figure 18A et C). De plus, l'inhibition de mTOR par la Torin1 pendant 1h corrèle avec une diminution de la phosphorylation de la S6K1, alors que le traitement de

1h avec le CHIR ne réduit pas significativement les niveaux de phosphorylation de la protéine S6K1 (Figure 18C). Malgré qu'une inhibition prolongée des GSK3 puisse mener à une diminution de la phosphorylation de la S6K1 (Figures 14A-B et 15), ce résultat suggère que les GSK3 pourraient réguler directement TFEB. Ces observations suggèrent donc que la protéine TFEB subit des modifications post-traductionnelles suite à l'inhibition des GSK3 ainsi que de mTOR.

La présence des bandes de plus faible poids moléculaire de la protéine TFEB pourrait être associée à une diminution de son niveau de phosphorylation. Nous avons donc effectué un essai phosphatase pour vérifier si la protéine TFEB est phosphorylée à l'état basal. Pour ce faire, les cellules HEK293T ont été transfectées avec le vecteur EGFP-N1-TFEB et la protéine TFEB-EGFP a été immunoprécipitée, puis incubée avec la  $\lambda$  phosphatase. Suite à l'essai phosphatase, nous avons observé l'expression d'une bande de plus faible poids moléculaire de TFEB-EGFP confirmant qu'à l'état basal TFEB est phosphorylée (Figure 19A). Puisqu'un anticorps phospho-spécifique pour TFEB n'était pas disponible commercialement, nous avons exploité la présence au niveau de la protéine TFEB d'une séquence qui constitue un motif de liaison aux protéines 14-3-3 (Jose a. Martina et al., 2012). Les protéines 14-3-3 interagissent avec de nombreuses protéines en se liant à un motif consensus de liaison lorsque celui-ci est phosphorylé sur sérine (Ser) ou thréonine (Thr), qui pour TFEB correspond à sa Ser211. Afin d'évaluer la phosphorylation de TFEB sur sa Ser211, nous avons donc utilisé un anticorps reconnaissant le motif consensus de liaison des 14-3-3 spécifiquement lorsque phosphorylé sur sérine. La protéine TFEB-EGFP a été exprimée dans les cellules HEK293T pendant 24h, puis les cellules ont été traitées 1h sans (DMSO) ou avec le CHIR ou la Torin1. Ensuite, la protéine TFEB-EGFP a été immunoprécipitée et la phosphorylation de sa Ser211 a été analysée. À l'état basal dans les cellules HEK293T non traitées, nous avons observé que la protéine TFEB-EGFP est phosphorylée sur sa Ser211 (Figure 19B). De plus dans ces cellules, les traitements avec le CHIR et la Torin1 ont diminué le niveau de phosphorylation de TFEB sur sa Ser211 (Figure 19B). Nos résultats démontrent

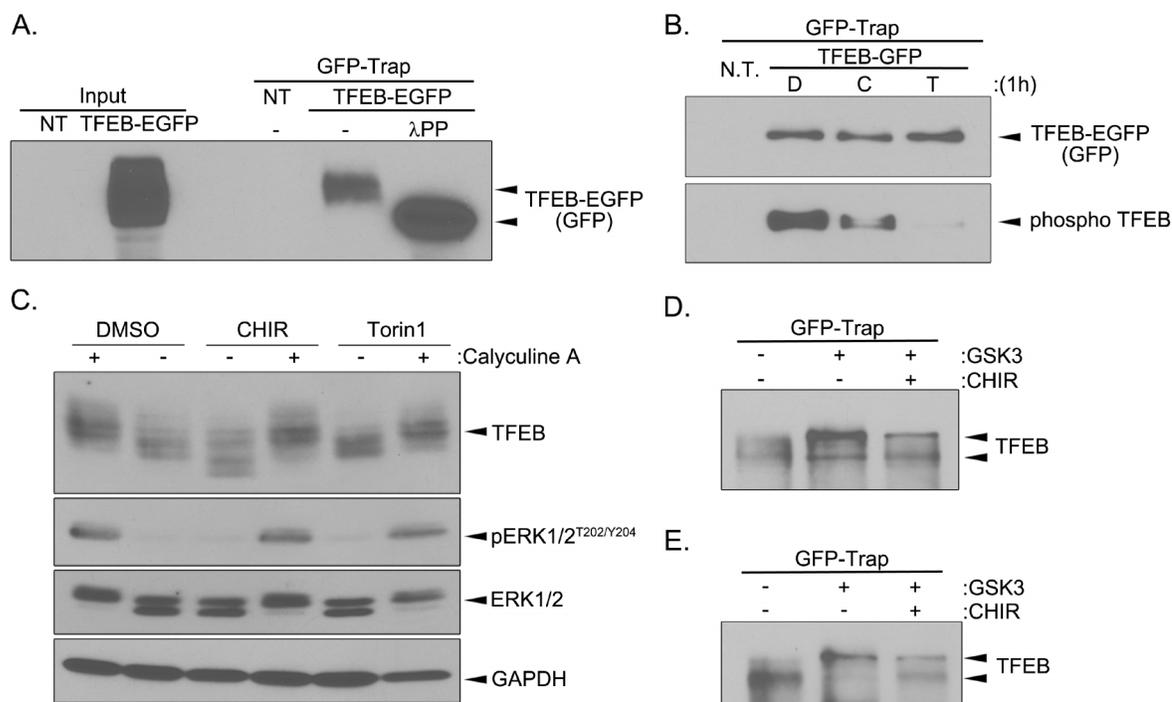


**Figure 18: L'inhibition des GSK3 et de mTOR influence le profil de migration de la protéine TFEB.** **A)** Les cellules PANC1 ont été traitées 1h sans (DMSO; D) ou avec l'inhibiteur des GSK3 CHIR99021 (C; 5 $\mu$ M) ou l'inhibiteur de mTOR Torin1 (T; 250nM). Les cellules ont été soit lysées pour obtenir des lysats totaux (LT) ou séparées en extraits protéiques cytosoliques et nucléaires par fractionnement. **B)** Les cellules PANC1 ont été infectées avec des lentivirus codant pour un shcontrôle (shCTL) ou pour un shGSK3 $\alpha$  + un shGSK3 $\beta$  (shGSK3 $\alpha/\beta$ ), puis elles ont été lysées 72h post-infection. **C)** Les cellules HEK293T, PANC1 et MIA PaCa2 (MIA) ont été traitées 1h sans (DMSO; D) ou avec le CHIR (C; 5 $\mu$ M) ou la Torin1 (T; 250nM). Puis, les cellules ont été lysées par fractionnement et les extraits des protéines nucléaires ont été analysés. **A-C)** L'expression protéique a été évaluée par immunobuvardage en utilisant les anticorps spécifiés. \* = formes de plus faible poids moléculaire de la protéine TFEB

donc que l'inhibition des GSK3 ou de mTOR mène à la déphosphorylation de TFEB notamment sur sa sérine 211.

Puisque cette déphosphorylation de TFEB en réponse à l'inhibition des GSK3 est très rapide c'est-à-dire dès 30 à 60 minutes (Figure 19B-C), nous avons émis l'hypothèse que des Ser/Thr phosphatases pourraient être impliquées dans la régulation de TFEB par les GSK3. Afin de vérifier si des Ser/Thr phosphatases sont responsables de la déphosphorylation de TFEB suite à l'inhibition des GSK3 et de mTOR, nous avons utilisé l'inhibiteur de phosphatases (PP1 et PP2A), la calyculine A. Les cellules PANC1 ont été pré-traitées 15 minutes avec la calyculine A, puis traitées 30 minutes avec le CHIR ou la Torin1. Nous avons observé que la calyculine A prévient l'accélération de migration de la protéine TFEB induite par le traitement avec le CHIR (Figure 19C). L'inhibition des Ser/Thr phosphatases a également prévenu les changements de migration de la protéine TFEB induits par la Torin1. Ces résultats proposent donc la contribution de Ser/Thr phosphatases dans la déphosphorylation de TFEB suite à l'inhibition des GSK3 et de mTOR.

L'analyse bioinformatique de la séquence d'acides aminés de la protéine TFEB nous a suggéré la présence de plusieurs sites de phosphorylation potentiellement phosphorylables par les GSK3. Nous avons donc effectué un essai kinase avec une GSK3 active afin de vérifier si les GSK3 pouvaient directement phosphoryler la protéine TFEB. Pour ce faire, la protéine TFEB-EGFP a été immunoprécipitée à partir d'extraits de cellules HEK293T (Figure 19D) et PANC1 (Figure 19E) préalablement transfectées avec le vecteur EGFP-N1-TFEB. Nous avons observé que l'ajout de GSK3 active induit le retard de migration de la protéine TFEB-EGFP. Ce retard de migration est prévenu par l'ajout de l'inhibiteur CHIR. Nos résultats démontrent que les GSK3 peuvent phosphoryler la protéine TFEB *in vitro*. Les données de la littérature supportent que les processus d'autophagie et d'apoptose sont étroitement liés. Étant donné que nos résultats démontrent que l'inhibition des GSK3 induit à la fois l'apoptose et l'autophagie, nous avons évalué si la modulation de ces processus influence la régulation de

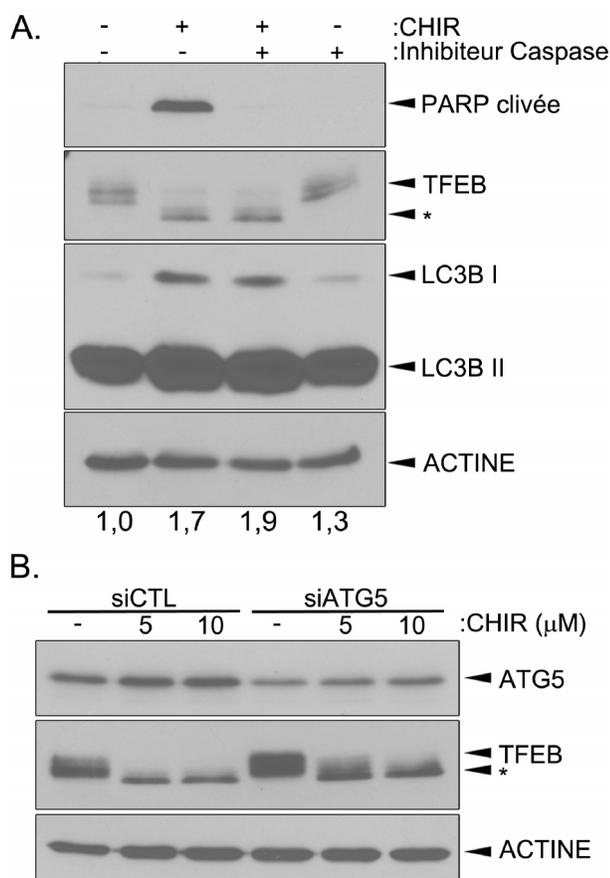


**Figure 19: Les GSK3 régulent la phosphorylation du facteur de transcription TFEB** **A-B)** Les cellules HEK293T ont été transfectées avec le plasmide codant pour la protéine TFEB-EGFP. **A)** Vingt-quatre heures post-transfection, la protéine TFEB-EGFP a été immunoprécipitée à l'aide de billes GFP-Trap. L'immunoprécipitat a été séparé en 2 fractions équivalentes et a été mis en présence ou non de lambda phosphatase ( $\lambda$ PP). **B)** Vingt-quatre heures post-transfection, les cellules ont été traitées 1h sans (DMSO; D) ou avec l'inhibiteur des GSK3 (CHIR; C; 5 $\mu$ M) ou l'inhibiteur de mTOR (Torin1; T; 250nM). Les cellules ont été lysées et la protéine TFEB-EGFP a été immunoprécipitée à l'aide de billes GFP-Trap. Les niveaux de phosphorylation de la protéine TFEB sur la Ser211 ont été évalués par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement le motif de liaison des 14-3-3 lorsque phosphorylé sur Ser. **C)** Les cellules PANC1 ont été pré-traitées 15 minutes avec l'inhibiteur de Ser/Thr phosphatases, la calyculine A 10nM, et ensuite traitées 30 minutes sans (DMSO) ou avec le CHIR ou la Torin1. Les niveaux d'expression protéique ont été évalués par immunobuvardage avec les anticorps spécifiés. Les cellules **D)** HEK293T et **E)** PANC1 ont été transfectées avec le plasmide EGFP-N1-TFEB. **D)** Vingt-quatre heures post-transfection ou **E)** 48h post-transfection, les cellules ont été lysées et la protéine TFEB-EGFP a été immunoprécipitée. L'immunocomplexe a été séparé en 3 fractions équivalentes: les fractions ont été incubées soit en absence ou en présence d'une GSK3 active avec ou sans CHIR. Le profil de migration de la protéine TFEB-EGFP a été analysé par immunobuvardage.

TFEB par les GSK3. Nous avons d'abord traitées les cellules PANC1 avec l'inhibiteur des GSK3 (CHIR) en combinaison avec un inhibiteur des caspases (inhibiteur I). Le traitement des cellules avec l'inhibiteur des caspases a prévenu le clivage de PARP induit par le CHIR. Toutefois, l'augmentation de l'expression de LC3B II et l'accélération de migration de TFEB induites par le CHIR n'ont pas été affectées par l'inhibition des caspases (Figure 20A). Ces résultats suggèrent que la réponse apoptotique induite par l'inhibition des GSK3 n'intervient pas dans la régulation de TFEB et de l'autophagie par les GSK3. Par la suite, nous avons inhibé l'autophagie dans les cellules PANC1 à l'aide du siATG5, puis traité les cellules avec le CHIR. La déplétion de l'expression d'ATG5 n'a pas influencé l'accélération de migration de la protéine TFEB observée suite aux traitements avec le CHIR (Figure 20B). La régulation de TFEB par les GSK3 ne semble pas dépendre de l'induction de l'apoptose ou de l'autophagie.

### 6.3- Régulation de l'association de TFEB avec ses partenaires d'interaction par les GSK3 et mTOR

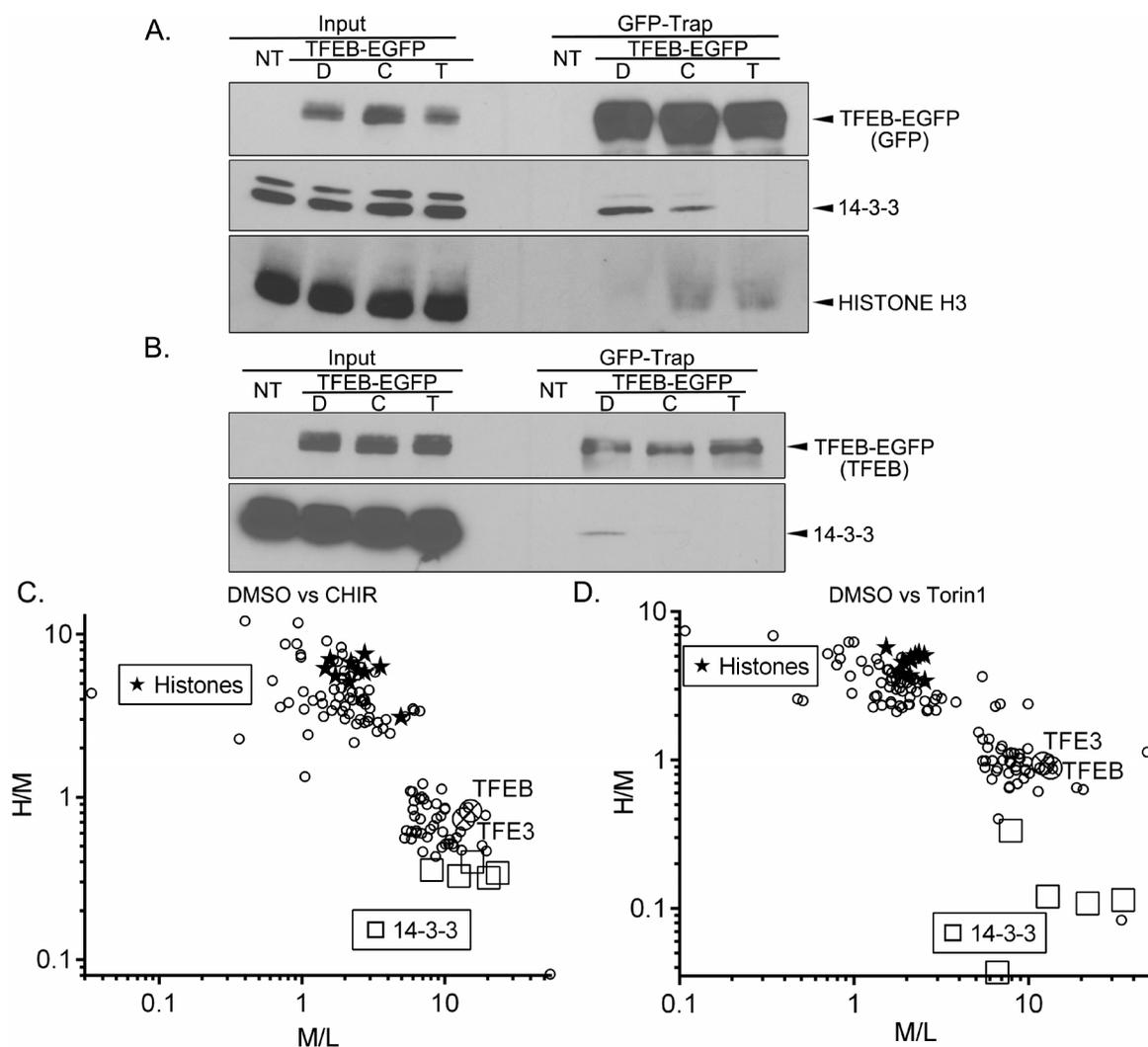
Des études ont suggéré que l'association de TFEB aux protéines 14-3-3 nécessite la phosphorylation de sa Ser211, et que cette association maintient TFEB dans le cytosol (Jose a. Martina et al., 2012; Rocznik-Ferguson et al., 2012). Puisque nos résultats ont démontré la déphosphorylation de TFEB, notamment sur la sérine 211, et sa translocation nucléaire suite à l'inhibition des GSK3, nous avons poursuivi avec l'étude des partenaires d'interaction de TFEB. Pour ce faire, les cellules ont été transfectées avec le vecteur EGFP-N1-TFEB et traitées 1h sans (DMSO) ou avec le CHIR ou la Torin1, puis la protéine TFEB-EGFP a été immunoprécipitée. Nous avons observé que dans les cellules HEK293T et PANC1 non traitées, la protéine TFEB-EGFP est associée avec les protéines 14-3-3 (Figure 21A-B). L'association de la protéine TFEB-EGFP avec les protéines 14-3-3 est fortement réduite dans les cellules HEK293T et PANC1 traitées avec le CHIR ou la Torin1. À l'opposé, dans les cellules HEK293T, l'inhibition des GSK3 (CHIR) et de mTOR (Torin1) a favorisé l'association de la



**Figure 20: L'inhibition de la réponse apoptotique ou autophagique n'influence pas la régulation de TFEB par les GSK3.** **A)** Les cellules PANC1 ont été traitées pendant 48h sans (DMSO) ou avec l'inhibiteur des GSK3 (CHIR; 5 $\mu$ M) ou l'inhibiteur de caspases (10 $\mu$ M), seul ou en combinaison. **B)** Les cellules PANC1 ont été transfectées avec un siATG5 (100nM) ou un siARN contrôle (siCTL; 100nM). Le lendemain, les cellules ont été traitées 24h sans (DMSO) ou avec l'inhibiteur CHIR aux concentrations spécifiées. **A-B)** L'expression protéique a été évaluée par immunobuvardage avec les anticorps indiqués. \* = formes de plus faible poids moléculaire de la protéine TFEB. **A)** La densitométrie a été calculé à l'aide du logiciel imageJ et normalisé par rapport à la GAPDH. Les valeurs du ratio LC3B II/ACTINE relatif au contrôle sont indiquées.

protéine TFEB-EGFP avec l'histone H3 (Figure 21A).

Nous avons poursuivi l'analyse des changements d'association de TFEB-EGFP à ses partenaires d'interaction à l'aide d'une approche protéomique d'analyse par spectrométrie de masse SILAC. Les échantillons ont été préparés à partir des cellules HEK293T cultivées dans 3 différents milieux de culture contenant différentes arginine et lysine marquées (SILAC). Les cellules cultivées dans le milieu SILAC moyen (M) et lourd (H) ont été transfectées avec EGFP-N1-TFEB, puis non traitées (M) ou traitées (H) avec le CHIR ou la Torin1. Les cellules cultivées dans le milieu SILAC léger (L) n'ont été ni transfectées, ni traitées correspondant à notre condition contrôle. À partir de ces échantillons, la protéine TFEB-EGFP a été immunoprécipitée, puis les protéines ont été digérées à la trypsine et les peptides ont été soumis pour l'analyse par chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Nous avons conservé la proportion de 25% des peptides ayant les plus forts ratios M/L ou H/M (Figure 21C-D et Tableau 5). Le ratio M/L représente les partenaires d'interaction de TFEB-EGFP en conditions basales (DMSO), alors que le ratio H/M représente les partenaires d'interaction de TFEB-EGFP dans les cellules traitées avec l'inhibiteur des GSK3 (Figure 21C) ou de mTOR (Figure 21D). D'une part, nous avons noté une perte de l'association de 5 protéines 14-3-3 (14-3-3 $\beta/\alpha$ , 14-3-3 $\epsilon$ , 14-3-3 $\gamma$ , 14-3-3 $\tau$  et 14-3-3 $\zeta/\delta$ ) avec la protéine TFEB-EGFP suite au traitement avec le CHIR (Figure 21C) ou la Torin1 (Figure 21D). À l'inverse, une augmentation de l'association de TFEB-EGFP avec plusieurs histones a été observée suite à l'inhibition des GSK3 ou de mTOR (Figure 21C-D). Ces résultats de spectrométrie de masse confirment donc nos résultats précédents, c'est-à-dire une diminution de l'association de TFEB avec les protéines 14-3-3 et une augmentation de son association avec l'histone H3 (Figure 21A-B). D'autre part, nous avons observé que TFEB-EGFP s'associe également avec la protéine TFE3, un membre de la même famille de facteur de transcription que TFEB, suggérant la présence d'hétérodimère TFEB-TFE3. Plusieurs autres protéines associées à TFEB-EGFP ont été identifiées dans notre analyse et la liste des peptides conservés (25%) est



**Figure 21 : L'inhibition des GSK3 et de mTOR module l'association de TFEB avec ses partenaires d'interaction.** Les cellules **A,C-D**) HEK293T et **B**) PANC1 ont été transfectées ou non (NT) avec le plasmide EGFP-N1-TFEB. **A-D**) Vingt-quatre heures post-transfection, les cellules ont été traitées 1h sans (DMSO; D) ou avec l'inhibiteur de GSK3 (CHIR; C; 5 $\mu$ M) ou de mTOR (Torin1; T; 250nM). Les cellules ont été lysées et la protéine TFEB-EGFP a été immunoprécipitée à l'aide de billes GFP-Trap. **A-B**) L'expression protéique a été évaluée dans les extraits et les immunoprécipitats par immunobuvardage avec les anticorps indiqués. **C-D**) Analyse par spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) des partenaires d'interaction de TFEB. Comparaison des cellules HEK293T transfectées avec TFEB-EGFP (M et H) aux cellules non transfectées (L). Les cellules transfectées ont été non traitées (M) (DMSO) ou traitées (H) 1h avec le CHIR ou la Torin1. Les peptides appartenant à la proportion de 25% de ceux ayant les plus forts ratios M/L et/ou H/M sont représentés graphiquement ci-haut et leurs données sont affichées au tableau 5. Les graphiques représentent les ratios M/L (peptides enrichis dans l'immunoprécipitat de TFEB-EGFP) par rapport aux H/M (peptides enrichis dans les cellules traitées CHIR ou Torin).

Tableau 5: Analyse par LC-MS/MS des associations de TFEB-EGFP

	Protéine	DMSO vs CHIR99021			DMSO vs Torin1		
		Ratio M/L	Ratio H/L	Ratio H/M	Ratio M/L	Ratio H/L	Ratio H/M
<b>Famille MITF</b>	TFEB	15,184	17,134	0,823	13,402	14,353	0,888
	TFE3	13,595	9,986	0,735	12,104	12,221	0,947
<b>Protéines 14-3-3</b>	14-3-3 beta/alpha	20,329	5,670	0,320	6,608	0,245	0,037
	14-3-3 epsilon	15,649	5,844	0,399	12,899	1,798	0,120
	14-3-3 gamma	8,110	4,281	0,356	7,901	3,516	0,334
	14-3-3 theta	12,582	5,489	0,327	34,718	3,865	0,114
	14-3-3 zeta/delta	23,520	7,323	0,341	21,797	2,488	0,108
<b>Histones</b>	H1.2; H1.4; H1.3	2,142	11,017	5,085	2,096	7,997	3,717
	H2A.V; H2A.Z; H2A	1,573	11,583	7,041	2,526	13,631	5,063
	H2A1C; H2A3; H2A1B/E	1,461	8,474	6,191	1,904	6,723	4,601
	H2A1J; H2A1H; H2AJ; H2A2C; H2A2A; H2A1D; H2A1; H2A; H2A1A; H2A.x	3,542	23,513	6,332	2,547	11,133	3,425
	H2B1L; H2B1M; H2B1N; H2B1H; H2B2F; H2B1C/E/F/G/I; H2B1D; H2BFS; H2B1K; H2B	2,200	14,800	6,727	2,357	11,241	5,213
	H2B3B; H2B2E; H2B1B; H2B1O; H2B1J; H2B2D; H2B2C	2,749	19,866	7,596	2,246	10,648	5,079
	H3; H3.2; H3.1t; H3.3; H3.1; H3.3C	2,748	16,925	5,832	2,115	9,865	4,881
	H4	2,471	14,857	5,981	2,111	10,126	4,729
	mH2A.1	1,717	9,541	5,558	1,533	8,825	5,756
	mH2A.2	4,937	15,321	3,103	1,907	8,571	3,819
<b>Signalisation mTOR</b>	LAMTOR1	19,584	9,142	0,467	9,888	11,161	1,196
	Rag C; Rag D	10,083	4,172	0,513	9,838	9,229	0,972
<b>Associé à la transcription</b>	CBX3	2,666	10,603	3,991	1,748	5,073	3,007
	CBX5	1,393	5,269	3,771	1,649	6,216	3,584
	ILF3	1,921	6,299	3,373	2,985	8,049	2,739
	MATR3	2,575	9,604	3,910	2,182	6,355	3,472
	MCM3	1,048	1,269	1,333	0,511	1,284	2,512
	RHA	1,677	7,921	4,583	1,626	5,710	3,436
	SAFB1	3,355	10,022	2,528	2,548	6,444	2,502
	SMCA5; SMCA1	3,412	9,447	2,883	3,843	9,484	2,465
	TOP1	1,913	12,731	7,564	0,816	4,525	5,546
	TOP2; TOP2B	2,239	9,874	4,409	2,114	8,188	3,607
	TOP2A	1,715	8,789	3,696	2,481	9,204	3,416
UBF1	0,618	3,213	5,195	0,934	5,851	6,264	
<b>Associé à l'ARN</b>	DDX21	1,033	3,579	3,463	1,436	4,789	3,334
	DDX39B; DDX39A	1,414	4,679	3,124	2,663	5,519	2,190
	EIF4A3	2,135	6,015	3,245	2,118	6,133	3,055

	ELAV1	2,994	10,704	3,511	1,888	5,280	2,262
	ERH	2,731	7,875	2,884	1,630	4,098	2,476
	FBL	1,882	8,822	4,687	1,744	6,148	3,525
	HEAT1	1,022	4,544	4,446	1,316	3,535	2,687
	PABP2	2,317	5,011	2,163	2,229	8,201	3,510
	PININ	2,257	9,022	3,944	1,288	2,936	2,279
	RBM14	1,819	7,511	4,129	1,829	4,248	2,322
	RBM8A	6,110	20,786	3,402	2,017	6,703	3,324
	RBM1A; RBMXL1	2,788	11,079	3,708	1,831	5,294	3,063
	RNPS1	0,805	3,063	3,807	1,577	6,344	4,093
<b>Épissage</b>	Acinus	2,152	12,490	4,069	1,828	9,187	3,874
	hnRNP A/B	2,749	10,843	3,945	1,822	7,130	4,013
	hnRNP A1; hnRNP A1-like 2	2,174	13,717	5,533	1,391	5,046	4,422
	hnRNP A2/B1	1,772	10,327	6,819	1,207	5,212	4,022
	hnRNP A3	1,906	9,125	5,384	1,647	6,682	3,870
	hnRNP D0	2,956	14,377	4,550	1,555	6,596	4,061
	hnRNP D-like	3,250	15,661	5,869	1,849	6,092	3,313
	hnRNP H3	1,881	15,670	8,330	1,595	5,248	3,121
	hnRNP K	2,891	6,678	2,919	2,621	5,127	2,147
	hnRNP L	2,648	8,214	3,858	2,287	4,699	2,897
	hnRNP M	2,519	11,283	4,418	1,801	6,616	3,790
	hnRNP R	2,950	8,027	3,091	2,089	5,463	2,650
	hnRNP U	2,742	8,559	2,869	2,080	5,232	2,376
	hnRNPs C1/C2; hnRNP C-like 1	1,977	11,423	5,965	1,413	6,898	4,422
	MGN;MGN2	1,196	3,990	3,919	0,952	3,509	3,686
	SF3B2	7,507	6,758	0,900	9,383	7,068	0,753
	SRSF3	2,552	7,325	2,999	2,049	4,927	2,375
<b>Domage à l'ADN</b>	MUTYH	19,352	14,954	0,773	47,900	54,253	1,133
	PARP1	6,003	20,568	3,498	5,431	19,786	3,660
	PRP19	0,702	2,728	3,573	1,898	5,541	2,919
	SMC1A	3,878	11,117	3,000	9,943	24,185	2,394
	SPT16	3,700	9,522	2,645	3,175	8,354	2,604
	SSRP1	4,139	10,291	2,461	2,918	7,605	2,563
	XRCC5	6,693	21,365	3,374	6,452	14,942	2,303
	XRCC6	5,271	14,648	3,132	6,867	18,020	2,392
<b>Ribosome</b>	FTSJ3	0,980	7,357	7,509	0,797	3,491	4,382
	Nucleophosmin	1,996	5,270	3,021	2,954	6,670	2,170
	RPL10	8,738	7,575	0,910	8,847	9,644	1,102
	RPL17	6,107	6,319	0,944	8,278	9,183	1,109
	RPL23	5,747	6,714	1,090	7,603	8,426	1,101
	RPL24	9,382	7,023	0,765	8,800	8,982	1,035
	RPL3	7,006	7,326	1,207	5,174	8,565	1,545
	RPL7-like 1	0,984	7,125	7,243	1,106	5,137	4,644

	RPS16	6,137	4,791	0,764	5,674	5,607	0,990
	RPS2	8,763	6,381	0,740	8,464	7,772	0,904
	RPS24	7,137	6,699	0,974	5,921	8,247	1,386
	RPS25	5,980	5,144	0,838	5,635	5,019	0,891
	RPS27; RPS27-like	6,745	6,451	0,734	6,537	5,582	0,845
	RPS6	6,892	7,732	1,002	7,040	9,011	1,249
	RPS8	5,938	6,281	1,080	5,458	6,531	1,387
	RPS9	6,728	6,411	0,974	6,933	7,847	1,189
<b>Famille heat-shock</b>	CH60	10,628	6,275	0,518	7,683	6,268	0,816
	GRP78	9,683	6,190	0,612	7,784	4,931	0,662
	HSP71	18,286	9,719	0,504	18,812	12,347	0,652
	HSP76; HSP77	11,612	5,453	0,495	7,741	5,025	0,650
	HSP7C	12,896	7,360	0,611	13,737	11,489	0,875
<b>Métabolisme</b>	ADT2	10,847	5,430	0,548	10,097	8,316	0,815
	ADT3	7,523	4,356	0,567	8,443	7,086	0,855
	AK6	12,113	5,545	0,565	20,560	14,770	0,633
	ECHA	13,125	6,191	0,472	9,595	9,470	0,867
<b>Transport</b>	ABCD3	6,329	4,178	0,621	8,488	6,894	0,873
	RAN	1,103	2,992	2,416	0,974	2,999	2,819
	SLC25A1	6,339	3,257	0,604	7,110	7,448	1,001
	SLC25A10	7,933	5,182	0,635	7,942	9,375	1,124
	SLC25A11	8,331	5,974	0,668	7,810	8,030	0,977
	SLC25A12	5,831	3,221	0,614	5,454	5,385	0,987
	SLC25A13	7,026	3,573	0,461	7,892	7,547	0,956
	XPO2	2,266	15,468	6,789	2,213	9,704	4,815
<b>Enveloppe nucléaire</b>	EMD	9,553	4,641	0,491	11,360	7,165	0,616
	Lamin-B1	1,655	10,821	6,962	1,873	8,943	4,935
	LAP2A	8,618	1,751	0,431	6,696	2,693	0,402
<b>Cytosquelette</b>	ACTB; ACTG	0,917	7,775	8,746	0,835	3,951	4,853
	ACTBL	0,398	4,819	12,108	0,345	2,426	6,904
	ACTS; ACTC; ACTH; ACTA	0,762	8,295	8,715	0,707	3,991	5,211
	ARP2	1,618	5,506	3,403	1,754	3,722	2,122
	DBN1	0,363	0,827	2,281	0,108	0,802	7,432
	MYH10	0,033	0,134	4,350	1,447	3,080	2,347
	MYH9	1,352	5,008	4,183	1,354	4,086	2,714
	MYL12A; MYL12B	2,411	7,598	2,814	0,475	1,242	2,589
	MYL6	2,008	7,581	3,611	1,629	3,613	2,397
	TBB4B; TBB4A	5,400	3,819	0,624	6,628	6,182	0,882
	VIM	1,489	12,669	9,126	0,999	6,755	6,260
<b>Autres</b>	C1QBP	10,011	8,085	0,841	8,934	9,194	1,029
	DPYL5	2,596	17,558	6,279	2,190	10,478	4,785
	FARSA	5,240	3,262	0,560	6,155	4,509	0,745

GCNT4	54,902	4,475	0,082	34,019	2,833	0,083
GPC4	11,374	5,867	0,516	8,630	5,975	0,692
OR51B5	14,580	11,134	0,863	13,066	13,786	1,017
PSMD3	5,848	3,231	0,552	6,205	6,342	0,992
RCN2	6,899	4,387	0,599	9,546	7,293	0,853
RTTN	9,510	10,675	1,123	5,834	7,133	1,223
UBP2L	10,070	8,607	0,855	11,613	10,320	0,889
WDR43	0,940	11,061	11,764	1,348	6,490	4,816

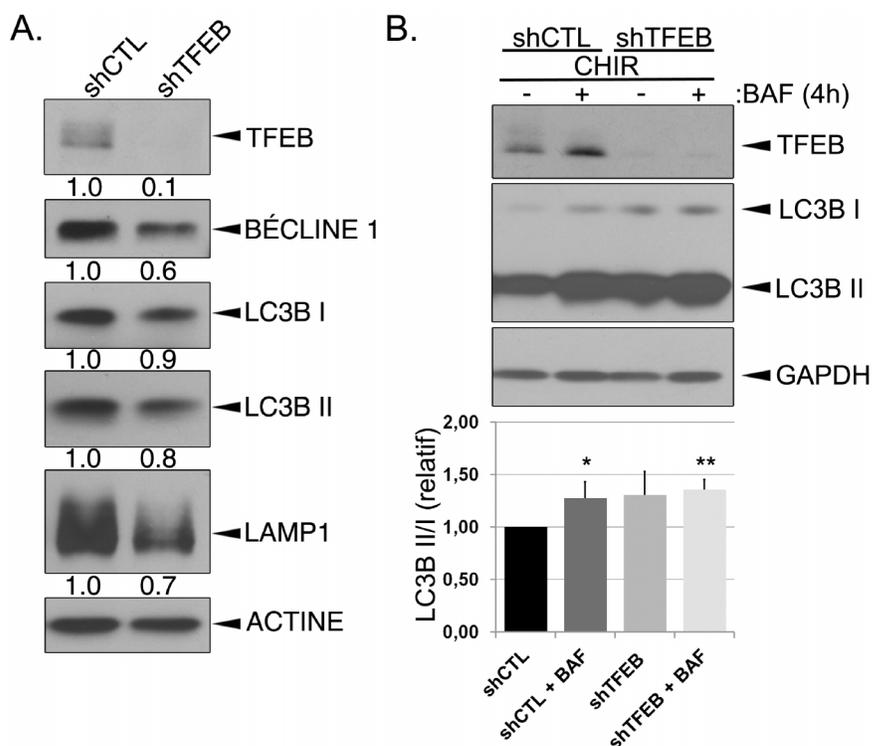
affichée au Tableau 5. Brièvement, une augmentation de l'association de TFEB avec des partenaires d'interactions associées à la transcription, à l'ARN et à l'épissage a été observée suite à l'inhibition des GSK3 ou de mTOR. De façon intéressante, des protéines associées aux dommages à l'ADN ont été identifiées comme partenaires d'interaction de TFEB. D'ailleurs, l'association de TFEB avec certaines de ces protéines, notamment PARP1, PRP19, SMC1A, SPT16, SSRP1, XRCC5 et XRCC6, est plus élevée suite à l'inhibition des GSK3 ou de mTOR. Parmi les partenaires d'interaction de TFEB, on note également la présence de plusieurs protéines associées aux ribosomes, au cytosquelette, au métabolisme, ainsi que des chaperonnes et des transporteurs.

#### 7- La déplétion du facteur de transcription TFEB sensibilise les cellules pancréatiques tumorales à l'apoptose induite suite à l'inhibition des GSK3.

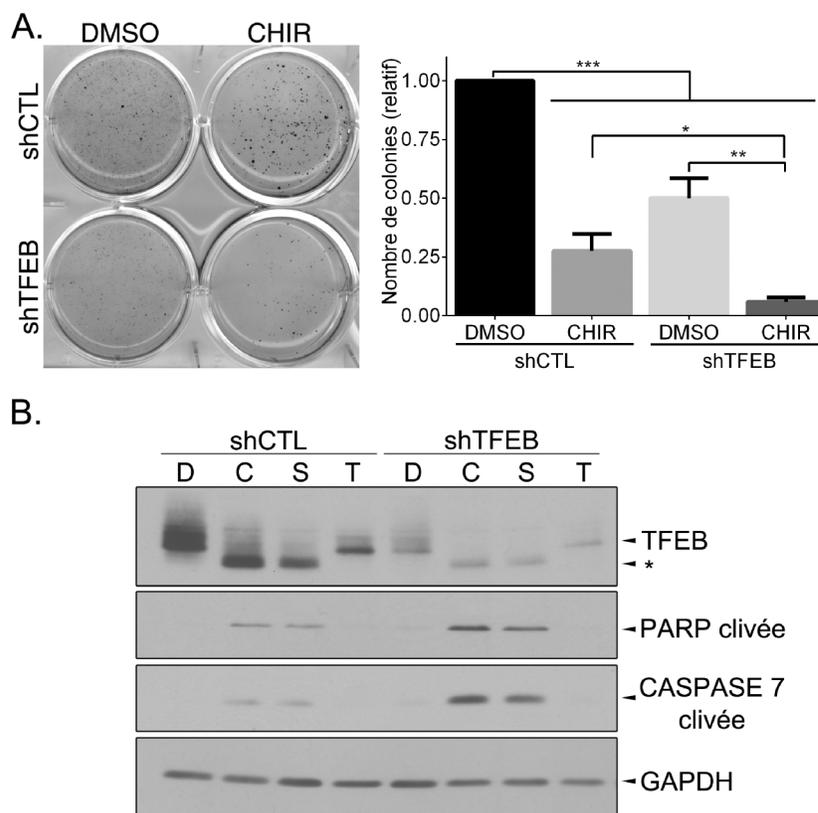
Le facteur de transcription TFEB a été identifié comme un régulateur majeur de l'autophagie et de la biogenèse des lysosomes (Sardiello et al., 2009; Settembre et al., 2011). Puisque nos résultats ont démontré que l'autophagie régule positivement la survie des cellules pancréatiques tumorales, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux rôles de TFEB dans la régulation de l'autophagie dans ces cellules. Pour ce faire, nous avons établi des populations de lignées PANC1 exprimant de façon stable un shTFEB (PANC1-shTFEB) ou un shARN contrôle (PANC1-shCTL). Dans les cellules PANC1, la déplétion de TFEB est associée à une expression moindre de BÉCLINE 1 et LAMP1, des protéines respectivement impliquées dans la formation des autophagosomes et associés aux

lysosomes (Figure 22A). Nous avons ensuite mesuré le flux autophagique en réponse à l'inhibiteur des GSK3 (CHIR) dans les cellules PANC1-shCTL et PANC1-shTFEB. D'abord, nous avons observé que l'ajout de Bafilomycine A1 induit une augmentation du ratio LC3B II/I dans les cellules PANC1-shCTL traitées avec le CHIR (Figure 22B). De plus, en présence de CHIR les cellules PANC1-shTFEB démontrent un ratio LC3B II/I plus élevé que celui des cellules PANC1-shCTL. Le ratio LC3B II/I des cellules PANC1-shTFEB traitées avec le CHIR n'augmente pas suite à l'ajout de Bafilomycine A1. Ces résultats suggèrent que la déplétion de TFEB entraîne un défaut au niveau de la dégradation des autophagosomes dans les cellules PANC1 en présence de CHIR.

Étant donné que l'inhibition de l'autophagie réduit la croissance en indépendance d'ancrage des cellules PANC1 (Figure 11D) et que la déplétion de TFEB inhibe l'autophagie (Figure 22), nous avons évalué la capacité des cellules PANC1-shTFEB à croître en indépendance d'ancrage. Nous avons observé que les cellules PANC1-shTFEB forment 50% moins de colonies en agarose mou que les cellules PANC1-shCTL (Figure 23A). De plus, dans les cellules PANC1-shCTL, le traitement avec le CHIR a réduit de 3,6x (72%) le nombre de colonies formées, alors qu'une diminution de 8,3x (94% par rapport aux cellules PANC1-shCTL non traitées) a été observée dans les cellules PANC1-shTFEB. Le facteur de transcription TFEB est donc requis pour la capacité de croissance en indépendance d'ancrage des cellules pancréatiques tumorales. Ces résultats suggèrent également que la déplétion de TFEB sensibilise les cellules PANC1 à l'inhibition des GSK3. Par la suite, nous avons évalué l'apoptose induite suite à l'inhibition prolongée des GSK3 dans les cellules PANC1-shCTL et PANC1-shTFEB. Nous avons observé une augmentation plus importante du clivage de PARP et de la caspase 7 dans les cellules PANC1-shTFEB traitées avec les inhibiteurs des GSK3, le SB ou le CHIR, comparativement aux clivages observés dans les PANC1-shCTL (Figure 23B). Il est à noter que l'inhibition de mTOR autant dans les cellules PANC1-shCTL que PANC1-shTFEB par le traitement avec la Torin1 pendant 48h n'a pas induit de clivage de PARP, ni de la caspase 7. Nos



**Figure 22: L'impact de la déplétion de l'expression de TFEB sur le flux autophagique dans les cellules PANC1 traitées avec un inhibiteur des GSK3.** **A)** Les populations stables de cellules PANC1 exprimant un shCTL ou un shTFEB ont été lysées. L'expression de marqueurs d'autophagie (BÉCLINE 1 et LC3B) et de lysosomes (LAMP1) a été évaluée par immunobuvardage. L'expression des protéines indiquées a été quantifiée par densitométrie et normalisée à l'expression de l'actine. Les valeurs relatives au shCTL des niveaux d'expression pour l'expérience illustrée sont indiquées sous les bandes. **B)** Les cellules PANC1-shCTL et PANC1-shTFEB ont été traitées avec l'inhibiteur des GSK3 (CHIR; 5 $\mu$ M) sans ou avec la Bafilomycine A1 (BAF; 50nM) pendant 4h afin de mesurer le flux autophagique. L'expression protéique a été évaluée par immunobuvardage. Les niveaux d'expression de LC3B II et de LC3B I de 3 expériences ont été évalués par densitométrie. Les valeurs du ratio de l'expression de LC3B II/I relative aux cellules contrôles sans BAF (shCTL) sont montrées en graphique. \* $p < 0,05$  et \*\* $p < 0,01$ .



**Figure 23: La déplétion de l'expression de TFEB sensibilise les cellules PANC1 à l'apoptose induite suite à l'inhibition des GSK3. A)** Les cellules PANC1-shCTL et PANC1-shTFEB ont été ensemencées en agarose mou et à partir du lendemain traitées sans (DMSO) ou avec l'inhibiteur des GSK3 (CHIR; 5 $\mu$ M). Les cellules ont été cultivées en agarose mou pendant 3 semaines avant la coloration des colonies à l'aide de MTT. La photo d'une expérience représentative est montrée. Les colonies formées ont été dénombrées à l'aide du logiciel ImageJ et le nombre de colonies dans les cellules contrôles (DMSO) a été fixé à 1. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  et \*  $p < 0,05$  ( $n=4$ ). **B)** Les cellules PANC1-shCTL et PANC1-shTFEB ont été traitées 48h sans (DMSO; D) ou avec les inhibiteurs de GSK3 (CHIR; C et SB216763; S; 20 $\mu$ M) ou l'inhibiteur de mTOR (Torin1; T; 250nM). Les cellules ont été lysées et l'expression protéique a été évaluée par immunobuvardage avec les anticorps indiqués. \* = formes de plus faible poids moléculaire de la protéine TFEB.

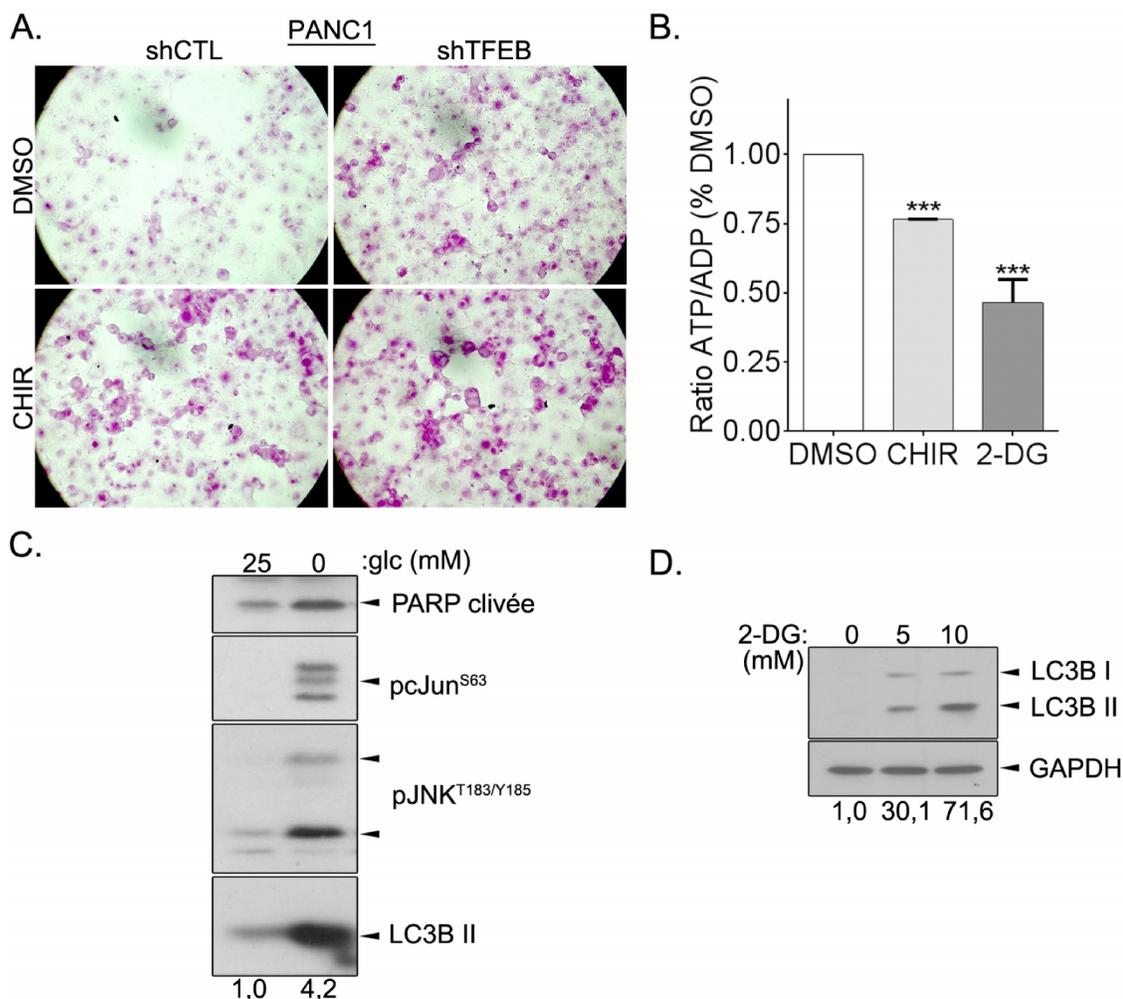
résultats suggèrent donc que la déplétion de TFEB sensibilise les cellules pancréatiques tumorales à l'apoptose induite par à l'inhibition des GSK3.

#### 8- L'inhibition de l'activité des GSK3 et/ou la déplétion de TFEB influence le métabolisme des cellules pancréatiques tumorales

Des études ont démontré une reprogrammation du métabolisme dans les cellules cancéreuses, notamment du cancer du pancréas (Blum & Kloog, 2014; Bryant et al., 2014; W. Zhou et al., 2012). Il a été observé que ces changements entraînent entre autres une augmentation du taux de la glycolyse, toutefois peu d'études se sont attardées au métabolisme du glycogène. Les GSK3 ont été identifiées comme une des kinases pouvant phosphoryler et inactiver la glycogène synthase qui est impliquée dans la synthèse du glycogène (Embi et al., 1980). Il a été observé que la voie de dégradation autophagique/lysosomale peut dégrader le glycogène en glucose (Singh & Singh, 2015; Zirin et al., 2013). De plus, les facteurs de transcription TFEB et TFE3 peuvent favoriser la dégradation du glycogène dans un modèle de la maladie de Pompe, une maladie héréditaire associée à une accumulation de glycogène due à une anomalie de l'enzyme lysosomale alpha-glucosidase (José a Martina et al., 2014; Spampinato et al., 2013). Nos résultats ont démontré l'induction de l'autophagie dans les cellules pancréatiques tumorales humaines suite à l'inhibition des GSK3. Nous avons donc évalué les niveaux de glycogène afin de déterminer si l'inhibition des GSK3 induit une accumulation de glycogène dans les cellules pancréatiques tumorales humaines et si l'inhibition de TFEB augmente cette dernière.

Tout d'abord, afin d'évaluer les niveaux de glycogène, nous avons effectué une coloration à l'acide periodique de Schiff (PAS) sur les populations de cellules PANC1-shCTL et PANC1-shTFEB traitées ou non avec l'inhibiteur des GSK3. Nous avons noté un marquage PAS plus intense dans les cellules PANC1-shTFEB par rapport aux cellules PANC1-shCTL (Figure 24A). De plus, nous avons observé que le traitement avec l'inhibiteur des GSK3 (CHIR) augmente l'intensité du

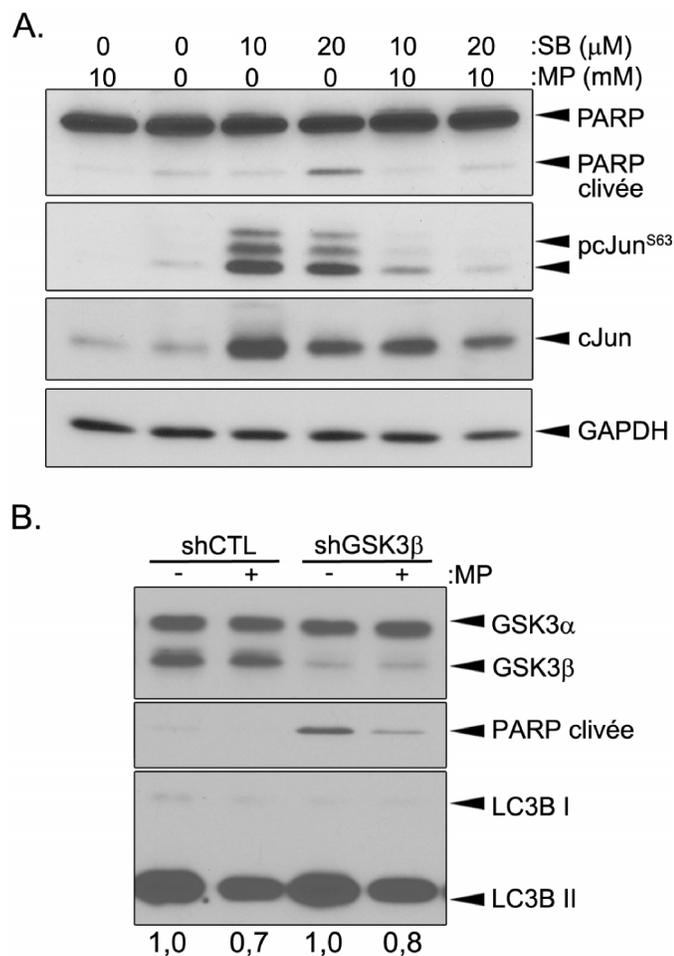
marquage PAS comparativement aux cellules non traitées, autant dans la population PANC1-shCTL que PANC1-shTFEB. Ce résultat suggère que les GSK3 et TFEB régulent les niveaux de glycogène dans les cellules pancréatiques tumorales. Un tel impact de l'inhibition des GSK3 sur le métabolisme du glycogène, c'est-à-dire une accumulation de glycogène, pourrait affecter les niveaux de glucose disponible pour alimenter la glycolyse. La conversion du glucose en pyruvate lors de la glycolyse, ainsi que son entrée dans le cycle de Krebs permet la production d'ATP utilisé comme source énergétique par la cellule. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une régulation du métabolisme du glycogène par les GSK3 pourrait affecter la production énergétique. Tout d'abord, nous avons évalué l'impact de l'inhibition des GSK3 sur la production énergétique via l'analyse des niveaux intracellulaires d'ATP et d'ADP. À l'aide du kit ApoSENSOR™, nous avons mesuré les ratios ATP/ADP dans les cellules PANC1 traitées ou non avec l'inhibiteur de GSK3 (CHIR). Le traitement des cellules PANC1 avec le CHIR a réduit de 24% le ratio ATP/ADP par rapport aux cellules non traitées (Figure 24B). L'inhibition de la glycolyse dans les cellules PANC1, à l'aide de l'analogue 2-déoxyglucose (2-DG), a diminué de 54% le ratio ATP/ADP par rapport aux cellules non traitées. Nos résultats suggèrent que l'inhibition des GSK3 mène à une baisse de la production d'ATP des cellules pancréatiques tumorales. Afin d'évaluer l'impact d'une inhibition de la glycolyse dans les cellules pancréatiques tumorales, nous avons privé en glucose ces cellules pendant 48h et évalué l'expression de marqueurs d'apoptose et d'autophagie. Nous avons observé que la privation en glucose induit une augmentation du clivage de PARP, de la phosphorylation de cJUN et JNK, ainsi que de l'expression de LC3B II dans les cellules PANC1 (Figure 24C). Ce résultat suggère que l'inhibition de la glycolyse induit l'apoptose et l'autophagie dans les cellules pancréatiques tumorales humaines. D'ailleurs, l'inhibition de la glycolyse à l'aide du 2-déoxyglucose augmente également l'expression de LC3B II dans ces cellules appuyant notre résultat précédent (Figure 24D). Ceci suggère que l'inhibition de la glycolyse induit une réponse similaire à celle observé suite à l'inhibition des GSK3, c'est-à-dire une induction de l'apoptose et de l'autophagie.



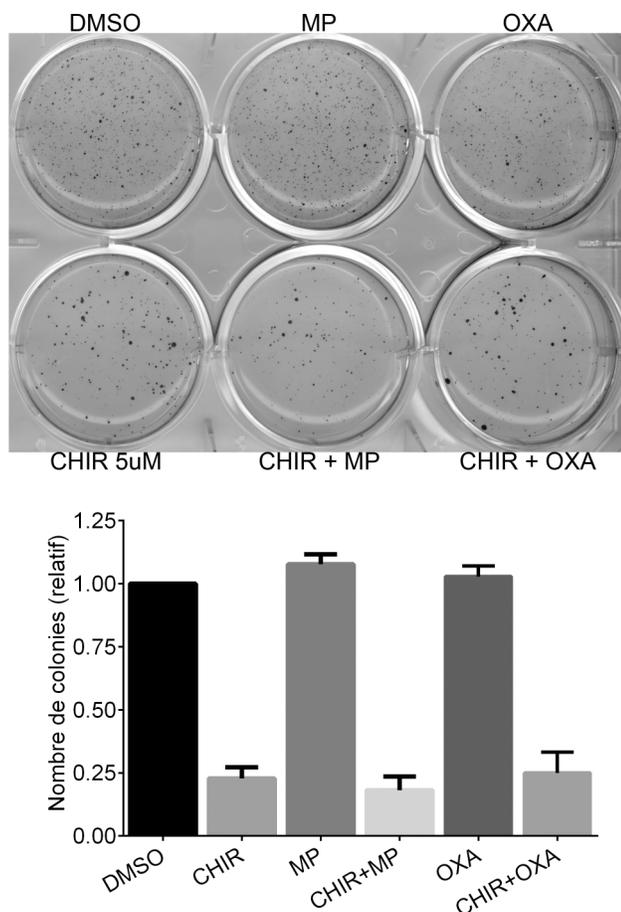
**Figure 24: Les GSK3 et TFEB influencent le métabolisme du glycogène et l'inhibition de la glycolyse induit l'autophagie dans les cellules PANC1.** **A)** Les cellules PANC1-shCTL et PANC1-shTFEB ont été traitées 24h sans (DMSO) ou avec l'inhibiteur des GSK3 (CHIR; 5 $\mu$ M). Ensuite, les cellules ont été colorées à l'acide périodique de Schiff's (PAS). **B)** Les cellules PANC1 ont été traitées 24h sans (DMSO) ou avec le CHIR ou le 2-Déoxyglucose (2-DG; 10mM). Les niveaux intracellulaires d'ATP et d'ADP ont été mesurés à l'aide du kit ApoSENSOR. Les valeurs du ratio ATP/ADP relatives aux cellules contrôles (DMSO) sont représentées dans le graphique (n=2). **C)** Les cellules PANC1 ont été cultivées pendant 48h dans du milieu complet avec glucose (25mM; glc) ou sans glucose (0mM). **D)** Les cellules PANC1 ont été traitées 24h avec le 2-Déoxyglucose (2-DG) aux concentrations indiquées. **C-D)** L'expression protéique a été évaluée par immunobuvardage avec les anticorps indiqués. La densitométrie a été calculé à l'aide du logiciel imageJ et **D)** normalisé par rapport à la GAPDH. Les valeurs **C)** de LC3B II et **D)** du ratio LC3B II/GAPDH relatif aux contrôles sont indiquées.

Par la suite, nous avons analysé si la régulation du métabolisme par les GSK3 participe à la régulation de la survie des cellules pancréatiques tumorales. Nous avons émis l'hypothèse que l'accumulation de glycogène suite à l'inhibition des GSK3 pourrait diminuer la quantité de glucose disponible pour la glycolyse. Ceci pourrait limiter la production de pyruvate, un intermédiaire métabolique utilisé pour la production d'ATP par le cycle de Krebs. Afin d'assurer le maintien d'un niveau de pyruvate requis pour la production d'ATP par le cycle de Krebs, nous avons supplémenté les cellules avec du méthyle pyruvate (MP). L'ajout de méthyle pyruvate a bloqué le clivage de PARP et de la caspase 7 induit par l'inhibiteur des GSK3 le SB216763 dans les cellules PANC1 (Figure 25A). Le traitement avec le méthyle pyruvate a également réduit la phosphorylation de cJUN induite par le SB216763. De plus, le traitement des cellules PANC1 préalablement infectées avec le shGSK3 $\beta$  pendant 24h avec le méthyle pyruvate a réduit l'apoptose induite par la déplétion de l'expression de GSK3 $\beta$  (Figure 25B). Ces résultats suggèrent que l'inhibition des GSK3 induit l'apoptose des cellules pancréatiques tumorales humaines via des mécanismes impliquant une régulation du métabolisme.

Puisque l'ajout de méthyle pyruvate a prévenu l'apoptose induite par l'inhibition des GSK3, nous avons déterminé si l'ajout d'intermédiaires métaboliques permettrait également d'empêcher la diminution de la croissance en indépendance d'ancrage des cellules PANC1 suite à l'inhibition des GSK3. Afin de supporter la production d'ATP au niveau des mitochondries, les intermédiaires du cycle de Krebs, le pyruvate (méthyle pyruvate) et l'acide oxaloacétique (OXA) ont été ajoutés. Les cellules PANC1 ont étéensemencées en agarose mou et traitées avec le CHIR seul ou combiné avec du méthyle pyruvate ou de l'acide oxaloacétique. Les traitements avec le méthyle pyruvate et l'acide oxaloacétique n'ont pas empêché la baisse du nombre de colonies formées induite par le CHIR (Figure 26). Ce résultat suggère que l'ajout d'intermédiaires métaboliques alimentant le cycle de Krebs ne prévient pas l'effet de l'inhibition des GSK3 sur la croissance en indépendance d'ancrage.



**Figure 25: L'ajout de méthyle pyruvate prévient l'apoptose induite par l'inhibition des GSK3 dans les cellules PANC1. A)** Les cellules PANC1 ont été traitées sans (DMSO) ou avec l'inhibiteur des GSK3 (SB216763; SB; 20 $\mu$ M), seul ou avec un supplément de méthyle pyruvate (MP; 10mM) pendant 48h. **B)** Les cellules PANC1 ont été infectées avec le shGSK3 $\beta$  ou le shCTL (NonTarget). Quarante-huit heures post-infection, les cellules ont été supplémentées ou non avec 10mM de MP pendant 24h. **A-B)** L'expression protéique a été évaluée par immunobuvardage avec les anticorps indiqués. **B)** La densitométrie a été calculé à l'aide du logiciel imageJ et les valeurs de LC3B II relatif au contrôle (shCTL) sont indiquées.



**Figure 26: L'ajout d'intermédiaires métaboliques ne prévient pas la diminution de la capacité de croissance en indépendance d'ancrage des cellules PANC1 induite par l'inhibition des GSK3.** Les cellules PANC1 ont étéensemencées en agarose mou et à partir du lendemain traitées sans (DMSO) ou avec l'inhibiteur des GSK3 (CHIR; 5 $\mu$ M) seul ou combiné avec les intermédiaires métaboliques méthyle pyruvate (MP; 10mM) ou acide oxaloacétique (OXA; 5mM). Les cellules ont été cultivées en agarose mou pendant 3 semaines avant la coloration des colonies à l'aide de MTT. La photo d'une expérience représentative est montrée. Le nombre de colonies formées a été dénombré à l'aide du logiciel ImageJ et le nombre de colonies dans les contrôles (DMSO) a été fixé à 1. \*\*\*  $p < 0,001$  (n=3)

Nos résultats démontrent que l'activité des GSK3 régule les niveaux de glycogène et d'ATP dans les cellules pancréatiques tumorales humaines. Nos travaux suggèrent que les GSK3 régulent la survie des cellules pancréatiques tumorales humaines en partie via des mécanismes impliquant une régulation de voies métaboliques associées à la production d'ATP. D'autres études seront nécessaires afin de déterminer précisément l'impact de l'inhibition des GSK3 sur le métabolisme de ces cellules, notamment au niveau de la glycolyse et du cycle de Krebs.

## IV- Discussion

Des niveaux élevés d'autophagie ont été observés dans les cellules pancréatiques cancéreuses et ce processus est requis pour leur croissance (S. Yang et al., 2011). Différents agents chimiothérapeutiques, tels le 5-FU et la gemcitabine, induisent l'autophagie dans les cellules pancréatiques tumorales et l'inhibition de ce processus augmente l'effet cytotoxique de ces traitements (Donohue et al., 2013; Hashimoto et al., 2014; Papademetrio et al., 2014). Le potentiel thérapeutique de l'inhibition des GSK3 est présentement à l'étude pour ce cancer, toutefois peu d'études ont analysé l'impact des GSK3 sur l'autophagie. Quelques évidences suggèrent que l'inhibition des GSK3 peut entraîner une induction de l'autophagie dans différents contextes cellulaires (Azoulay-Alfaguter et al., 2014; Gavilán et al., 2013; Parr et al., 2012; J. Yang et al., 2010).

### 1. L'inhibition des GSK3 induit l'apoptose et l'autophagie dans les cellules pancréatiques tumorales humaines

Nous avons d'abord évalué l'impact de l'inhibition de l'activité des GSK3 sur la capacité des cellules pancréatiques tumorales à croître en indépendance d'ancrage, une caractéristique des cellules cancéreuses. Nos résultats de croissance en agarose mou démontrent que l'activité des GSK3 est essentielle pour la croissance en indépendance d'ancrage des cellules pancréatiques tumorales humaines (Figure 7). L'inhibition prolongée de l'activité des GSK3 induit également une réponse apoptotique dans les cellules pancréatiques tumorales, telle qu'observée à la figure 8 (A et B) et dans nos résultats antérieurs (Marchand et al., 2012). De façon intéressante, nous n'avons pas observé de réponse apoptotique dans les cellules pancréatiques non tumorales HPDE suggérant que celle-ci serait spécifique aux cellules tumorales. Nos observations suggèrent donc que l'activité des GSK3 régule positivement la survie et la croissance des cellules pancréatiques tumorales et appuient le potentiel thérapeutique de l'inhibition des GSK3. Plusieurs études ont également démontré que l'activité des GSK3 favorise

la survie de différentes cellules cancéreuses, notamment du cancer du pancréas, du côlon, de la prostate, supportant le potentiel thérapeutique de leur inhibition (Mai et al., 2007; Ougolkov et al., 2006; Shakoori et al., 2007; Q. Zhu et al., 2011). Il est donc crucial d'étudier en profondeur l'effet de l'inhibition de l'activité des GSK3 dans les cellules pancréatiques tumorales, afin d'évaluer son potentiel comme traitement du cancer pancréatique, un cancer pour lequel aucun traitement n'est encore curatif.

Quelques études ont proposé l'implication des GSK3 dans la régulation de l'autophagie, toutefois son rôle semble dépendant du contexte cellulaire. D'une part, les GSK3 réactivées suite à une privation en sérum peuvent favoriser l'induction de l'autophagie via l'activation de TIP60 qui acétyle et active ULK1 (S.-Y. Lin et al., 2012). D'ailleurs, l'inhibition de l'activité des GSK3 dans les cellules de cancer colorectal HCT116 inhibe l'autophagie induite par la privation en sérum, sans toutefois influencer celle induite par une privation en glucose. À l'opposé, l'inhibition des GSK3 peut induire l'autophagie dans des cellules du cancer de la prostate et du sein (Azoulay-Alfaguter et al., 2014; J. Yang et al., 2010). Nous avons observé que l'inhibition de l'activité des GSK3 augmente l'expression de LC3B II (Figure 8A-B), ainsi que le marquage ponctué de LC3B (Figure 8C), représentatif des autophagosomes, dans les cellules pancréatiques tumorales suggérant l'induction de l'autophagie. Afin d'obtenir une quantification des vésicules autophagiques plus représentative, le dénombrement des ponctuas de LC3B observés dans des immunofluorescences à plus fort grossissement (100x) et dans un nombre plus élevé de cellules suite aux différents traitements sera nécessaire. Néanmoins, un défaut de la dégradation des autophagosomes pourrait entraîner une augmentation de l'expression et du marquage ponctué de LC3B. La mesure du flux autophagique est donc nécessaire afin de déterminer si l'augmentation de LC3B est due à une induction de l'autophagie. L'augmentation du flux autophagique observée suite à l'inhibition des GSK3 (Figure 9B-C) appuie nos résultats précédents suggérant la stimulation de l'autophagie. Nos résultats démontrent donc pour la première fois la régulation de l'autophagie par les GSK3

dans les cellules pancréatiques tumorales humaines. De façon intéressante, nous avons obtenu des résultats similaires dans les cellules pancréatiques épithéliales non tumorales (HPDE), c'est-à-dire une augmentation de l'expression de LC3B II, du marquage ponctué de LC3B et du flux autophagique suite à l'inhibition des GSK3 (Figure 10A-C). Ces observations suggèrent donc que l'activité des GSK3 régule l'autophagie autant dans les cellules épithéliales pancréatiques tumorales que non tumorales. D'ailleurs, il a été observé que l'inhibition de l'activité des GSK3 peut induire l'autophagie dans les cellules mammaires non tumorales MCF-10A (Azoulay-Alfaguter et al., 2014; Gavilán et al., 2013). De plus, nous avons observé des niveaux d'expression plus élevés de LC3B II dans les cellules MEF *Gsk3<sup>-/-</sup>* comparativement aux cellules contrôle MEF *Gsk3<sup>+/+</sup>* (Figure 10D) suggérant que la régulation de l'autophagie par les GSK3 s'étend à différents types cellulaires. De plus, l'induction de l'autophagie a été observée dès 24h suite à l'inhibition de l'activité des GSK3, tandis que la réponse apoptotique est observée seulement à partir de 48h (Figure 8B). Ainsi, nos résultats suggèrent que la stimulation de l'autophagie induite par l'inhibition des GSK3 précède l'induction de la réponse apoptotique. De plus, nos travaux se distinguent de ceux de YANG et al. ayant démontré une induction de l'autophagie, ainsi que de la mort cellulaire suite à l'inhibition des GSK3 dans des cellules de cancer de la prostate seulement lorsque privées en sérum (J. Yang et al., 2010). Nous avons observé que l'inhibition de l'activité des GSK3 peut induire l'apoptose et l'autophagie dans les cellules pancréatiques tumorales humaines supplémentées en sérum. Des effets similaires, c'est-à-dire une induction de l'apoptose et de l'autophagie, ont également été observés suite à l'inhibition des GSK3 dans ces cellules en absence de sérum (résultats non-montrés).

Nous avons aussi observé un marquage plus élevé des lysosomes suite à l'inhibition des GSK3 dans les cellules pancréatiques tumorales (Figure 9A) suggérant que l'activité des GSK3 pourrait réguler négativement les lysosomes. Le bruit de fond et le nombre élevé de ponctuas a rendu le dénombrement des lysosomes impossible, alors l'intensité du signal du lysotracker a été quantifié. Afin

de déterminer l'effet de l'inhibition des GSK3 sur le nombre de lysosomes, l'optimisation de la concentration et le temps d'incubation avec le lysotracker ou une immunofluorescence dirigée contre le marqueur de lysosome LAMP1 pourrait permettre le dénombrement des lysosomes à fort grossissement (100x). Il a été démontré que l'acidification des lysosomes est requise pour la dégradation et le recyclage de leur contenu (Yoshimori et al., 1991). Ceci suggère que le lysotracker permettrait de visualiser les lysosomes actifs, puisqu'il marque les lysosomes ayant un pH acide tel qu'observé par la perte du signal suite à l'inhibition de l'acidification des lysosomes à l'aide de la Bafilomycine A1 (Figure 9A). L'inhibition de l'activité des GSK3 semble donc augmenter l'activité lysosomale dans les cellules pancréatiques tumorales. L'analyse d'hydrolases lysosomales telles que la cathepsine B ou D permettrait de déterminer si l'inhibition des GSK3 augmente l'activité des lysosomes. Lors d'expériences préliminaires, nous n'avons pas observé de différence dans l'expression de l'ARNm des cathepsines B et D, ni de l'expression de la protéine cathepsine D suite à l'inhibition des GSK3 dans les cellules PANC1. Il serait donc pertinent d'évaluer l'activité des cathepsines B et D à l'aide de substrats fluorescents suite à l'inhibition des GSK3 dans les cellules pancréatiques tumorales. Une régulation des lysosomes par les GSK3 pourrait contribuer à leur régulation de l'autophagie puisque la fusion des lysosomes avec les autophagosomes permet la dégradation du contenu de ces dernières. En accord avec ces résultats, il a été observé que l'inhibition des GSK3 contribue à la dégradation de la protéine précurseur de l'amyloïde impliquée dans la maladie d'Alzheimer en favorisant la biogenèse des lysosomes et l'autophagie (Avrahami et al., 2013; Parr et al., 2012). D'autre part, une étude a suggéré que l'autophagie est nécessaire pour l'activation des lysosomes suite à une privation en nutriments ou l'inhibition de la voie mTOR (J. Zhou et al., 2013). Il serait intéressant de déterminer si l'inhibition de l'autophagie à l'aide d'un siATG5 prévient l'augmentation du marquage lysotracker suite à l'inhibition des GSK3, afin de déterminer si celles-ci peuvent réguler la dégradation lysosomale indépendamment de son effet sur l'autophagie.

## 2. L'inhibition de l'autophagie sensibilise les cellules pancréatiques tumorales humaines à l'apoptose induite par l'inhibition des GSK3

Des niveaux élevés d'autophagie ont été observés autant dans les cellules pancréatiques tumorales que dans des tissus d'adénocarcinomes pancréatiques humains (S. Yang et al., 2011). En accord avec cette étude, le marquage ponctué de LC3B que nous avons observé dans les cellules pancréatiques tumorales PANC1 à l'état basal (Figure 8C) semble plus élevé que celui observé dans les cellules pancréatiques non tumorales HPDE (Figure 10B). Toutefois, une quantification plus rigoureuse des ponctuas de LC3B, c'est-à-dire le dénombrement dans un plus grand nombre de cellules (30 et plus) et à plus fort grossissement (100x) afin de mieux distinguer les autophagosomes est nécessaire. Il a été observé que l'autophagie est requise pour la croissance tumorale de xénogreffes de cellules pancréatiques tumorales suggérant l'inhibition de l'autophagie comme traitement potentiel du cancer pancréatiques (A. Yang et al., 2014; S. Yang et al., 2011). Ces études suggèrent donc que l'autophagie favorise la croissance des cellules pancréatiques tumorales.

Nous avons donc analysé l'impact de l'inhibition de l'autophagie sur l'apoptose induite par l'inhibition des GSK3 dans les cellules pancréatiques tumorales humaines. Nous avons observé que l'inhibition de l'autophagie à l'aide de la Bafilomycine A1 promeut l'apoptose induite par l'inhibition de l'activité des GSK3 à l'aide de l'inhibiteur pharmacologique CHIR99021 ou suite à la délétion spécifique de GSK3 $\beta$  (Figure 11A-B). Puisque la Bafilomycine A1 inhibe l'autophagie en bloquant l'acidification des lysosomes, il est possible que les effets de la Bafilomycine A1 impliquent des mécanismes indépendants de l'autophagie. Nous avons donc inhibé spécifiquement l'autophagie à l'aide d'un siARN dirigé contre ATG5, une protéine nécessaire pour l'élongation des autophagosomes. La déplétion d'ATG5 a sensibilisé les cellules pancréatiques tumorales à l'apoptose induite par l'inhibition des GSK3 (Figure 11C) supportant les résultats obtenus avec la Bafilomycine A1. Il a été suggéré que l'inhibition de l'acidification des

lysosomes ou de protéases lysosomales peut promouvoir la séquestration et l'inhibition des GSK3 en réponse aux WNT (Dobrowolski et al., 2012). Une inhibition de l'autophagie ou des lysosomes pourrait donc réguler négativement l'activité des GSK3 suggérant qu'une inhibition plus importante des GSK3 pourrait contribuer à la promotion de l'apoptose observée suite à l'inhibition de l'autophagie (Figure 11). Toutefois, Dobrowolski et ses collaborateurs n'ont pas observé une promotion de l'inhibition de l'activité des GSK3 suite à l'inhibition des lysosomes en absence de ligand WNT (Dobrowolski et al., 2012). De plus, les auteurs ont démontré qu'à forte dose (>50nM) la Bafilomycine A1 ne promeut pas l'activation de la voie WNT, mais semble plutôt l'inhiber. Il est donc peu probable que la sensibilisation des cellules pancréatiques tumorales à l'apoptose induite par l'inhibition des GSK3 suite à l'inhibition de l'autophagie (Figure 11) soit due à une plus forte inhibition de l'activité des GSK3. Il serait important de vérifier si l'inhibition de l'autophagie à l'aide de la Bafilomycine A1 ou d'un siATG5 influence l'activité des GSK3 dans les cellules pancréatiques tumorales. Nos résultats suggèrent que l'inhibition de l'autophagie favorise l'induction de l'apoptose suite à l'inhibition des GSK3 dans les cellules pancréatiques tumorales. D'ailleurs, deux agents chimiothérapeutiques présentement utilisés pour traiter le cancer pancréatique, le 5-FU et la gemcitabine, induisent l'autophagie et son inhibition permet d'augmenter l'efficacité de ces traitements à induire l'apoptose (Donohue et al., 2013; Hashimoto et al., 2014; Papademetrio et al., 2014). Nous avons également démontré que l'inhibition de l'autophagie, à l'aide de la Bafilomycine A1, réduit la croissance en indépendance d'ancrage des cellules pancréatiques tumorales (Figure 11D). Ce résultat appuie les études démontrant que l'autophagie est requise pour la croissance des cellules pancréatiques tumorales (A. Yang et al., 2014; S. Yang et al., 2011). La croissance en indépendance d'ancrage des cellules pancréatiques tumorales est davantage réduite suite à l'inhibition de l'autophagie combinée à l'inhibition des GSK3 (Figure 11D). Nos résultats suggèrent le potentiel thérapeutique de l'inhibition de l'activité des GSK3 pour le traitement du cancer pancréatique, particulièrement en combinaison avec une inhibition de l'autophagie qui augmenterait son efficacité. À cet égard, nous avons

démontré que l'inhibition de l'activité des GSK3 ne mène pas à l'apoptose des cellules épithéliales pancréatiques non tumorales HPDE suggérant qu'elles sont moins sensibles à l'inhibition des GSK3 (Marchand et al., 2012). D'autres part, nos résultats ainsi que ceux de l'équipe de Kimmelman démontrent que les cellules pancréatiques tumorales (Figure 8C) ont des niveaux élevés d'autophagie à l'état basal en comparaison aux faibles niveaux observés dans les cellules non tumorale HPDE (Figure 10B et S. Yang et al., 2011). De plus, l'inhibition de l'autophagie inhibe la prolifération et induit l'apoptose des cellules pancréatiques tumorales ayant un KRAS muté isolées de patients, tandis que les cellules d'un patient exprimant un KRAS de type sauvage et démontrant un faible niveau d'autophagie ne sont pas affectées (A. Yang et al., 2014). Lors d'expériences préliminaires, nous avons observé une faible augmentation du clivage de PARP dans les cellules HPDE suite aux traitements avec un inhibiteur des GSK3 combinés à l'inhibition de l'autophagie suggérant que ces cellules semblent peu affectées par ce traitement. Ces observations suggèrent que les cellules pancréatiques tumorales seraient plus sensibles à l'inhibition combinée des GSK3 et de l'autophagie appuyant le potentiel thérapeutique d'un tel traitement pour le cancer pancréatique.

### 3. L'inhibition des GSK3 induit l'autophagie indépendamment de la voie JNK-cJUN.

Nous avons démontré que l'inhibition des GSK3 induit l'activation de la voie de signalisation JNK-cJUN et que celle-ci est requise pour l'induction de la réponse apoptotique (Marchand et al., 2012). Des études suggèrent qu'une activation prolongée de la voie JNK induit l'apoptose, tandis qu'une inhibition transitoire favorise plutôt la prolifération (Chen et al., 1996; Sánchez-Perez et al., 1998). Il a également été observé que l'activité des JNK peut contribuer à l'induction de l'autophagie suite à un traitement aux céramides (D.-D. Li et al., 2009; Pattingre et al., 2009) ou à une privation en nutriments (Y. Wei et al., 2008). D'ailleurs, nous avons observé une activation de la voie JNK-cJUN, l'induction de l'apoptose et de l'autophagie dans les cellules pancréatiques tumorales privées en glucose (Figure

24C). De plus, l'ajout de méthyle pyruvate prévient l'augmentation de la phosphorylation de cJUN et l'apoptose induite par l'inhibition des GSK3 (Figure 25A). Nous avons donc évalué si l'inhibition de la voie JNK-cJUN empêche l'induction de l'autophagie suite à l'inhibition des GSK3. Contrairement à la réponse apoptotique, l'induction de l'autophagie suite à l'inhibition des GSK3 n'est pas prévenue par le traitement avec le SP600125, un inhibiteur des JNK (Figure 12A) ou par la déplétion de cJUN à l'aide d'un shARN (Figure 12B). L'inhibition des GSK3 semble donc induire l'autophagie indépendamment de la voie de signalisation JNK-cJUN.

Un stress au niveau du réticulum endoplasmique peut mener à l'activation de la voie JNK via la protéine IRE1 $\alpha$  qui est impliquée dans une voie de l'« Unfolded Protein Response » (UPR) (F. Urano et al., 2000). De plus, l'activation des voies de l'UPR suite à un stress du réticulum endoplasmique peut mener à l'induction de l'autophagie ainsi que de l'apoptose (Deegan et al., 2013). Afin d'évaluer si l'inhibition des GSK3 mène à un stress du réticulum endoplasmique, nous avons évalué l'expression de protéines associées à l'UPR. Nous avons observé une augmentation de l'expression des protéines IRE1 $\alpha$  et GRP78 à partir de 48h suite à l'inhibition des GSK3 dans les cellules PANC1 (Figure 13) suggérant l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique. D'ailleurs, le traitement de ces cellules pendant 24h avec deux inducteurs de stress du réticulum endoplasmique, la thapsigargine ou la tunicamycine, a induit une augmentation similaire de l'expression d'IRE1 $\alpha$  et de GRP78 (Figure 13). Il est donc possible qu'une inhibition des GSK3 mène à l'activation des voies de l'UPR qui pourraient contribuer à l'induction de l'apoptose des cellules pancréatiques tumorales. Il serait important d'analyser les niveaux de phosphorylation des protéines PERK et IRE1 $\alpha$ , ainsi que l'expression des protéines ATF6 et ATF4 afin d'évaluer l'activité des voies de l'UPR suite à l'inhibition des GSK3. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués permettrait de déterminer si les voies de l'UPR contribuent à l'apoptose induite par l'inhibition des GSK3 dépendamment ou non de son impact sur la voie JNK.

Il a été observé que le facteur de transcription CHOP induit suite au stress du réticulum endoplasmique entraîne la transcription du gène *ATG5* ce qui contribue à l'induction de l'autophagie (Rouschop et al., 2010). Malgré que nos résultats suggèrent l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique suite à l'inhibition des GSK3, nous n'avons pas observé de modulation de l'expression d'*ATG5* dans les cellules pancréatiques tumorales traitées avec un inhibiteur des GSK3 (Figure 11C et 20B). De plus, l'induction de l'autophagie qui est observée dès 24h suite à l'inhibition des GSK3, précède l'augmentation de l'expression des protéines associées au stress du réticulum endoplasmique observée à partir de 48h. Il pourrait donc être possible que des voies de signalisation autres que celles associées aux stress du réticulum endoplasmique, soit impliquées dans l'induction de l'autophagie par l'inhibition des GSK3. Toutefois, une analyse des événements précoces de l'UPR, tels la phosphorylation de PERK, IRE1 $\alpha$ , eIF2 $\alpha$  ou les niveaux de XBP1s sera nécessaire et permettrait également de confirmer une induction de l'UPR suite à l'inhibition des GSK3. Nous n'excluons pas la possibilité d'une contribution d'un stress du réticulum endoplasmique dans les effets médiés par l'inhibition des GSK3, particulièrement au niveau de la réponse apoptotique. Ainsi, il serait intéressant d'analyser l'expression et la phosphorylation des protéines de la voie IRE1 $\alpha$ -TRAF2-ASK1 suite à l'inhibition des GSK3 puisqu'elle pourrait mener à l'activation de la voie JNK. Cependant, nous avons observé une activation de la voie JNK-cJUN dès 30 minutes d'inhibition des GSK3 (Marchand et al., 2012) ce qui suggère qu'un autre mécanisme serait impliqué dans la régulation rapide de cette voie. Il demeure toutefois possible qu'une activation de la voie de l'UPR en réponse au stress du réticulum endoplasmique pourrait jouer un rôle dans l'activation soutenue de la voie JNK favorisant l'induction de l'apoptose. La déplétion de PERK, IRE1 $\alpha$  ou d'ATF6 permettrait de déterminer l'impact de l'UPR sur l'activation soutenue de la voie JNK-cJUN suite à l'inhibition des GSK3.

#### 4. L'inhibition des GSK3 mène à l'inactivation de la voie mTORC1 dans les cellules pancréatiques épithéliales humaines

Des études ont suggéré l'implication des GSK3 dans la régulation de la voie de signalisation mTOR, qui est connue pour réguler négativement l'autophagie. D'une part, il a été démontré que les GSK3 coopèrent avec l'AMPK afin de phosphoryler la protéine TSC2 et inactiver la voie mTOR (Inoki et al., 2006). Contrairement, il a été rapporté que l'inhibition des GSK3 peut mener à l'inactivation de la voie de signalisation mTORC1 (Azoulay-Alfaguter et al., 2014). Puisqu'une inactivation de la voie mTORC1 peut induire l'autophagie, nous avons évalué l'impact de l'inhibition des GSK3 sur l'expression du substrat de mTORC1, la protéine S6K1. Nous avons observé une diminution de la phosphorylation de la protéine S6K1 et de son substrat la protéine S6 dans les cellules pancréatiques tumorales humaines (BxPC3, MIA PaCa2 et PANC1) traitées 24h avec un inhibiteur des GSK3 (Figure 14A) suggérant une inactivation de la voie mTORC1 dans ces cellules. D'ailleurs, la phosphorylation des protéines S6K1 et S6 est réduite suite à l'inhibition spécifique des GSK3 via la déplétion de l'expression de GSK3  $\alpha$  et  $\beta$  à l'aide de shARN dans les cellules PANC1 (Figure 14B). Une diminution similaire de la phosphorylation de la S6K1 et de la S6 est également observée dans les cellules pancréatiques épithéliales ductales non tumorales humaines HPDE (Figure 14A) suggérant que l'inhibition de la voie mTORC1 en réponse à l'inhibition des GSK3 n'est pas spécifique aux cellules tumorales. Nous avons observé une diminution similaire de la phosphorylation des protéines S6K1 et S6 dans les cellules PANC1-shCTL et PANC1-shcJUN suite à l'inhibition des GSK3 (Figure 14C). Ceci suggère que la déplétion de cJUN n'affecte pas la régulation de la voie mTORC1 par les GSK3. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que l'activation de JNK suite à l'inhibition des GSK3 influence la voie mTOR indépendamment de cJUN. L'utilisation de l'inhibiteur des JNK (SP600125) ou d'un shARN dirigé contre JNK permettrait de déterminer si la régulation des voies mTOR et JNK par les GSK3 s'effectue indépendamment. Nos résultats suggèrent que les GSK3 régulent le voie mTOR via un mécanisme distinct de la

régulation de la voie JNK-cJUN et est en accord avec nos résultats discutés à la section 3 démontrant que l'inhibition des GSK3 induit l'autophagie indépendamment de la voie JNK-cJUN.

Par contre, il est à noter que des études ont récemment démontré que les GSK3 peuvent directement réguler les protéines S6K1 et 4EBP1, deux substrats du complexe mTORC1 (S Shin et al., 2014; Sejeong Shin et al., 2011). Ainsi, la diminution de la phosphorylation de S6K1 et de S6 observée suite à l'inhibition des GSK3 pourrait être indépendante de l'activité mTORC1. À la figure 15, nous observons une diminution de la phosphorylation de la protéine S6K1 à partir de 4h d'inhibition des GSK3 corrélant avec une augmentation de l'expression de LC3B II. La voie mTOR inhibe l'autophagie entre autres en phosphorylant et inactivant la protéine ULK1 qui est impliquée dans l'initiation de l'autophagie (J. Kim et al., 2011). Nous avons observé que l'inhibition des GSK3 pendant 16 et 24h semble diminuer la phosphorylation mTORC1-dépendante sur la Ser757 d'ULK1 (Figure 15). L'activité d'ULK1 peut également être favorisée suite à sa phosphorylation par la kinase AMPK (Bach et al., 2011; J. Kim et al., 2011). Puisqu'il a été observé que l'inhibition des GSK3 peut mener à l'activation de l'AMPK (Suzuki et al., 2013), nous avons évalué la phosphorylation de l'AMPK sur la Thr172 nécessaire à son activité. L'inhibition des GSK3 dans les cellules PANC1 n'a pas augmenté la phosphorylation de l'AMPK1 $\alpha$  (Figure 15). L'évaluation de l'expression totale des protéines ULK1 et AMPK1 $\alpha$  est toutefois nécessaire afin de valider ces derniers résultats. La phosphorylation AMPK-dépendante d'ULK1 sur les sérines 317 et 555 pourrait également être évaluée suite à l'inhibition des GSK3. Cette observation avec nos résultats précédents démontrant l'inhibition de l'axe S6K1-S6 supporte une inactivation de la voie mTORC1 suite à l'inhibition des GSK3. Par ailleurs, le traitement des cellules PANC1 avec l'inhibiteur de S6K1, le PF-4708671, n'est pas suffisant pour induire l'augmentation de l'expression de LC3B II (Figure 16A). Ce résultat suggère que l'inactivation de la S6K1 à elle seule n'induit pas l'autophagie dans les cellules pancréatiques tumorales humaines. De plus, l'augmentation de l'expression de LC3B II induite par l'inhibition des GSK3 à la figure 15 corrèle avec

la diminution de la phosphorylation de S6K1. La diminution de la phosphorylation mTOR-dépendante d'ULK1 suite à l'inhibition des GSK3 (Figure 15A) suggère que les GSK3 pourraient réguler l'activité du complexe mTORC1. Nos résultats suggèrent que les GSK3 sont en amont de la signalisation mTORC1 et l'inhibition de celle-ci pourrait contribuer à l'induction de l'autophagie dans les cellules épithéliales pancréatiques. D'ailleurs, nos résultats démontrent que l'inhibition de la voie mTOR à l'aide de la Torin1 induit l'autophagie dans les cellules pancréatiques tumorales (Figure 8C-D) et non tumorales (Figure 10B).

Par la suite, nous avons tenté de maintenir l'activité mTORC1 élevée afin de déterminer si l'induction de l'autophagie par l'inhibition des GSK3 est prévenue. Afin d'évaluer le rôle de la régulation de mTORC1 par les GSK3 dans l'induction de l'autophagie, nous avons exprimé le mutant de mTOR E2419K qui demeure actif malgré une privation en nutriments et en facteurs de croissance, afin de suractiver la voie de signalisation mTOR (J. Urano et al., 2007). L'expression d'un mTOR de type sauvage ou du mutant E2419K n'a pas permis de prévenir la diminution de la phosphorylation de la S6K1 et de la S6 par l'inhibition des GSK3 (Figure 16B). Ce résultat pourrait s'expliquer soit par une régulation directe de la phosphorylation de S6K1 par les GSK3 ou que le mutant mTOR E2419K demeure sensible à une régulation par les GSK3. Une approche différente utilisant des cellules MEF *Tsc2*<sup>-/-</sup> ayant un complexe TSC1/2 inactif qui maintient la voie mTOR active pourrait permettre d'évaluer le rôle de la régulation GSK3-dépendante de la voie mTORC1 au niveau de la régulation de l'autophagie.

## 5. Régulation du facteur de transcription TFEB par les GSK3

### 5.1 L'inhibition des GSK3 ou de mTOR induit la translocation nucléaire de TFEB

Récemment, des études ont rapporté un rôle important de la voie mTORC1 dans le contrôle du facteur de transcription TFEB, un régulateur majeur de l'autophagie et de la biogenèse des lysosomes. Elles ont démontré que l'inhibition de la voie mTORC1 induit la translocation nucléaire de TFEB (Jose a. Martina et

al., 2012; Jose a. Martina & Puertollano, 2013; Roczniak-Ferguson et al., 2012; Settembre et al., 2012). En accord avec ces études, nous avons observé que l'inhibition de la voie mTOR pendant 1h à l'aide de la Torin1 entraîne la translocation nucléaire de la protéine TFEB-EGFP dans les cellules HEK293T (Figure 17A). Il est à noter que la Torin1 inhibe les complexes mTORC1 et mTORC2 ne permettant donc pas d'exclure une contribution de mTORC2. De façon intéressante, nos résultats démontrent aussi la translocation nucléaire de TFEB-EGFP suite à 1h d'inhibition de l'activité des GSK3. D'ailleurs, la translocation nucléaire de TFEB suite à l'inhibition de l'activité des GSK3 a récemment été observée dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (Parr et al., 2012). Le traitement avec l'inhibiteur des GSK3, CHIR99021, a également induit la translocation nucléaire de la protéine TFEB endogène dans les cellules pancréatiques tumorales (PANC1) (Figure 17C) et non tumorales (HPDE) humaines (Figure 17D). La translocation nucléaire de TFEB suite à l'inhibition des GSK3 ou de mTOR dans les cellules PANC1 a été observée par fractionnement subcellulaire (Figure 18A) appuyant nos résultats obtenus par immunofluorescence. Ces observations suggèrent que l'activité des GSK3 régule la localisation de TFEB dans différents types et contextes cellulaires et pourrait représenter un mécanisme général de la régulation de TFEB. Nous avons observé que la translocation nucléaire de TFEB suite à l'inhibition des GSK3 semble précéder son impact négatif sur la voie mTORC1 (Figure 17 et 18C). Malgré que nous ne puissions exclure que l'inactivation de la voie mTORC1 observée suite à l'inhibition des GSK3 contribuerait à la translocation nucléaire de TFEB, nos résultats suggèrent que l'impact de l'inhibition des GSK3 sur la voie mTORC1 ne représenterait pas le principal mécanisme de régulation GSK3-dépendante de la localisation nucléaire de TFEB. Il serait donc intéressant d'évaluer l'expression et la localisation de TFEB suite à l'inhibition des GSK3 dans des cellules exprimant le mutant mTOR<sup>E2419K</sup> ou des MEF *Tsc2*<sup>-/-</sup> ayant une activité mTORC1 élevée.

## 5.2 L'activité des GSK3 et de mTOR régule la phosphorylation de TFEB

Nous avons évalué le profil de migration de la protéine TFEB, puisqu'il a été observé que la phosphorylation de TFEB, notamment via mTORC1, régule sa localisation cellulaire (Jose a. Martina et al., 2012; Roczniak-Ferguson et al., 2012). L'expression de formes de plus faibles poids moléculaire de la protéine TFEB endogène a été observée dans les cellules où l'activité des GSK3 a été inhibée à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques (Figure 18A et C) ou des shGSK3 $\alpha$  et shGSK3 $\beta$  (Figure 18B). Ce changement de profil de migration de la protéine TFEB suite à l'inhibition des GSK3 a été observé dans différentes cellules, notamment les cellules pancréatiques tumorales humaines (PANC1 et MIA PaCa2) et les cellules non tumorales HEK293T (Figure 18C). Nous avons poursuivi l'étude de la régulation de TFEB par les GSK3 en analysant les modifications post-traductionnelles de TFEB qui pourrait expliquer ces changements de migration observés. La sumoylation des protéines TFEB, MITF et TFE3, des facteurs de transcription de la famille MiTF/TFE, a été impliquée dans la régulation de leur activité, toutefois celle-ci ne module pas leur localisation (Miller et al., 2005). Puisque des études ont démontré la régulation de la localisation de TFEB via sa phosphorylation, nous avons donc vérifié si les GSK3 régulent la phosphorylation de TFEB.

D'abord, la protéine TFEB-EGFP est phosphorylée à l'état basal dans les cellules HEK293T, tel que visualisé par notre essai phosphatase (Figure 19A). De façon similaire, la protéine TFEB-GFP a été observée phosphorylée à l'état basal dans les cellules HeLa (Roczniak-Ferguson et al., 2012). Il a été observé que la phosphorylation de TFEB sur le résidu Ser211 entraîne son association avec les protéines 14-3-3 ce qui séquestre TFEB au niveau du cytosol (Jose a. Martina et al., 2012; Roczniak-Ferguson et al., 2012). La sérine 211 de TFEB est située au niveau d'une séquence composant un site consensus de liaison des protéines 14-3-3. À l'aide d'un anticorps reconnaissant la séquence consensus de liaison des protéines 14-3-3 lorsque phosphorylée, nous avons évalué la phosphorylation de

TFEB sur sa Ser211. Nous avons observé qu'à l'état basal la protéine TFEB-EGFP dans les cellules HEK293T est phosphorylée sur sa sérine 211 (Figure 19B). La phosphorylation de TFEB sur sa sérine 211 est réduite suite à l'inhibition de l'activité des GSK3 ou de mTOR. Nos résultats supportent les études ayant démontré la phosphorylation de la sérine 211 de TFEB par mTORC1 et suggère pour la première fois l'implication des GSK3 dans la régulation de la phosphorylation de ce résidu. Précédemment, nos résultats à la figure 14 ont démontré l'inactivation de la voie mTORC1 suite à l'inhibition des GSK3 suggérant que ces dernières pourraient réguler la phosphorylation de TFEB via mTORC1. Suite à une analyse plus détaillée, nous avons observé l'inactivation de la voie mTORC1 à partir de 2 à 4h suivant l'inhibition de l'activité des GSK3 (Figure 15). La phosphorylation de TFEB sur la Ser211 diminue rapidement (1h) suite à l'inhibition de l'activité des GSK3 (Figure 18C), alors que les niveaux de phosphorylation de S6K1 ne sont pas modulés suite à ce court traitement suggérant que les GSK3 pourraient réguler la phosphorylation de TFEB indépendamment de mTORC1. L'analyse bioinformatique de la séquence de la protéine TFEB nous a suggéré plusieurs sites potentiels de phosphorylation par les GSK3. Nous avons donc déterminé si les GSK3 peuvent phosphoryler la protéine TFEB. Nous avons observé qu'une kinase GSK3 $\beta$  recombinante peut phosphoryler la protéine TFEB-EGFP *in vitro* (Figure 18D et E). Même si l'inhibition des GSK3 semble suffisante à court terme pour réduire la phosphorylation sur la Ser211 de TFEB, nous ne pouvons exclure que l'inactivation de la voie mTORC1 observé suite à l'inhibition des GSK3 (Figure 15A) pourrait contribuer à l'inhibition de la phosphorylation de la Ser211 de TFEB à plus long terme. D'autres part, nos résultats suggèrent également l'implication de phosphatases dans la régulation de la phosphorylation de TFEB via les GSK3 (Figure 19C) qui est discuté plus en détail au prochain paragraphe. D'autres études ont démontré que la protéine TFEB est phosphorylée sur sa sérine 142, via notamment mTORC1 et ERK2 (Settembre et al., 2011, 2012). La phosphorylation de la sérine 142 de TFEB maintient son expression au niveau du cytosol, toutefois le mécanisme impliqué demeure inconnu. La mutation de la sérine 142 en alanine de la protéine TFEB, qui

empêche la phosphorylation de ce résidu, n'influence pas son association avec les protéines 14-3-3 (Roczniak-Ferguson et al., 2012). La régulation de la localisation de TFEB par la phosphorylation des sérines 142 ou 211 semble donc impliquer des mécanismes différents. L'impact de l'inhibition des GSK3 sur la phosphorylation de TFEB n'a pas été analysé sur la sérine 142 puisqu'il n'y a aucun anticorps phospho-spécifique de TFEB commercialement disponible. Puisque l'inhibition des GSK3 mène à l'inactivation de la voie mTORC1 (Figure 14), il est donc possible que les GSK3 puissent réguler la phosphorylation de la sérine 142 de TFEB via mTORC1. Bien qu'une régulation de la phosphorylation de TFEB par les GSK3 via sa régulation de mTORC1 soit possible, celle-ci ne permettrait pas d'expliquer la déphosphorylation plus importante observée suite à l'inhibition des GSK3 comparativement à l'inhibition de mTOR (Figure 18C). D'ailleurs, il est probable que les GSK3 régulent la phosphorylation de la Ser142 de TFEB indépendamment de mTORC1 puisque la déphosphorylation de TFEB observée suite à 1h d'inhibition des GSK3 ne corrèle pas avec une inhibition de la voie mTORC1 (Figure 18C). Il serait possible de comparer la phosphorylation *in vitro* d'un TFEB de type sauvage, mutée sur la Ser142 ou la Ser211 par une protéine GSK3 recombinante. Bien qu'il soit probable que l'inhibition des GSK3 puisse induire la translocation nucléaire de TFEB via la déphosphorylation des Ser142 et Ser211, la régulation de la phosphorylation de la Ser211 semble représenter le mécanisme privilégié et sera discuté plus en détails. Ainsi, nos résultats démontrent que les GSK3 peuvent réguler, indépendamment de mTORC1, la phosphorylation de TFEB modulant son association avec ses partenaires d'interaction qui sera discuté dans la prochaine section.

Les changements observés au niveau du profil de migration de la protéine TFEB suite à l'inhibition des GSK3 ou de mTOR étant rapide, dès 30 à 60 minutes, nous avons émis l'hypothèse que des phosphatases seraient impliquées dans la régulation de la phosphorylation de TFEB. Le traitement avec un inhibiteur des Ser/Thr phosphatases PP1 et PP2A, la calyculine A, prévient les changements de migration de la protéine TFEB induit par l'inhibition des GSK3 ou de mTOR (Figure

19C). Ce résultat démontre d'abord que les formes de plus faible poids moléculaire de TFEB observées dans les cellules traitées avec l'inhibiteur des GSK3 ou de mTOR sont principalement dues à leur déphosphorylation. De plus, cela suggère pour la première fois l'implication de sérine/thréonine phosphatases dans la régulation de la phosphorylation de TFEB par les GSK3 et mTOR. Puisque la calyculine A inhibe les phosphatases PP1 et PP2A, il serait intéressant de déterminer la contribution de chacune dans la régulation de TFEB. Des essais phosphatase à l'aide de protéines recombinantes PP1 ou PP2A permettraient de déterminer si elles peuvent déphosphoryler *in vitro* la protéine TFEB-EGFP immunoprécipitée. La déplétion de PP1 ou de PP2A à l'aide de shARN spécifiques permettrait aussi d'évaluer la contribution respective de ces phosphatases dans la déphosphorylation de TFEB suite à l'inhibition des GSK3 ou de mTOR. Il a été observé que la phosphorylation de la protéine I2, un inhibiteur endogène de PP1, favorise l'activité de cette phosphatase ce qui est en défaveur d'une activation de la PP1 suite à l'inhibition des GSK3 (T.-H. Lin et al., 2003; Picking et al., 1991). Par contre, il a été suggéré que les GSK3 pourraient moduler d'autres régulateurs de la phosphatase PP1, notamment la protéine AKAP220 qui peut inhiber l'activité de la PP1, toutefois le rôle des GSK3 reste à être clarifié (Schillace et al., 2001; Whiting et al., 2015). Le groupe de LIU et al. a observé que l'inhibition de l'activité des GSK3 peut augmenter l'activité de PP2A via plusieurs mécanismes. D'abord, les GSK3 peuvent réguler négativement l'activité de PP2A en favorisant sa phosphorylation inhibitrice sur la tyrosine 307 en inhibant la tyrosine phosphatase PTP1B, mais également en réduisant l'expression de sa sous-unité catalytique PP2Ac via CREB (X.-Q. Yao et al., 2011). Les GSK3 peuvent également inhiber l'activité de PP2A en favorisant la déméthylation de la leucine 309 via la régulation de l'expression des protéines PME1 et PPMT1 (X. Q. Yao et al., 2012). De plus, l'activité des GSK3 inhibe l'activité de PP2A via l'augmentation de l'expression de la protéine I2PP2A, un inhibiteur de PP2A (G. P. Liu et al., 2008). Toutefois, il est peu probable que la déphosphorylation rapide de TFEB observé dès 30min suivant l'inhibition des GSK3 soit due à une régulation de l'expression d'I2PP2A ou de PP2Ac. Il demeure que la phosphatase PP2A représente un candidat prometteur

comme effecteur de la déphosphorylation de TFEB suite à l'inhibition des GSK3. D'autre part, la phosphatase PP2A peut également être inhibée par mTOR, entre autres via sa phosphorylation (Janssens & Goris, 2001; Peterson et al., 1999). D'ailleurs, l'activation de PP2A suite à l'inhibition de mTORC1 a été impliquée dans la régulation de la localisation du facteur de transcription GLI3 (Krauß et al., 2008). Récemment, une étude a suggéré l'implication de la phosphatase PP2A dans la régulation de l'autophagie, entre autres via son inhibiteur endogène CIP2A et mTORC1 (Puustinen et al., 2014). Ainsi, la phosphatase PP2A peut être activée par l'inhibition des GSK3 ou de mTOR ce qui en fait un bon candidat comme effecteur de la déphosphorylation de TFEB.

Notre analyse par spectrométrie de masse a identifiée la protéine RCN2 comme partenaire d'interaction de la protéine TFEB-EGFP (Tableau 5). Des membres de la famille des protéines RCN, notamment RCN1, ont été impliqués dans la régulation de l'activité de la phosphatase calcineurine (Hilioti & Cunningham, 2003). Dernièrement, la déphosphorylation de TFEB, notamment sur les résidus sérine 142 et 211, par la calcineurine a été démontrée (Medina et al., 2015). Il serait donc possible que RCN2 soit impliquée dans la régulation de la phosphorylation de TFEB. Il est à noter que la régulation de l'activité de la calcineurine par la protéine RCN2 n'a toutefois pas encore été démontrée. D'autre part, il a été observé que les GSK3 peuvent phosphoryler des régulateurs de la calcineurine, les protéines RCN1 ou dSarah (homologue de RCAN1), favorisant l'activité de cette dernière (Hilioti et al., 2004; Takeo et al., 2012). Puisque ces études suggèrent qu'une inhibition des GSK3 diminuerait l'activité de la calcineurine, elles sont défavorables envers une implication de la calcineurine dans la déphosphorylation de TFEB suite à l'inhibition des GSK3. Un traitement avec l'inhibiteur de la calcineurine, la cyclosporin A, ou la déplétion de son expression à l'aide d'un shARN permettrait de déterminer si cette phosphatase est responsable de la déphosphorylation de TFEB suite à l'inhibition des GSK3 ou de mTOR. Enfin, nous avons observé par spectrométrie de masse l'association de la protéine TFEB-EGFP avec des sous-unités des phosphatases PP6 (PPP6C), PP1

(PPP1CA) et PP2A (PPP2R2A). Bien que ces associations ne sont pas incluses dans l'analyse au tableau 5, elles supportent tout de même une implication des phosphatases PP1 et PP2A dans la déphosphorylation de TFEB tel que précédemment discuté, en plus de proposer une implication de PP6. Ces observations suggèrent que la protéine TFEB peut interagir avec ces phosphatases à l'état basal. Notre analyse par spectrométrie de masse révèle une légère baisse de l'association de TFEB-EGFP avec PPP6C et PPP2R2A suite à l'inhibition des GSK3 pendant 1h. L'inhibition de mTOR n'a pas modulé ces associations de PPP6C et PP2R2A avec TFEB-EGFP. Ceci est en défaveur pour une implication de PP2A et PP6 dans la déphosphorylation de TFEB suite à l'inhibition des GSK3. Enfin, nous avons observé une plus importante association de PPP1CA avec TFEB-EGFP suite à l'inhibition des GSK3 suggérant une implication de la phosphatase PP1 dans la déphosphorylation de TFEB suite à l'inhibition des GSK3. Toutefois, il sera nécessaire de valider les résultats obtenus pour l'association de PPP1CA puisqu'aucune valeur n'a été obtenue pour l'association de PPP1CA avec TFEB-EGFP dans l'échantillon traitée avec l'inhibiteur de mTOR.

De façon intéressante, nos résultats soulèvent également des distinctions au niveau de la régulation de la phosphorylation de TFEB par les GSK3 et mTOR. Malgré que l'inhibition des GSK3, comme celle de mTOR, induit la déphosphorylation de TFEB, le profil de migration de TFEB diffère. La présence de formes de plus faible poids moléculaires est observée dans les cellules traitées avec l'inhibiteur des GSK3 (Figure 18C). Il serait intéressant de déterminer les sites de phosphorylation de la protéine TFEB respectivement déphosphorylés suite à l'inhibition des GSK3 ou de mTORC1. Une approche protéomique SILAC similaire à celle utilisée à la section 6.3 permettrait d'identifier les résidus de TFEB phosphorylés et de comparer leur phosphorylation à l'état basal ou suite à l'inhibition des GSK3 ou de mTOR. Par la suite, la mutation des sites de phosphorylation identifiés en alanine ou en acide aspartique permettrait respectivement d'empêcher ou de mimer leur phosphorylation et ainsi d'étudier

leurs rôles dans la régulation de TFEB. Le rôle de ces sites de phosphorylation sur la localisation de TFEB pourrait être analysé par immunofluorescence suite à l'expression de ces mutants TFEB. L'activité transcriptionnelle de ces mutants TFEB pourrait être évaluée en analysant l'expression de certains gènes cibles de TFEB (*ATG9B*, *CTSB*, *CTSD*, *LAMP1*, *MAP1LC3B*, etc) ou l'activité d'un gène rapporteur TFEB-luciférase composé de 4 répétitions de sa séquence de liaison à l'ADN (« CLEAR element »).

Il a été observé que l'induction de l'apoptose peut mener au clivage de plusieurs protéines associées à l'autophagie entre autres via les caspases ce qui inhibe l'autophagie (Cho et al., 2009; Rubinstein & Kimchi, 2012). Afin de déterminer si l'induction de l'apoptose suite à l'inhibition des GSK3 module l'autophagie dans les cellules pancréatiques tumorales, nous avons traitées ces cellules avec un inhibiteur de caspases. L'inhibiteur de caspases a prévenu l'induction du clivage de PARP suite à l'inhibition des GSK3 dans les cellules PANC1 (Figure 20A). L'inhibition des caspases n'a pas influencé la déphosphorylation de TFEB et l'augmentation de LC3B II induite par l'inhibition des GSK3. De plus, nous avons observé que la déplétion de l'expression d'ATG5 à l'aide d'un siARN spécifique ne module pas la déphosphorylation de TFEB suite à l'inhibition des GSK3 dans les cellules PANC1 (Figure 20B). Ces observations suggèrent que la régulation GSK3-dépendante de la phosphorylation de TFEB n'est pas modulée par l'apoptose ou l'inhibition de l'autophagie.

### 5.3 L'activité des GSK3 et de mTOR influence l'association des partenaires d'interaction de TFEB

Tel que mentionné précédemment, la phosphorylation de TFEB sur sa sérine 211, via mTORC1, peut favoriser son association avec les protéines 14-3-3 qui maintient son expression au cytosol. Nous avons évalué l'association de TFEB avec les protéines 14-3-3, puisque nos résultats ont démontré une diminution de la phosphorylation de TFEB sur sa sérine 211 suite à l'inhibition des GSK3 ou de

mTOR (Figure 19B). D'abord, nos essais d'immunoprécipitation de la protéine TFEB-EGFP démontrent qu'à l'état basal les protéines 14-3-3 s'associent avec TFEB-EGFP (Figure 21 A et B). Nous avons observé que cette association est perdue suite à l'inhibition de mTOR par la Torin1 autant dans les cellules HEK293T (Figure 21A) que dans les PANC1 (Figure 21B). De façon intéressante, l'inhibition des GSK3 à l'aide du CHIR99021 réduit également l'association 14-3-3/TFEB-EGFP dans ces cellules (Figure 21A et B). Nous avons ensuite utilisé une approche protéomique SILAC de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem afin d'analyser les partenaires d'interaction de TFEB. Notre analyse par spectrométrie de masse a révélé une diminution de l'association de la protéine TFEB-EGFP avec cinq protéines 14-3-3 (14-3-3 $\beta/\alpha$ , 14-3-3 $\epsilon$ , 14-3-3 $\gamma$ , 14-3-3 $\tau$  et 14-3-3 $\zeta/\delta$ ) (Tableau 5) suite à l'inhibition des GSK3 (Figure 21C) ou de mTOR (Figure 21D) appuyant nos résultats précédents obtenus par immunobuvardage (Figure 21A). Nos résultats suggèrent que les GSK3 régulent la phosphorylation de TFEB, notamment sur sa Ser211, et son association avec les protéines 14-3-3. Il demeure à être démontré si les GSK3 régulent l'association TFEB/14-3-3 et la localisation de TFEB via la phosphorylation de la Ser211. L'expression d'un mutant TFEB S211D, mimant la phosphorylation de ce résidu, permettrait d'évaluer si la déphosphorylation de TFEB sur la Ser211 est nécessaire à la réduction de son association avec les protéines 14-3-3 et à sa translocation nucléaire induite par l'inhibition des GSK3.

Notre analyse par spectrométrie de masse a également révélé une augmentation de l'association de la protéine TFEB-EGFP avec de nombreuses histones, notamment H1, H2A, H2B, H3, H4 (Tableau 5), suite à l'inhibition des GSK3 (Figure 21C) ou de mTOR (Figure 21D). Nous avons observé un résultat similaire à la figure 21A, c'est-à-dire une augmentation de la liaison de la protéine TFEB-EGFP immunoprécipitée avec l'histone H3 suite à l'inhibition des GSK3 ou de mTOR. L'inhibition des GSK3 ou de mTOR a également favorisé l'association de la protéine TFEB-EGFP avec de nombreuses protéines impliquées dans la transcription ou associées au niveau de l'ARN et de l'épissage (Tableau 5). Nos

observations de la translocation nucléaire de TFEB et de l'augmentation de son association avec plusieurs protéines impliquées dans la transcription suite à l'inhibition des GSK3 suggèrent une augmentation de l'activité TFEB. Il sera important d'évaluer l'impact de l'inhibition des GSK3 sur l'expression des gènes cibles de TFEB ou sur l'activité du gène rapporteur TFEB-Luciférase, afin de démontrer la régulation de l'activité transcriptionnelle de TFEB par les GSK3. À cet égard, nous avons obtenu des résultats préliminaires démontrant une augmentation de l'activité du gène rapporteur TFEB-luciférase de 1.6X et 3.2X suite à l'inhibition respectivement des GSK3 et de mTOR dans les cellules HEK293T (résultats non-montrés).

Parmi les partenaires d'interaction de la protéine TFEB-EGFP identifiés (Tableau 5), nous retrouvons de nombreuses protéines associées aux dommages à l'ADN ou aux mécanismes de réparation de l'ADN (MUTYH, PARP1, PRP19, SMC1A, SPT16, SSRP1, XRCC5 et XRCC6). Cette observation soulève pour la première fois une implication possible de TFEB dans les mécanismes associés aux dommages à l'ADN. De façon intéressante, il a été observé que la déplétion de MITF, un facteur de transcription de la même famille que TFEB, entraîne une réponse aux dommages à l'ADN impliquant ATM, CHK2 et P53 (Giuliano et al., 2010). Il serait intéressant de déterminer si la protéine TFEB est régulée, particulièrement au niveau de sa phosphorylation et de sa localisation, suite à l'induction de dommages à l'ADN, par exemple suite à un traitement avec la doxorubicine ou l'étoposide. De plus, il a été observé que les cellules pancréatiques tumorales démontrent des niveaux plus élevés de dommages à l'ADN (Y. H. Li et al., 2012). Ainsi, le rôle de TFEB dans les mécanismes associés aux dommages à l'ADN pourrait être étudié dans nos populations de cellules PANC1-shCTL et PANC1-shTFEB. D'une part, l'évaluation de la phosphorylation de l'histone H2AX sur la Ser139 permettrait d'analyser les dommages à l'ADN dans ces cellules à l'état basal ou suite à l'induction de dommages par la doxorubicine ou l'étoposide. Il serait également pertinent de déterminer si le facteur de transcription TFEB régule les mécanismes de réparation de l'ADN

induits en réponse à des dommages. Pour ce faire, l'expression et la phosphorylation des protéines impliquées dans ces mécanismes, notamment ATM, DNA-PK, XRRC5, XRRC6, P53, pourrait être évaluée dans les cellules PANC1-shCTL et PANC1-shTFEB traitées à la doxorubicine ou l'étoposide.

La majorité des partenaires d'interaction de TFEB associés aux dommages à l'ADN qui ont été identifiés sont retrouvés plus fortement associés avec TFEB-EGFP suite à l'inhibition des GSK3 ou de mTOR (Tableau 5). Il serait donc possible de penser que l'activité des GSK3 et de mTOR, en régulant TFEB, soit impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN. Une étude a observé que l'inhibition des GSK3 dans les cellules neuronales peut favoriser la réparation des dommages à l'ADN induits par une irradiation (E. S. Yang et al., 2011). Il serait donc intéressant d'analyser l'effet de l'inhibition des GSK3 sur les dommages à l'ADN, en évaluant la phosphorylation de l'histone H2AX, induite suite à un traitement avec la doxorubicine, l'étoposide ou la gemcitabine dans les cellules pancréatiques tumorales. De plus, il a été observé que l'inhibition de l'autophagie, particulièrement dans les cellules pancréatiques tumorales, entraîne une hausse des dommages à l'ADN (S. Yang et al., 2011). Ceci pourrait suggérer que l'autophagie induite suite à l'inhibition des GSK3 favorise la survie des cellules pancréatiques tumorales possiblement en réduisant les dommages à l'ADN. Ainsi, les dommages à l'ADN induits par la doxorubicine, l'étoposide ou la gemcitabine pourraient être évalués suite à l'inhibition des GSK3 combinée avec une inhibition de l'autophagie (Bafilomycine A1 ou siATG5) ou la déplétion de TFEB (PANC1-shTFEB). Quelques études évaluant le potentiel thérapeutique d'une inhibition des GSK3 combinée avec la gemcitabine dans les cellules pancréatiques tumorales ont obtenu des résultats contradictoires (Kitano et al., 2013; Mamaghani et al., 2009; Shimasaki et al., 2012). Le mécanisme d'action de nombreux agents chimiothérapeutiques repose sur l'induction de dommages à l'ADN. Une meilleure compréhension des voies de signalisation régulées par les GSK3, particulièrement celles impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN, est nécessaire afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de l'inhibition des GSK3.

Parmi les partenaires d'interaction de la protéine TFEB-EGFP identifiées dans notre analyse de spectrométrie de masse, nous retrouvons également quelques protéines impliquées au niveau du métabolisme. D'abord, nous retrouvons associés à TFEB-EGFP des protéines impliquées dans le transport des nucléotides au niveau des mitochondries, notamment ADT2 (SLC25A5) et ADT3 (SLC25A6), ainsi que la protéine AK6 impliquée dans le transfert de phosphate des adénosines au niveau du noyau. L'interaction de TFEB-EGFP avec ADT2, ADT3, AK6 semble davantage diminuée suite à l'inhibition des GSK3, comparativement à l'inhibition de mTOR (Tableau 5). Également associé à TFEB-EGFP (Tableau 5), les protéines SLC25A1, SLC25A10, SLC25A11, SLC25A12 et SLC25A13 sont impliquées dans le transport de différents substrats métaboliques au niveau des mitochondries (Palmieri, 2013). Les transporteurs SLC25A11, SLC25A12 et SLC25A13 sont associés à la navette du malate et aspartate qui régule le transfert de NADH issu de la glycolyse vers les mitochondries. Quant à SLC25A1 et SLC25A10, ils régulent le transport aux mitochondries du citrate et du malate respectivement, deux intermédiaires du cycle de Krebs. L'inhibition des GSK3 a diminué l'association de TFEB-EGFP avec SLC25A1, SLC25A10, SLC25A11, SLC25A12 et SLC25A13, alors que l'inhibition de mTOR semble plutôt l'augmenter. Ceci suggère que l'association de TFEB-EGFP avec plusieurs protéines impliquées dans le métabolisme, particulièrement au niveau des mitochondries, serait régulée par les GSK3, indépendamment de mTOR. De plus, TFEB-EGFP peut interagir avec les protéines ECHA et ABCD3 impliquées dans la  $\beta$ -oxydation, ainsi que le transporteur de citrate SLC25A1 suggérant un rôle dans le métabolisme des lipides. D'ailleurs, une étude a démontré un rôle de TFEB dans le catabolisme des lipides, notamment via la régulation de PGC1 $\alpha$  et PPAR $\alpha$  (Settembre, De Cegli, et al., 2013). Une étude a suggéré que MITF pourrait réguler indépendamment de la transcription la prolifération cellulaire (Bismuth et al., 2005). Une fonction indépendante de la transcription a également été rapportée pour c-MYC un autres facteur de transcription bHLH (M. D. Cole & Cowling, 2008). Il est donc possible d'imaginer que TFEB pourrait réguler le métabolisme via différents mécanismes indépendants et dépendants de la

transcription. Nos résultats suggèrent certaines distinctions au niveau de la régulation de TFEB suite à l'inhibition des GSK3 ou de mTOR, malgré une régulation similaire de sa localisation et de sa phosphorylation de la Ser211 telle que discutée à la section 5.2. Bien que l'inhibition des GSK3 et de mTOR induisent la déphosphorylation de TFEB, nous avons observé des différences au niveau du profil de phosphorylation de TFEB (Figure 18C). Il serait donc possible d'émettre l'hypothèse que différents ensembles de gènes sont modulés en réponse à l'inhibition des GSK3 ou de mTOR. Une immunoprécipitation de la chromatine couplée au séquençage (ChIP-seq) pour la protéine TFEB dans les cellules traitées avec un inhibiteur des GSK3 ou de mTOR permettrait d'identifier les gènes cibles de TFEB régulés respectivement par les GSK3 et mTOR.

Nous avons également observé la présence d'hétérodimère de la protéine TFEB-EGFP avec la protéine TFE3 lors de notre analyse par spectrométrie de masse (Tableau 5). Il a été démontré que TFE3, comme TFEB, est régulé via sa phosphorylation par mTORC1 et sa séquestration par les protéines 14-3-3 (José a Martina et al., 2014). Le facteur de transcription MITF, comme TFEB et TFE3, s'associe avec les protéines 14-3-3 ce qui le séquestre au niveau du cytosol (Bronisz et al., 2006). Il a également été observé que l'inhibition de mTOR induit la translocation nucléaire de MITF1 (Jose a. Martina & Puertollano, 2013). De plus, les facteurs de transcription TFEB, TFE3 et MITF régulent l'expression de plusieurs gènes associés à l'autophagie, dont ATG16L, ATG9B, UVRAG, WIPI1 (José a Martina et al., 2014). Ces études suggèrent que ces facteurs de transcription (TFEB, TFE3 et MITF) sont régulés par un mécanisme commun impliquant leur phosphorylation par mTORC1. Il serait donc intéressant de vérifier si les GSK3 peuvent réguler les facteurs de transcription MITF et TFE3 puisqu'ils ont été impliqués dans la régulation de l'autophagie. L'effet de l'inhibition des GSK3 sur l'expression des protéines MITF et TFE3, leurs niveaux de phosphorylation, leur association avec les protéines 14-3-3 et leur localisation pourrait être analysé.

Il est à préciser que notre analyse a identifiée les partenaires d'interaction de TFEB dans les cellules HEK293T surexprimant une protéine de fusion TFEB-EGFP. Une analyse similaire réalisée à partir de la protéine endogène TFEB immunoprécipitée offrirait un résultat plus représentatif des associations observées au niveau de l'expression endogène de TFEB. De plus, il est possible que certaines associations de la protéine TFEB diffèrent selon le contexte cellulaire. D'ailleurs, nos résultats ont suggéré une différence de localisation de TFEB dans les cellules non tumorales par rapport aux cellules pancréatiques tumorales humaines, c'est-à-dire une plus forte expression nucléaire de TFEB dans ces dernières. Ceci pourrait influencer les partenaires de TFEB qui devraient donc dans le futur être analysés dans les cellules pancréatiques tumorales.

#### 6. La déplétion de l'expression de TFEB sensibilise les cellules pancréatiques tumorales humaines à l'apoptose induite suite à l'inhibition des GSK3.

Notre analyse de la localisation de TFEB a également démontré qu'à l'état basal, les protéines TFEB-EGFP et TFEB endogène sont respectivement retrouvées majoritairement dans le cytosol des cellules non tumorales HEK293T (Figure 17A) et HPDE (Figure 17D). De façon intéressante, les cellules pancréatiques tumorales PANC1 démontrent une forte expression nucléaire des protéines TFEB-EGFP et TFEB endogène à l'état basal (Figure 17B et C). Nos résultats démontrent pour la première fois la présence d'une forte expression nucléaire de TFEB dans les cellules pancréatiques tumorales humaines. Ceci suggérerait la présence d'une plus forte activité de TFEB dans les cellules cancéreuses. Peu d'information existe sur la protéine TFEB au niveau du cancer. Une protéine de fusion de TFEB, issue de la fusion des gènes de *TFEB* et de *MALAT1*, a été identifiée chez des patients atteints du cancer du rein (Kauffman et al., 2014). De plus, une étude a observé une augmentation de l'expression nucléaire et de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription TFE3 suite à l'inactivation du gène *FLCN* codant pour la folliculine, un suppresseur de tumeur impliqué dans le syndrome de Birt-Hogg-Dubé (Hong et al., 2010). L'inactivation de

la folliculine a été impliquée dans la carcinogenèse au niveau du rein, toutefois son statut dans le cancer pancréatique demeure inconnu. Nos résultats suggèrent qu'une forte expression nucléaire de TFEB pourrait représenter une caractéristique des cellules pancréatiques tumorales humaines. Toutefois, notre analyse est limitée aux cellules PANC1, il sera donc nécessaire d'analyser l'expression et la localisation de TFEB dans un plus grand nombre de lignées cellulaires telles que les BxPC3, les MIA PaCa2, les AsPC1. Il est cependant à noter qu'au cours de la rédaction de cette thèse, un manuscrit a démontré une localisation nucléaire constitutive de TFE3 et MITF dans différentes lignées pancréatiques tumorales (Perera et al., 2015). Les auteurs ont également observé une expression nucléaire de TFE3 plus élevée au niveau de tissus d'adénocarcinomes pancréatiques comparativement au tissu de pancréas normal. L'expression de la protéine TFEB pourrait également être analysée au niveau de tissus d'adénocarcinomes pancréatiques par immunohistochimie ou immunofluorescence. Il serait également intéressant d'analyser l'expression de la folliculine (*FLCN*) au niveau des cellules pancréatiques tumorales afin de déterminer si cette dernière pourrait expliquer l'expression nucléaire de TFEB observée à l'état basal. Enfin, une plus forte association de TFE3 avec l'importine 8 a été observée dans les cellules pancréatiques tumorales ce qui pourrait expliquer l'expression nucléaire élevée de TFE3 dans ces cellules (Perera et al., 2015). Afin de déterminer si l'importine 8 régule l'expression nucléaire de TFEB dans les cellules pancréatiques tumorales, l'association de TFEB avec l'importine 8 dans les cellules pancréatiques tumorales et non tumorales devrait être analysée dans le futur.

Afin d'évaluer le rôle de TFEB dans la régulation de la survie des cellules pancréatiques tumorales par les GSK3, nous avons déplété l'expression de TFEB à l'aide d'un shARN. L'expression de TFEB favorise l'induction de l'autophagie via la transcription de plusieurs gènes associés à l'autophagie et aux lysosomes dont LC3B et LAMP1 (Settembre et al., 2011). La déplétion de la protéine TFEB dans les cellules PANC1 diminue l'expression des protéines BÉCLINE 1, LAMP1, ainsi que les niveaux de LC3B I et moins fortement de LC3B II (Figure 22A) suggérant

la régulation négative de l'autophagie. L'analyse du flux autophagique suggère que le shTFEB entraîne un défaut de dégradation des autophagosomes dans les cellules PANC1 lorsque les GSK3 sont inhibées (Figure 22B). Puisque TFE3, MITF et TFEB peuvent réguler similairement l'expression de gènes associés à l'autophagie (José a Martina et al., 2014), il est possible que ceux-ci compensent leur fonction. Ainsi, l'impact d'une déplétion de TFEB pourrait être limité via une compensation par TFE3 ou MITF, particulièrement en considérant les données récentes suggérant que l'expression de l'ARNm de TFE3 est plus importante que l'ARNm de TFEB dans les PANC1 (Perera et al., 2015).

La déplétion de l'expression de TFEB inhibe la croissance en indépendance d'ancrage des cellules pancréatiques tumorales (Figure 23A). Cette réduction de la croissance pourrait être due à une inhibition de l'autophagie induite par la déplétion de l'expression de TFEB (Figure 21) puisqu'une inhibition de l'autophagie peut réduire la croissance en indépendance d'ancrage de ces cellules (Figure 11D). De plus, la croissance en indépendance d'ancrage des cellules PANC1 dont l'expression de TFEB a été déplétée par un shTFEB est plus fortement réduite suite à l'inhibition des GSK3. Puisque l'inhibition de l'autophagie promeut l'apoptose induite par l'inhibition des GSK3 et que TFEB régule l'autophagie, nous avons évalué l'impact de la déplétion de TFEB sur l'apoptose. L'inhibition de l'expression de TFEB sensibilise les cellules PANC1 à l'apoptose induite par l'inhibition des GSK3 (Figure 23B). Nous avons aussi observé que l'inhibition de mTOR pendant 48h n'induit pas l'apoptose des cellules PANC1. Malgré que le potentiel thérapeutique de l'inhibition de mTOR soit présentement à l'étude, l'inhibition des GSK3 pourrait être plus prometteuse puisqu'elle induit l'apoptose en plus de mener à l'inactivation de mTORC1. D'ailleurs, des études analysant les inhibiteurs de mTOR comme traitement du cancer pancréatique n'ont pas observé d'effet bénéfique de ces inhibiteurs (Garrido-Laguna et al., 2010; Wolpin et al., 2009). Le 5-FU et la gemcitabine qui sont présentement utilisés comme traitement du cancer pancréatique induisent l'autophagie et leur effet cytotoxique peut être favorisé par l'inhibition de l'autophagie (Papademetrio et al., 2014). Afin de

déterminer si la déplétion de TFEB sensibilise les cellules pancréatiques tumorales à d'autres stimuli, l'apoptose induite par le 5-FU ou la gemcitabine pourrait être analysée dans les cellules PANC1-shCTL et PANC1-shTFEB. Il serait aussi intéressant de vérifier si l'expression et l'activité de TFEB sont régulées en réponse à ces traitements. Puisque nos résultats suggèrent la présence d'un hétérodimère TFEB-TFE3, la déplétion de l'expression de TFE3 à l'aide d'un shARN permettrait d'évaluer son rôle dans la régulation de la survie des cellules pancréatiques tumorales par les GSK3. Bref, nos résultats suggèrent pour la première fois que TFEB est nécessaire au phénotype transformé des cellules pancréatiques tumorales humaines. De façon intéressante, une étude a observé que la déplétion de MITF inhibe la croissance de cellules de carcinome à cellules claires (I. J. Davis et al., 2006). Les auteurs ont également observé que l'expression de TFEB ou de TFE3 dans ces cellules peut compenser la perte d'expression de MITF suggérant une redondance au niveau de la fonction oncogénique de ces facteurs de transcription. Des données similaires ont récemment été obtenues dans plusieurs lignées de cellules pancréatiques tumorales, c'est-à-dire que la déplétion de TFE3, MITF ou TFEB inhibe la croissance de ces cellules (Perera et al., 2015). De plus, il a été observé que l'expression de MITF en coopération avec STAT3 (Joo et al., 2004) ou l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> (Garraway et al., 2005) peut favoriser respectivement la transformation de fibroblastes ou de mélanocytes. D'ailleurs, l'expression de MITF contribue à la tumorigénèse induite par BRAF<sup>V600E</sup> dans un modèle de mélanomes chez le poisson zèbre (Lister et al., 2013). En résumé, nos résultats démontrent que l'autophagie et le facteur de transcription TFEB sont requis pour la croissance des cellules pancréatiques tumorales. L'activation de l'autophagie et de TFEB suite l'inhibition des GSK3 apporte un signal pro-survie qui est paradoxale à l'effet pro-apoptotique de l'inhibition de l'activité des GSK3. Ainsi, l'équilibre entre les signaux pro-survie et pro-apoptotique induits par l'inhibition des GSK3 dicterait l'impact des GSK3 sur la croissance des cellules pancréatiques tumorales.

## 7. Régulation du métabolisme des cellules pancréatiques tumorales humaines par les GSK3 : implication dans l'autophagie et la survie cellulaire.

L'autophagie peut réguler la survie cellulaire entre autres en favorisant le recyclage de macromolécules et nutriments afin de soutenir le métabolisme des cellules pancréatiques tumorales. La protéine TFE3, un membre de la famille de facteur de transcription de TFEB, peut favoriser l'élimination de glycogène via la dégradation autophagique (José a Martina et al., 2014). Puisque l'activité des GSK3 est impliquée dans la régulation du métabolisme du glycogène, nous avons évalué les niveaux de glycogène par la coloration à l'acide périodique et au réactif de Schiff (PAS). Nous avons observé un marquage plus intense suite à la coloration PAS dans les cellules PANC1 suite à l'inhibition des GSK3 suggérant une accumulation de glycogène (Figure 24A). Nous avons aussi observé une augmentation de l'intensité du marquage PAS dans les cellules PANC1-shTFEB suggérant l'implication de TFEB dans le contrôle du glycogène. Nous pourrions également évaluer les niveaux de glycogène suite à l'inhibition de l'autophagie par un siATG5, puisque nous avons observé que la déplétion de TFEB réduit l'autophagie (Figure 22A). De plus, une étude a démontré que l'inhibition de la voie mTORC1 à l'aide de la rapamycin peut réduire la synthèse de glycogène dans un modèle de la maladie de Pompe (Ashe et al., 2010). Il serait donc intéressant d'évaluer l'impact de l'inhibition de la voie mTOR à l'aide de la Torin1 sur les niveaux de glycogène des cellules pancréatiques tumorales. Nous avons observé que l'inhibition des GSK3 dans les cellules PANC1-shTFEB semble augmenter plus fortement le marquage du glycogène (Figure 24A). Toutefois, l'interprétation de ces observations est limitée car la coloration au PAS peut marquer différents polysaccharides. Un traitement des cellules à l'amylase, une enzyme hydrolysant le glycogène, avant leur coloration au PAS sera requis afin de s'assurer que le marquage observé est celui du glycogène. Les niveaux de glycogène pourraient également être évalué à l'aide d'essais colorimétrique reposant sur la mesure du glucose suite à l'hydrolyse du glycogène par une amylase ou à l'aide de l'analogue du glucose fluorescent le 2-NBDG qui est incorporé dans le glycogène (Louzao et

al., 2008). Il a été observé que l'inhibition de la glycogène phosphorylase catabolisant la dégradation du glycogène en glucose induit l'apoptose dans les cellules pancréatiques tumorales (Lee et al., 2004). Les auteurs ont suggéré que la dégradation du glycogène en glucose supporte les voies de biosynthèse, notamment du ribose et des lipides, ce qui favoriserait la croissance des cellules pancréatiques tumorales. Nos résultats suggèrent que l'inhibition des GSK3 et de TFEB mène à une accumulation de glycogène qui pourrait être due à la stimulation de la synthèse ou l'inhibition de la dégradation du glycogène respectivement. Ainsi, l'activation de TFEB suite à l'inhibition des GSK3 pourrait limiter l'accumulation de glycogène due à la régulation GSK3-dépendante de sa synthèse. En limitant l'accumulation de glycogène, TFEB pourrait minimiser l'impact de l'inhibition des GSK3 sur les voies métaboliques associées à la glycolyse. La régulation de l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du glycogène par les GSK3 pourrait dicter l'impact sur la survie cellulaire.

Nous avons émis l'hypothèse que l'inhibition des GSK3 pourrait inhiber la glycolyse en favorisant une accumulation de glycogène. L'oncogène KRAS induit des changements métaboliques au niveau des adénocarcinomes pancréatiques notamment en favorisant la glycolyse anaérobie et le métabolisme de la glutamine (Bryant et al., 2014). Ces changements favorisent la production d'ATP en augmentant le taux de glycolyse anaérobie, ainsi que la formation d'intermédiaires métaboliques du cycle de Krebs via le métabolisme de la glutamine. Cette reprogrammation métabolique engendre une dépendance des cellules pancréatiques tumorales pour la glycolyse (Blum & Kloog, 2014). Afin d'évaluer l'impact de l'inhibition des GSK3 sur le métabolisme, nous avons mesuré les niveaux d'ATP et d'ADP intracellulaire. Nos résultats démontrent la diminution du ratio ATP/ADP dans les cellules pancréatique tumorales suite à l'inhibition des GSK3 (Figure 24B). Nos résultats sont en accord avec une étude ayant rapportée la diminution des niveaux intracellulaires de glucose et l'accumulation de glycogène suite à l'inhibition des GSK3 dans les cellules de gliomes (Kotliarova et al., 2008). De plus, nous avons observé qu'une inhibition de la glycolyse à l'aide de

l'analogue 2-déoxyglucose qui est non métabolisable par l'hexokinase réduit les niveaux d'ATP (Figure 24B). L'ATP ne représente pas la seule source d'énergie des cellules, les niveaux des coenzymes NADH et NADPH sont également importants pour de nombreuses réactions. Ceux-ci pourraient être mesurés dans les cellules pancréatiques tumorales suite à l'inhibition des GSK3 à l'aide de kits commerciaux afin d'évaluer si les GSK3 affectent le métabolisme à d'autres niveaux, notamment l'état rédox.

L'autophagie permet le recyclage de macromolécules qui peuvent supporter la production d'ATP (Rabinowitz & White, 2010). D'ailleurs, une diminution des niveaux d'ATP a été observée suite à l'inhibition de l'autophagie dans les cellules pancréatiques tumorales (S. Yang et al., 2011). Puisque nos résultats ont démontré que l'inhibition de l'autophagie promeut l'apoptose induite par l'inhibition des GSK3 (Figure 11A-C), il serait intéressant de déterminer si celle-ci promeut aussi la diminution du ratio ATP/ADP. Notre analyse de la régulation du métabolisme par les GSK3 est limitée et une étude plus approfondie sera nécessaire afin de mieux évaluer l'impact de l'inhibition des GSK3 sur la glycolyse. À cet égard, les niveaux de lactate produits par la glycolyse anaérobie pourraient être évalués dans les cellules pancréatiques tumorales suite à l'inhibition des GSK3 à l'aide d'un kit commercial. De plus, le taux de consommation de l'oxygène (OCR) et de l'acidification du milieu extracellulaire (ECAR) des cellules pancréatiques tumorales traitées ou non avec un inhibiteur des GSK3 pourraient être analysés afin d'évaluer respectivement la phosphorylation oxydative ou la glycolyse à l'aide d'un appareil Seahorse.

Quelques études suggèrent que les GSK3 pourraient réguler la glycolyse, toutefois des résultats contradictoires ont été rapportés. D'une part, une augmentation du niveau intracellulaire de glucose a été observé suite à l'inhibition des GSK3 suggérant que ces dernières pourraient moduler l'incorporation de glucose dans les cellules (Buller et al., 2008; Pal et al., 2014). À l'opposé, l'inhibition des GSK3 dans les cellules de gliomes réduit le niveau intracellulaire de

glucose, induit l'accumulation de glycogène et mène à l'apoptose (Kotliarova et al., 2008). De plus, l'inhibition des GSK3 peut également diminuer l'expression de la glucose-6-phosphatase et de la PEPCK impliquées dans la synthèse du glucose par la gluconéogenèse (Lochhead et al., 2001). L'activité des GSK3 semble donc influencer la glycolyse, toutefois le rôle des GSK3 demeure à être clarifié. Il est donc possible qu'un impact négatif de l'inhibition des GSK3 sur la glycolyse pourrait inhiber la survie ou la croissance cellulaire. Nous avons donc évalué si une inhibition de la glycolyse peut mener à l'induction de l'apoptose ou de l'autophagie dans les cellules pancréatiques tumorales. D'abord, l'inhibition de la glycolyse via la privation en glucose des cellules PANC1 induit le clivage de PARP et l'expression de LC3B II (Figure 24C). Ceci suggère qu'une inhibition de la glycolyse induit l'apoptose et l'autophagie dans les cellules PANC1. La privation en glucose semble aussi augmenter la phosphorylation de JNK et de cJUN, toutefois l'analyse de l'expression de ces protéines est requise. Ensuite, nous avons observé une induction de l'autophagie dans les cellules PANC1 suite à l'inhibition de la glycolyse à l'aide du 2-déoxyglucose (Figure 24D) appuyant notre résultat obtenu par la privation en glucose. Il a été observé que l'inhibition de la glycolyse avec le bromopyruvate ou l'iodoacétate induit la mort des cellules PANC1 (Bhardwaj et al., 2010). Une étude a également observé que l'inhibition de la glycolyse à l'aide du 2-déoxyglucose réduit les niveaux d'ATP et inhibe la croissance de plusieurs lignées de cellules pancréatiques tumorales humaines (Cheng et al., 2014). Afin d'évaluer si l'impact de l'inhibition des GSK3 sur la production d'ATP contribue à la réponse apoptotique, nous avons supplémenté les cellules avec un analogue d'un intermédiaire métabolique, le méthyle pyruvate. L'ajout de méthyle pyruvate prévient le clivage de PARP induit par l'inhibition des GSK3 à l'aide de l'inhibiteur SB216763 (Figure 25A) ou du shGSK3 $\beta$  (Figure 25B). De façon intéressante, nous avons observé que l'ajout de méthyle pyruvate réduit l'activation de la voie JNK-cJUN qui est requise pour la réponse apoptotique (Figure 25A et Marchand et al., 2012). Afin de déterminer si l'effet du méthyle pyruvate est dû au maintien des niveaux d'ATP, il sera nécessaire de vérifier si

l'ajout de celui-ci prévient la baisse du ratio ATP/ADP induit suite à l'inhibition des GSK3.

Puisque l'inhibition des GSK3 diminue la croissance en indépendance d'ancrage des cellules pancréatiques tumorales (Figure 7), nous avons ensuite déterminé si l'ajout d'intermédiaires métaboliques prévient cette baisse. Le méthyle pyruvate et l'acide oxaloacétique, des analogues d'intermédiaires métaboliques associés au cycle de Krebs, ont été ajoutés aux cellules. Nous avons observé que l'ajout de ces intermédiaires ne prévient pas la réduction de la croissance en indépendance d'ancrage induite par l'inhibition des GSK3 (Figure 26). Ceci suggère que l'ajout d'intermédiaires métaboliques n'est pas suffisant pour prévenir tous les effets de l'inhibition de GSK3. Comme pour le méthyle pyruvate, il sera nécessaire de déterminer si l'acide oxaloacétique prévient la baisse des niveaux d'ATP induite par l'inhibition des GSK3. Nos résultats à la figure 25A suggèrent que l'ajout de méthyle pyruvate peut prévenir l'activation de la voie JNK-cJUN par l'inhibition des GSK3. Nos résultats ont démontré que l'inhibition de l'autophagie (Figure 11D) ou la déplétion de l'expression de TFEB (Figure 23A) réduisent la croissance en indépendance d'ancrage des cellules pancréatiques tumorales. Il est à noter que l'ajout de méthyle pyruvate semble inhiber l'autophagie dans les cellules pancréatique tumorales (Figure 25B). Il est possible que la diminution de la croissance en indépendance d'ancrage observé suite à l'inhibition des GSK3 malgré l'ajout de méthyle pyruvate (Figure 26) soit due à un impact négatif de ce dernier sur l'autophagie. Il sera donc important de déterminer si le méthyle pyruvate ou l'acide oxaloacétique préviennent l'inhibition de la voie mTORC1, la translocation nucléaire de TFEB et l'induction de l'autophagie suite à l'inhibition des GSK3. Nos résultats suggèrent que la régulation de la survie des cellules pancréatiques tumorales humaines par les GSK3 implique en partie une régulation du métabolisme, particulièrement au niveau de la production d'ATP. La voie de signalisation AMPK étant activée suite à une diminution du ratio ATP/AMP, il serait intéressant d'étudier plus en détail l'impact de l'inhibition des GSK3 sur l'activité de l'AMPK. D'ailleurs, l'inhibition des GSK3 peut mener à l'activation de l'AMPK (Cai

et al., 2012; Sun et al., 2015; Suzuki et al., 2013), ainsi il serait intéressant d'évaluer l'effet d'une déplétion d'AMPK $\alpha$  ou d'un inhibiteur de l'AMPK sur l'impact de l'inhibition des GSK3.

Une étude a démontré que l'augmentation du taux de la glycolyse au niveau des cellules pancréatiques tumorales soutient leur croissance en favorisant la synthèse de macromolécules par les voies des hexosamines et du pentose phosphate (Ying et al., 2012). Il est donc possible que la régulation de la glycolyse par les GSK3 influencerait ces voies de biosynthèse de macromolécules et ainsi la croissance des cellules pancréatiques tumorales humaines. L'analyse des métabolites par spectrométrie de masse permettrait d'analyser les changements métaboliques induits dans les cellules pancréatiques tumorales suite à l'inhibition des GSK3. Cette approche permettrait d'identifier les voies métaboliques régulées par l'activité des GSK3 dans ces cellules. De plus, une étude a suggéré que TFEB peut réguler le métabolisme des lipides via l'induction de la transcription de PGC1 $\alpha$  et de l'autophagie (Settembre & Ballabio, 2014; Settembre, De Cegli, et al., 2013). Puisque nous avons observé que les GSK3 régulent TFEB et l'autophagie, l'expression de PGC1 $\alpha$  pourrait être évaluée suite à l'inhibition des GSK3 dans les cellules pancréatiques tumorales. Afin de mieux évaluer le potentiel thérapeutique de l'inhibition des GSK3, une meilleure compréhension du rôle des GSK3 dans la régulation du métabolisme de la glycolyse, du cycle de Krebs, des voies de biosynthèse de macromolécules et des lipides est nécessaire.

## V- Conclusion

Les glycogène synthase kinases-3 (GSK3) ont été impliquées dans la carcinogénèse, notamment du pancréas. Des résultats contradictoires ont été rapportés quant aux rôles des GSK3, particulièrement dans la régulation de la survie cellulaire. Selon le contexte cellulaire, l'inhibition des GSK3 peut favoriser la survie cellulaire ou induire l'apoptose. Il a été observé dans les cellules pancréatiques tumorales humaines que l'inhibition des GSK3 induit l'apoptose entre autres via la régulation de la voie NF $\kappa$ B. Nos travaux antérieurs ont démontré que l'activation de la voie JNK-cJUN suite à l'inhibition des GSK3 contribue à l'induction de l'apoptose dans ces cellules, toutefois à elle seule est insuffisante. Une étude clinique de phase I/II est présentement en cours afin d'évaluer l'efficacité d'un inhibiteur des GSK3 en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques pour le traitement de patients atteints d'un cancer pancréatique métastatique (NCT01287520). Les travaux de cette thèse ont été entrepris afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation de la survie des cellules pancréatiques tumorales par les GSK3.

Nous avons observé l'induction de l'apoptose et de l'autophagie suite à l'inhibition des GSK3 dans les cellules pancréatiques tumorales humaines. Nos résultats démontrent pour la première fois que l'inhibition des GSK3 induit l'autophagie dans les cellules pancréatiques tumorales. Contrairement à l'apoptose, l'induction de l'autophagie par l'inhibition des GSK3 ne semble pas spécifique aux cellules pancréatiques tumorales puisqu'elle est également observée dans les cellules non tumorales HPDE, ainsi que dans des cellules MEF. De façon intéressante, nous avons observé des niveaux plus élevés d'autophagie à l'état basal dans les cellules pancréatiques tumorales comparativement aux non tumorales. Il serait intéressant de vérifier si les cellules épithéliales pancréatiques non tumorales sont moins dépendantes envers l'autophagie pour leur survie et ainsi moins sensible à une inhibition de l'autophagie. Nous avons démontré que l'inhibition de l'autophagie sensibilise les cellules pancréatiques tumorales à

l'apoptose induite par l'inhibition des GSK3. Ainsi, l'autophagie favorise la survie de ces cellules et l'induction de cette dernière suite à l'inhibition des GSK3 représente un signal pro-survie. Donc, la combinaison de l'inhibition de l'autophagie à celle des GSK3 offrirait un meilleur potentiel thérapeutique pour le cancer pancréatique. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la régulation de l'autophagie par les GSK3 est cependant nécessaire.

Nos résultats démontrent l'inactivation de la voie mTORC1 suite à l'inhibition des GSK3 dans les cellules épithéliales pancréatiques. L'inhibition des GSK3 réduit la phosphorylation de la S6K1 et de S6 suggérant une inactivation mTORC1. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que les GSK3 régulent S6K1 indépendamment de l'activité mTORC1 puisqu'il a été observé que les GSK3 peuvent phosphoryler la S6K1. L'inhibition de S6K1 n'est pas suffisante pour induire l'autophagie suggérant que la régulation GSK3-dépendante de l'autophagie s'effectuerait via mTORC1. D'ailleurs, l'induction de l'autophagie observée suite à l'inhibition des GSK3 corrèle avec une inactivation de l'axe S6K1-S6 et une réduction de la phosphorylation mTORC1-dépendante d'ULK1. Il est donc fort probable que l'inactivation de la voie mTORC1 suite à l'inhibition des GSK3 contribue à l'induction de l'autophagie. Une analyse plus approfondie de l'expression et de la phosphorylation des protéines du complexe mTORC1 ou impliquées dans la régulation de ce dernier permettrait de déterminer le mécanisme de régulation GSK3-dépendante de la voie mTORC1 dans les cellules épithéliales pancréatiques.

Nos travaux décrivent pour la première fois la fonction de TFEB et sa régulation par les GSK3 dans les cellules pancréatiques tumorales humaines. Le complexe mTORC1 peut phosphoryler TFEB et réguler sa localisation et son activité. Une étude a rapporté une translocation nucléaire de TFEB suite à l'inhibition des GSK3, toutefois le mécanisme n'est pas connu. Notre étude est la première à s'intéresser plus en détails à la régulation de TFEB par les GSK3. Nous avons démontré que l'inhibition des GSK3, tout comme l'inhibition de mTOR, induit

une translocation nucléaire de TFEB. D'ailleurs, nos résultats suggèrent une augmentation de l'association de TFEB-EGFP avec plusieurs protéines associées à la transcription, des histones, des protéines associées à l'ARN ou à l'épissage suite à l'inhibition des GSK3 ou de mTOR. Nos résultats démontrent aussi que l'inhibition des GSK3 ou de mTOR induit la déphosphorylation de TFEB, notamment sur sa Ser211. La protéine TFEB est séquestrée au niveau du cytosol par son association avec les protéines 14-3-3. La diminution de la phosphorylation de la Ser211 de TFEB suite à l'inhibition des GSK3 ou de mTOR corrèle avec une perte de son association avec 5 protéines 14-3-3. Bien que l'impact de l'inhibition des GSK3 ou de mTOR sur TFEB soit similaire, nos résultats suggèrent que les mécanismes impliqués pourraient être différents. Malgré que l'inhibition des GSK3 inactive la voie mTORC1, le profil de migration de TFEB suite à l'inhibition des GSK3 diffère de celui observé suite à l'inhibition de mTOR. De plus, la déphosphorylation de TFEB, la perte d'interaction avec les 14-3-3 et sa translocation nucléaire induite après 1h d'inhibition des GSK3 ne corrèle pas avec une inactivation de mTORC1. Nos résultats suggèrent que les GSK3 pourraient réguler TFEB indépendamment de l'activité mTORC1, principalement via la phosphorylation de la Ser211.

Un aspect innovateur de nos travaux est l'implication de Ser/Thr phosphatases, possiblement PP1 ou PP2A, dans la déphosphorylation de TFEB suite à l'inhibition des GSK3 ou de mTOR. D'ailleurs, nous avons observé l'association de TFEB-EGFP à l'état basal avec des sous-unités des phosphatases PP1 (PPP1CA), PP2A (PPP2R2A) et PP6 (PPP6C). L'association de PPP1CA avec TFEB-EGFP semble augmenter suite à l'inhibition des GSK3, toutefois ce résultat devra être validé. Ceci propose la phosphatase PP1 comme candidat le plus prometteur impliqué dans la régulation GSK3-dépendante de TFEB. Nous avons également démontré que GSK3 $\beta$  peut phosphoryler la protéine TFEB *in vitro*. Une analyse par spectrométrie de masse permettrait d'identifier les sites phosphorylés par les GSK3 ou ceux déphosphorylés suite à l'inhibition des GSK3. Il serait intéressant de comparer les phosphorylations de TFEB suite à l'inhibition

des GSK3 ou de mTOR puisque des différences sont observées au niveau des profils de migration de TFEB. Il est donc possible de penser que l'inhibition des GSK3 ou de mTOR pourrait induire l'expression de différents ensembles de gènes régulés par TFEB.

Notre étude est la première à démontrer que l'activité de TFEB est requise pour le maintien de l'état transformé des cellules pancréatiques tumorales, conclusion qui est supportée par des travaux publiés par un autre groupe durant la rédaction de cette thèse (Perera et al., 2015). De façon intéressante, nos résultats démontrent une expression nucléaire accrue de TFEB dans les cellules pancréatiques tumorales humaines par rapport aux non tumorales. Une observation similaire a été rapportée pour tous les membres de la famille MiTF dans plusieurs lignées de cellules pancréatiques tumorales (Perera et al., 2015). Il est donc possible que le facteur de transcription TFEB soit impliqué dans la carcinogenèse pancréatique. La déplétion de TFEB sensibilise les cellules pancréatiques tumorales à l'apoptose induite par l'inhibition des GSK3. Il serait aussi intéressant de déterminer si l'inhibition de TFEB peut promouvoir la mort cellulaire induite par d'autres stimuli, particulièrement ceux induisant des dommages à l'ADN. En effet, parmi les partenaires d'interaction de TFEB identifiés par notre analyse par spectrométrie de masse, nous retrouvons plusieurs protéines associées à la réponse aux dommages à l'ADN. D'ailleurs, l'inhibition des GSK3 ou de mTOR favorise l'association de TFEB avec la plupart de ces protéines, notamment PARP1, PRP19, SMC1A, SPT16, SSRP1, XRCC5 et XRCC6. Ceci propose la possibilité d'une nouvelle fonction de TFEB dans la réponse aux dommages à l'ADN qui demeure à être étudié dans le futur.

Les GSK3 et l'autophagie sont impliquées respectivement dans la régulation de la synthèse et de la dégradation du glycogène. Nos résultats suggèrent une accumulation de glycogène suite à l'inhibition des GSK3 ou de TFEB dans les cellules pancréatiques tumorales. L'impact de l'activité des GSK3 sur l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du glycogène pourrait moduler la quantité de

glucose disponible pour la glycolyse. Tout comme une inhibition de la glycolyse, l'inhibition des GSK3 a réduit les niveaux d'ATP dans les cellules pancréatiques tumorales. Une inhibition de la glycolyse dans ces cellules peut également induire l'activation de la voie JNK-cJUN, l'apoptose et l'autophagie. L'ajout d'un intermédiaire métabolique associé au cycle de Krebs peut prévenir l'activation de la voie JNK-cJUN et l'apoptose induite par l'inhibition des GSK3. Ce résultat suggère que les GSK3 régulent la survie des cellules pancréatiques tumorales en partie via un impact sur le métabolisme. L'impact de l'inhibition des GSK3 sur le métabolisme, particulièrement sur la glycolyse et le cycle de Krebs demeure cependant à être démontré. L'ajout de l'intermédiaire méthyle pyruvate semble réguler négativement l'autophagie et ne prévient pas la réduction de la croissance en indépendance d'ancrage des cellules pancréatiques tumorales suite à l'inhibition des GSK3. Une meilleure compréhension de l'impact de l'activité des GSK3 sur le métabolisme des cellules pancréatiques tumorales humaines sera importante, particulièrement au niveau du glycogène, de la glycolyse et du cycle de Krebs.

Le potentiel thérapeutique de l'inhibition des GSK3 est présentement à l'étude et une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de la survie des cellules pancréatiques tumorales par les GSK3 est cruciale. Les travaux de cette thèse ont démontré que l'autophagie et TFEB favorisent la survie et la croissance des cellules pancréatiques tumorales humaines. Nos résultats démontrent que l'inhibition des GSK3 induit l'apoptose, mais également des signaux pro-survie via TFEB et l'autophagie. Donc, l'équilibre entre les différentes voies de signalisation régulées par les GSK3 dicterait l'impact sur la survie des cellules pancréatiques tumorales.

## VI- Remerciements

J'aimerais d'abord remercier les membres de mon jury la Pre Louise Larose (évaluateur externe), la Dre Sophie Roux (évaluateur interne), le Pr François Boudreau (président du jury) et la Pre Marie-Josée Boucher (directrice des travaux) pour le temps qu'ils ont consacré afin d'évaluer cette thèse. Leurs nombreux commentaires ont permis d'améliorer la qualité de cet ouvrage.

J'aimerais aussi remercier ma directrice de travaux qui a grandement contribué à mon cheminement et m'a guidé dans la réalisation de ce projet. Merci de m'avoir accueilli dans ton laboratoire et pour la confiance que tu m'as accordée au cours de la réalisation de mon projet. Ta passion et ton support m'ont permis de développer une rigueur scientifique et de persévérer malgré les moments plus difficiles afin d'accomplir ces travaux de recherche.

Je voudrais également remercier le Pr François-Michel Boivert pour son aide qui m'a été d'un grand support dans la réalisation de mon expérience d'analyse protéomique par spectrométrie de masse.

Merci également aux membres présents et passés du laboratoire : Jennifer, Emanuel, Maureen, Mélanie, Dominique, Isabelle, Piotr, ainsi qu'Alexandre Raymond-Fleury. Avec qui j'ai eu la chance de partager de bons moments dans le laboratoire ainsi qu'à l'extérieur au courant des dernières années. J'aimerais aussi remercier tout les étudiants et professeurs du Département d'anatomie et biologie cellulaire avec qui j'ai eu le plaisir d'interagir au courant de mes études. Un merci particulier à Sébastien Cagnol (Babao), Étienne Lemieux et Alexis Gonneaud pour votre soutien.

J'aimerais également remercier mon collègue et ami François Brial avec qui j'ai pu décompresser et surmonter les moments plus difficiles. Merci pour les bons moments partagés ici comme à Toulouse. Merci aussi à mon fidèle ami Didier Michel d'être toujours là malgré la distance. Je voudrais également remercier toute

la gang du Ghostsquad avec qui j'ai pu déconnecter du stress. Un merci plus spécialement à Dany (DBoy) Brousseau, Patrick Béliveau (Tattoo) et Marc-Antoine Provost (Lefty) pour tous les bons moments que ce soit sur le terrain ou à l'extérieur.

À mes parents Michel et Christiane ainsi que mes frères Patrick et Olivier, votre fierté et vos encouragements ont été d'un support inestimable tout au long de mon cheminement. Vous avez grandement contribué à ma réussite et je vous remercie pour tout le soutien et l'amour.

Finalement, merci à mon amoureuse Véronique avec qui j'ai la chance de partager ma vie. Tes conseils scientifiques, ta grande compréhension de mon emploi du temps, ton soutien lors de mes périodes de stress et ta passion de la cuisine m'ont supporté tout au long de mon PhD contribuant à mon succès. L'épreuve des dernières années montre la force de nos liens et je te remercie d'être toujours à mes côtés.

## VII- Liste des références

- Aguirre, A. J., Bardeesy, N., Sinha, M., Lopez, L., Tuveson, D. a., Horner, J., ... DePinho, R. a. (2003). Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes and Development*, *17*, 3112–3126.
- Ali, A., Hoeflich, K. P., & Woodgett, J. R. (2001). Glycogen synthase kinase-3: Properties, functions, and regulation. *Chemical Reviews*, *101*(8), 2527–2540.
- Amaravadi, R. K., Lippincott-Schwartz, J., Yin, X. M., Weiss, W. a., Takebe, N., Timmer, W., ... White, E. (2011). Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clinical Cancer Research*, *17*(9), 654–666.
- Amaravadi, R. K., Yu, D., Lum, J. J., Bui, T., Christophorou, M. a., Evan, G. I., ... Thompson, C. B. (2007). Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(2), 326–336.
- Ashe, K. M., Taylor, K. M., Chu, Q., Meyers, E., Ellis, A., Jingozyan, V., ... Moreland, R. J. (2010). Inhibition of glycogen biosynthesis via mTORC1 suppression as an adjunct therapy for Pompe disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, *100*(4), 309–15.
- Avrahami, L., Farfara, D., Shaham-Kol, M., Vassar, R., Frenkel, D., & Eldar-Finkelman, H. (2013). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 ameliorates  $\beta$ -amyloid pathology and restores lysosomal acidification and mammalian target of rapamycin activity in the alzheimer disease mouse model: In vivo and in vitro studies. *Journal of Biological Chemistry*, *288*, 1295–1306.
- Azoulay-Alfaguter, I., Elya, R., Avrahami, L., Katz, a, & Eldar-Finkelman, H. (2014). Combined regulation of mTORC1 and lysosomal acidification by GSK-3 suppresses autophagy and contributes to cancer cell growth. *Oncogene*, (August), 1–11.
- Bach, M., Larance, M., James, D. E., & Ramm, G. (2011). The serine/threonine kinase ULK1 is a target of multiple phosphorylation events. *Biochemical Journal*, *440*(2), 283–291.
- Bardeesy, N., & DePinho, R. a. (2002). Pancreatic cancer biology and genetics. *Nature Reviews. Cancer*, *2*(December), 897–909.
- Bar-Peled, L., Schweitzer, L. D., Zoncu, R., & Sabatini, D. M. (2012). Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell*, *150*(6), 1196–1208.

- Betin, V. M. S., & Lane, J. D. (2009). Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *Journal of Cell Science*, 122(Pt 14), 2554–2566.
- Beurel, E., Grieco, S. F., & Jope, R. S. (2015). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 148, 114–31.
- Beurel, E., & Jope, R. S. (2006). The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Progress in Neurobiology*, 79, 173–189.
- Bhardwaj, V., Rizvi, N., Lai, M. B., Lai, J. C. K., & Bhushan, A. (2010). Glycolytic enzyme inhibitors affect pancreatic cancer survival by modulating its signaling and energetics. *Anticancer Research*, 30, 743–749.
- Bijur, G. N., & Jope, R. S. (2003). Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport*, 14(18), 2415–2419.
- Bismuth, K., Maric, D., & Arnheiter, H. (2005). MITF and cell proliferation: The role of alternative splice forms. *Pigment Cell Research*, 18(5), 349–359.
- Blum, R., & Kloog, Y. (2014). Metabolism addiction in pancreatic cancer. *Cell Death & Disease*, 5(2), e1065.
- Boyle, W. J., Smeal, T., Defize, L. H., Angel, P., Woodgett, J. R., Karin, M., & Hunter, T. (1991). Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell*, 64(3), 573–584.
- Bronisz, A., Sharma, S. M., Hu, R., Godlewski, J., Tzivion, G., Mansky, K. C., & Ostrowski, M. C. (2006). Microphthalmia-associated transcription factor interactions with 14-3-3 modulate differentiation of committed myeloid precursors. *Molecular Biology of the Cell*, 17(9), 3897–3906.
- Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R. L., Manning, B. D., Reiling, J. H., Hafen, E., ... Jr, W. G. K. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1 / TSC2 tumor suppressor complex. *Genes & Development*, 1–12.
- Bryant, K. L., Mancias, J. D., Kimmelman, A. C., & Der, C. J. (2014). KRAS: Feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends in Biochemical Sciences*, 39, 91–100.
- Buller, C. L., Loberg, R. D., Fan, M.-H., Zhu, Q., Park, J. L., Vesely, E., ... Brosius, F. C. (2008). A GSK-3/TSC2/mTOR pathway regulates glucose uptake and GLUT1 glucose transporter expression. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 295(July 2008), C836–C843.

- Cai, Z., Li, B., Li, K., & Zhao, B. (2012). Down-regulation of amyloid-beta through AMPK activation by inhibitors of GSK-3beta in SH-SY5Y and SH-SY5Y-AbetaPP695 cells. *J Alzheimers Dis*, 29, 89–98.
- Caldas, C., Hahn, S. A., da Costa, L. T., Redston, M. S., Schutte, M., Seymour, A. B., ... Kern, S. E. (1994). Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nature Genetics*, 8(1), 27–32.
- Cao, Q., Lu, X., & Feng, Y.-J. (2006). Glycogen synthase kinase-3beta positively regulates the proliferation of human ovarian cancer cells. *Cell Research*, 16, 671–677.
- Chauhan, S., Goodwin, J. G., Chauhan, S., Manyam, G., Wang, J., Kamat, A. M., & Boyd, D. D. (2013). ZKSCAN3 Is a Master Transcriptional Repressor of Autophagy. *Molecular Cell*, 50(1), 16–28.
- Chen, Y. R., Wang, X., Templeton, D., Davis, R. J., & Tan, T. H. (1996). The Role of c-Jun N-terminal Kinase (JNK) in Apoptosis Induced by Ultraviolet C and g Radiation. *Journal of Biological Chemistry*, 271(50), 31929–31936.
- Cheng, G., Zielonka, J., McAllister, D., Tsai, S., Dwinell, M. B., & Kalyanaraman, B. (2014). Profiling and targeting of cellular bioenergetics: inhibition of pancreatic cancer cell proliferation. *British Journal of Cancer*, 111(May), 85–93.
- Cho, D. H., Jo, Y. K., Hwang, J. J., Lee, Y. M., Roh, S. A., & Kim, J. C. (2009). Caspase-mediated cleavage of ATG6/Beclin-1 links apoptosis to autophagy in HeLa cells. *Cancer Letters*, 274(1), 95–100.
- Chou, H.-Y., Howng, S.-L., Cheng, T.-S., Hsiao, Y.-L., Lieu, A.-S., Loh, J.-K., ... Hong, Y.-R. (2006). GSKIP is homologous to the Axin GSK3beta interaction domain and functions as a negative regulator of GSK3beta. *Biochemistry*, 45, 11379–11389.
- Cliffe, A., Hamada, F., & Bienz, M. (2003). A role of dishevelled in relocating axin to the plasma membrane during wingless signaling. *Current Biology*, 13(11), 960–966.
- Cohen, P., & Frame, S. (2001). The renaissance of GSK3. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(October), 769–776.
- Cole, A., Frame, S., & Cohen, P. (2004). Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. *The Biochemical Journal*, 377(Pt 1), 249–255.
- Cole, M. D., & Cowling, V. H. (2008). Transcription-independent functions of MYC: regulation of translation and DNA replication. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(10), 810–815.

- Collins, M. A., Bednar, F., Zhang, Y., Brisset, J. C., Galbán, S., Galbán, C. J., ... Pasca Di Magliano, M. (2012). Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *Journal of Clinical Investigation*, *122*, 639–653.
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., ... Ducreux, M. (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine*, *364*(19), 1817–1825.
- Cross, D. a, Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., & Hemmings, B. a. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, *378*, 785–9.
- Davis, I. J., Kim, J. J., Oszolak, F., Widlund, H. R., Rozenblatt-Rosen, O., Granter, S. R., ... Fisher, D. E. (2006). Oncogenic MITF dysregulation in clear cell sarcoma: Defining the MiT family of human cancers. *Cancer Cell*, *9*(June), 473–484.
- Davis, R. J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, *103*, 239–252.
- Deegan, S., Saveljeva, S., Gorman, A. M., & Samali, A. (2013). Stress-induced self-cannibalism: On the regulation of autophagy by endoplasmic reticulum stress. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *70*(14), 2425–2441.
- Demarchi, F., Bertoli, C., Sandy, P., & Schneider, C. (2003). Glycogen synthase kinase-3 beta regulates NF-kappa B1/p105 stability. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(41), 39583–39590.
- Dérijard, B., Hibi, M., Wu, I. H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., ... Davis, R. J. (1994). JNK1: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*, *76*(6), 1025–1037.
- Deyoung, M. P., Horak, P., Sofer, A., Sgroi, D., & Ellisen, L. W. (2008). Hypoxia regulates TSC1 / 2 – mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14 – 3 – 3 shuttling, 239–251.
- Ding, V. W., Chen, R. H., & McCormick, F. (2000). Differential regulation of glycogen synthase kinase 3beta by insulin and Wnt signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(42), 32475–32481.
- Doble, B. W., & Woodgett, J. R. (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of Cell Science*, *116*, 1175–1186.
- Dobrowolski, R., Vick, P., Ploper, D., Gumper, I., Snitkin, H., Sabatini, D. D., & De Robertis, E. M. (2012). Presenilin Deficiency or Lysosomal Inhibition Enhances Wnt Signaling through Relocalization of GSK3 to the Late-Endosomal Compartment. *Cell Reports*, *2*, 1316–1328.

- Donohue, E., Thomas, A., Maurer, N., Manisali, I., Zeisser-Labouebe, M., Zisman, N., ... Roberge, M. (2013). The autophagy inhibitor verteporfin moderately enhances the antitumor activity of gemcitabine in a pancreatic ductal adenocarcinoma model. *Journal of Cancer*, *4*(3), 585–96.
- Duan, S., Skaar, J. R., Kuchay, S., Toschi, A., Kanarek, N., Ben-Neriah, Y., & Pagano, M. (2011). mTOR generates an auto-amplification loop by triggering the  $\beta$ TrCP- and CK1 $\alpha$ -dependent degradation of DEPTOR. *Molecular Cell*, *44*(2), 317–324.
- Efeyan, A., Zoncu, R., & Sabatini, D. M. (2012). Amino acids and mTORC1: From lysosomes to disease. *Trends in Molecular Medicine*, *18*(9), 524–533.
- Egan, D. F., Shackelford, D. B., Mihaylova, M. M., Gelino, S., Kohnz, R. A., Mair, W., ... Shaw, R. J. (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science (New York, N.Y.)*, *331*(6016), 456–461.
- Embi, N., Rylatt, D. B., & Cohen, P. (1980). Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, *107*(2), 519–527.
- Franca-Koh, J., Yeo, M., Fraser, E., Young, N., & Dale, T. C. (2002). The regulation of glycogen synthase kinase-3 nuclear export by Frat/GBP. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(46), 43844–43848.
- Fujishita, T., Aoki, M., & Taketo, M. M. (2011). JNK signaling promotes intestinal tumorigenesis through activation of mTOR complex 1 in Apc $\Delta$ 716 mice. *Gastroenterology*, *140*(5), 1556–1563.e6.
- Füllgrabe, J., Klionsky, D. J., & Joseph, B. (2014). The return of the nucleus: transcriptional and epigenetic control of autophagy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *15*, 65–74.
- Furukawa, T., Duguid, W. P., Rosenberg, L., Viallet, J., Galloway, D. a, & Tsao, M. S. (1996). Long-term culture and immortalization of epithelial cells from normal adult human pancreatic ducts transfected by the E6E7 gene of human papilloma virus 16. *The American Journal of Pathology*, *148*(6), 1763–1770.
- Gao, D., Inuzuka, H., Tan, M. K. M., Fukushima, H., Locasale, J. W., Liu, P., ... Wei, W. (2011). mTOR drives its own activation via SCF  $\beta$ TrCP-dependent degradation of the mTOR inhibitor DEPTOR. *Molecular Cell*, *44*(2), 290–303.
- Garraway, L. A., Widlund, H. R., Rubin, M. A., Getz, G., Berger, A. J., Ramaswamy, S., ... Sellers, W. R. (2005). Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature*, *436*(7047), 117–122.

Garrido-Laguna, I., Tan, a C., Uson, M., Angenendt, M., Ma, W. W., Villaroel, M. C., ... Hidalgo, M. (2010). Integrated preclinical and clinical development of mTOR inhibitors in pancreatic cancer. *British Journal of Cancer*, *103*(5), 649–655.

Gavilán, E., Sánchez-Aguayo, I., Daza, P., & Ruano, D. (2013). GSK-3 $\beta$  signaling determines autophagy activation in the breast tumor cell line MCF7 and inclusion formation in the non-tumor cell line MCF10A in response to proteasome inhibition. *Cell Death & Disease*, *4*, e572.

Giuliano, S., Cheli, Y., Ohanna, M., Bonet, C., Beuret, L., Bille, K., ... Bertolotto, C. (2010). Microphthalmia-associated transcription factor controls the DNA damage response and a lineage-specific senescence program in melanomas. *Cancer Research*, *70*(9), 3813–3822.

Grimes, C. a, & Jope, R. S. (2001). CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. *Journal of Neurochemistry*, *78*(6), 1219–1232.

Guerra, C., & Barbacid, M. (2013). Genetically engineered mouse models of pancreatic adenocarcinoma. *Molecular Oncology*, *7*(2), 232–247.

Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Cañamero, M., Grippo, P. J., Verdaguer, L., Pérez-Gallego, L., ... Barbacid, M. (2007). Chronic Pancreatitis Is Essential for Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by K-Ras Oncogenes in Adult Mice. *Cancer Cell*, *11*(March), 291–302.

Gukovsky, I., Li, N., Todoric, J., Gukovskaya, A., & Karin, M. (2013). Inflammation, autophagy, and obesity: Common features in the pathogenesis of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*, *144*, 1199–1209.

Guo, J. Y., Chen, H. Y., Mathew, R., Fan, J., Strohecker, A. M., Karsli-Uzunbas, G., ... White, E. (2011). Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes and Development*, *25*, 460–470.

Guo, J. Y., Karsli-Uzunbas, G., Mathew, R., Aisner, S. C., Kamphorst, J. J., Strohecker, A. M., ... White, E. (2013). Autophagy suppresses progression of K-ras-induced lung tumors to oncocytomas and maintains lipid homeostasis. *Genes and Development*, *27*, 1447–1461.

Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., ... Shaw, R. J. (2008). AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Molecular Cell*, *30*(2), 214–226.

Hahn, S. A., Schutte, M., Hoque, A. T., Moskaluk, C. A., da Costa, L. T., Rozenblum, E., ... Kern, S. E. (1996). DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science (New York, N.Y.)*, *271*(5247), 350–353.

Hanada, T., Noda, N. N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., ... Ohsumi, Y. (2007). The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(52), 37298–37302.

Hashimoto, D., Bläuer, M., Hirota, M., Ikonen, N. H., Sand, J., & Laukkanen, J. (2014). Autophagy is needed for the growth of pancreatic adenocarcinoma and has a cytoprotective effect against anticancer drugs. *European Journal of Cancer*, *50*, 1382–1390.

Hezel, A. F., Kimmelman, A. C., Stanger, B. Z., Bardeesy, N., & DePinho, R. a. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes and Development*, *20*, 1218–1249.

Hilioti, Z., & Cunningham, K. W. (2003). The RCN family of calcineurin regulators. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *311*(4), 1089–1093.

Hilioti, Z., Gallagher, D. a., Low-Nam, S. T., Ramaswamy, P., Gajer, P., Kingsbury, T. J., ... Cunningham, K. W. (2004). GSK-3 kinases enhance calcineurin signaling by phosphorylation of RCNs. *Genes and Development*, *18*(1), 35–47.

Hingorani, S. R., Petricoin, E. F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M. a., ... Tuveson, D. a. (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*, *4*(December), 437–450.

Hingorani, S. R., Wang, L., Multani, A. S., Combs, C., Deramaudt, T. B., Hruban, R. H., ... Tuveson, D. a. (2005). Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell*, *7*(May), 469–483.

Hoeflich, K. P., Luo, J., Rubie, E. a, Tsao, M. S., Jin, O., & Woodgett, J. R. (2000). Requirement for glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in cell survival and NF- $\kappa$ B activation. *Nature*, *406*(July), 86–90.

Hong, S. B., Oh, H., Valera, V. a., Baba, M., Schmidt, L. S., & Linehan, W. M. (2010). Inactivation of the FLCN tumor suppressor gene induces TFE3 transcriptional activity by increasing its nuclear localization. *PLoS ONE*, *5*(12).

Hosokawa, N., Sasaki, T., Iemura, S. I., Natsume, T., Hara, T., & Mizushima, N. (2009). Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy*, *5*(7), 973–979.

Hruban, R. H., van Mansfeld, A. D., Offerhaus, G. J., van Weering, D. H., Allison, D. C., Goodman, S. N., ... Bos, J. L. (1993). K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *The American Journal of Pathology*, *143*(2), 545–554.

- Hughes, K., Nikolakaki, E., Plyte, S. E., Totty, N. F., & Woodgett, J. R. (1993). Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *The EMBO Journal*, *12*(2), 803–808.
- Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., ... Guan, K. L. (2006). TSC2 Integrates Wnt and Energy Signals via a Coordinated Phosphorylation by AMPK and GSK3 to Regulate Cell Growth. *Cell*, *126*, 955–968.
- Inoki, K., Zhu, T., & Guan, K.-L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, *115*(5), 577–590.
- Janssens, V., & Goris, J. (2001). Phosphatases Implicated in Cell Growth and Signalling. *Society*, *439*(Pt 3), 417–439.
- Jones, S., Zhang, X., Parsons, D. W., Lin, J. C.-H., Leary, R. J., Angenendt, P., ... Kinzler, K. W. (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science (New York, N.Y.)*, *321*(2008), 1801–1806.
- Joo, A., Aburatani, H., Morii, E., Iba, H., & Yoshimura, A. (2004). STAT3 and MITF cooperatively induce cellular transformation through upregulation of c-fos expression. *Oncogene*, *23*(3), 726–734.
- Jope, R. S., & Johnson, G. V. W. (2004). The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends in Biochemical Sciences*, *29*(2), 95–102.
- Kang, R., & Tang, D. (2012). Autophagy in pancreatic cancer pathogenesis and treatment. *American Journal of Cancer Research*, *2*(4), 383–96.
- Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T., & Tang, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, *18*, 571–580.
- Karantza-Wadsworth, V., Patel, S., Kravchuk, O., Chen, G., Mathew, R., Jin, S., & White, E. (2007). Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes and Development*, *21*, 1621–1635.
- Kauffman, E. C., Ricketts, C. J., Rais-Bahrami, S., Yang, Y., Merino, M. J., Bottaro, D. P., ... Linehan, W. M. (2014). Molecular genetics and cellular features of TFE3 and TFE3 fusion kidney cancers. *Nature Reviews. Urology*, *11*(8), 1–11.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*, *13*(2), 132–141.
- Kim, M. J., Woo, S. J., Yoon, C. H., Lee, J. S., An, S., Choi, Y. H., ... Lee, S. J. (2011). Involvement of autophagy in oncogenic K-Ras-induced malignant cell transformation. *Journal of Biological Chemistry*, *286*, 12924–12932.

- Kirsch, D. G., & Kastan, M. B. (1998). Tumor-suppressor p53: Implications for tumor development and prognosis. *Journal of Clinical Oncology*, *16*(9), 3158–3168.
- Kitano, A., Shimasaki, T., Chikano, Y., Nakada, M., Hirose, M., Higashi, T., ... Minamoto, T. (2013). Aberrant Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Is Involved in Pancreatic Cancer Cell Invasion and Resistance to Therapy. *PLoS ONE*, *8*(2).
- Klaus, A., & Birchmeier, W. (2008). Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *8*, 387–398.
- Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. a., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., ... Ohsumi, Y. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental Cell*, *5*, 539–545.
- Koorstra, J. B. M., Hustinx, S. R., Offerhaus, G. J. a, & Maitra, A. (2008). Pancreatic carcinogenesis. *Pancreatology*, *8*, 110–125.
- Kotliarova, S., Pastorino, S., Kovell, L. C., Kotliarov, Y., Song, H., Zhang, W., ... Fine, H. a. (2008). Glycogen synthase kinase-3 inhibition induces glioma cell death through c-MYC, nuclear factor-kappaB, and glucose regulation. *Cancer Research*, *68*(16), 6643–6651.
- Krau $\beta$ , S., Foerster, J., Schneider, R., & Schweiger, S. (2008). Protein phosphatase 2A and rapamycin regulate the nuclear localization and activity of the transcription factor GLI3. *Cancer Research*, *68*(12), 4658–4665.
- Lee, W.-N. P., Guo, P., Lim, S., Bassilian, S., Lee, S. T., Boren, J., ... Boros, L. G. (2004). Metabolic sensitivity of pancreatic tumour cell apoptosis to glycogen phosphorylase inhibitor treatment. *British Journal of Cancer*, *91*, 2094–2100.
- Li, D.-D., Wang, L.-L., Deng, R., Tang, J., Shen, Y., Guo, J.-F., ... Zhu, X.-F. (2009). The pivotal role of c-Jun NH2-terminal kinase-mediated Beclin 1 expression during anticancer agents-induced autophagy in cancer cells. *Oncogene*, *28*(November 2008), 886–898.
- Li, J., Hou, N., Faried, A., Tsutsumi, S., Takeuchi, T., & Kuwano, H. (2009). Inhibition of autophagy by 3-MA enhances the effect of 5-FU-induced apoptosis in colon cancer cells. *Annals of Surgical Oncology*, *16*, 761–771.
- Li, L., Yuan, H., Weaver, C. D., Mao, J., Farr, G. H., Sussman, D. J., ... Wu, D. (1999). Axin and Frat1 interact with Dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1. *EMBO Journal*, *18*(15), 4233–4240.
- Li, Y. H., Wang, X., Pan, Y., Lee, D. H., Chowdhury, D., & Kimmelman, A. C. (2012). Inhibition of Non-Homologous end Joining repair impairs pancreatic cancer growth and enhances radiation response. *PLoS ONE*, *7*(6), 1–10.

- Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., & Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, *402*(December), 672–676.
- Liao, X., Zhang, L., Thrasher, J. B., Du, J., & Li, B. (2003). Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  suppression eliminates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in prostate cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, *2*(11), 1215–1222.
- Lin, a, Yao, J., Zhuang, L., Wang, D., Han, J., Lam, E. W.-F., & Gan, B. (2013). The FoxO-BNIP3 axis exerts a unique regulation of mTORC1 and cell survival under energy stress. *Oncogene*, *33*(February), 1–12.
- Lin, S.-Y., Li, T. Y., Liu, Q., Zhang, C., Li, X., Chen, Y., ... Lin, S.-C. (2012). GSK3-TIP60-ULK1 Signaling Pathway Links Growth Factor Deprivation to Autophagy. *Science*, *336*, 477–481.
- Lin, S.-Y. S.-C., Li, T. Y., Liu, Q., Zhang, C.-S., Li, X., Chen, Y., ... Lin, S.-Y. S.-C. (2012). GSK3-TIP60-ULK1 Signaling Pathway Links Growth Factor Deprivation to Autophagy. *Science*, *336*(April), 477–481.
- Lin, T.-H., Chen, Y.-C., Chyan, C., Tsay, L., Tang, T. C., Jeng, H.-H., ... Huang, H. (2003). Phosphorylation by glycogen synthase kinase of inhibitor-2 does not change its structure in free state. *FEBS Letters*, *554*(3), 253–256.
- Lister, J. a, Capper, A., Zeng, Z., Mathers, M. E., Richardson, J., Paranthaman, K., ... Patton, E. E. (2013). A Conditional Zebrafish MITF Mutation Reveals MITF Levels Are Critical for Melanoma Promotion vs. Regression In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, *134*(1), 133–140.
- Liu, G. P., Zhang, Y., Yao, X. Q., Zhang, C. E., Fang, J., Wang, Q., & Wang, J. Z. (2008). Activation of glycogen synthase kinase-3 inhibits protein phosphatase-2A and the underlying mechanisms. *Neurobiology of Aging*, *29*, 1348–1358.
- Liu, S., Fang, X., Hall, H., Yu, S., Smith, D., Lu, Z., ... Mills, G. B. (2008). Homozygous deletion of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  bypasses senescence allowing Ras transformation of primary murine fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*, 5248–5253.
- Lochhead, P. a., Coghlan, M., Rice, S. Q. J., & Sutherland, C. (2001). Inhibition of GSK-3 selectively reduces glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *Diabetes*, *50*, 937–946.
- Lochhead, P. a., Kinstrie, R., Sibbet, G., Rawjee, T., Morrice, N., & Cleghon, V. (2006). A chaperone-dependent GSK3?? transitional intermediate mediates activation-loop autophosphorylation. *Molecular Cell*, *24*, 627–633.

- Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K., & Avruch, J. (2005). Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Current Biology*, *15*(8), 702–713.
- Louzao, M. C., Espiña, B., Vieytes, M. R., Vega, F. V., Rubiolo, J. A., Baba, O., ... Botana, L. M. (2008). "Fluorescent glycogen" formation with sensibility for in vivo and in vitro detection. *Glycoconjugate Journal*, *25*(6), 503–510.
- MacAulay, K., Doble, B. W., Patel, S., Hansotia, T., Sinclair, E. M., Drucker, D. J., ... Woodgett, J. R. (2007). Glycogen synthase kinase 3 $\alpha$ -specific regulation of murine hepatic glycogen metabolism. *Cell Metabolism*, *6*(4), 329–37.
- MacGregor-Das, A. M., & Iacobuzio-Donahue, C. a. (2013). Molecular pathways in pancreatic carcinogenesis. *Journal of Surgical Oncology*, *107*(1), 8–14.
- Mai, W., Kawakami, K., Shakoori, A., Kyo, S., Miyashita, K., Yokoi, K., ... Minamoto, T. (2009). Deregulated GSK3 $\beta$  sustains gastrointestinal cancer cells survival by modulating human telomerase reverse transcriptase and telomerase. *Clinical Cancer Research*, *15*(22), 6810–6819.
- Mai, W., Miyashita, K., Shakoori, A., Zhang, B., Yu, Z. W., Takahashi, Y., ... Minamoto, T. (2007). Detection of active fraction of glycogen synthase kinase 3?? in cancer cells by nonradioisotopic in vitro kinase assay. *Oncology*, *71*, 297–305.
- Mamaghani, S., Patel, S., & Hedley, D. W. (2009). Glycogen synthase kinase-3 inhibition disrupts nuclear factor-kappaB activity in pancreatic cancer, but fails to sensitize to gemcitabine chemotherapy. *BMC Cancer*, *9*, 132.
- Marchand, B., Tremblay, I., Cagnol, S., & Boucher, M. J. (2012). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 activity triggers an apoptotic response in pancreatic cancer cells through JNK-dependent mechanisms. *Carcinogenesis*, *33*(3), 529–537.
- Mariño, G., Salvador-Montoliu, N., Fueyo, A., Knecht, E., Mizushima, N., & López-Otín, C. (2007). Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. *Journal of Biological Chemistry*, *282*, 18573–18583.
- Martina, J. a, Diab, H. I., Lishu, L., Jeong-A, L., Patange, S., Raben, N., & Puertollano, R. (2014). The nutrient-responsive transcription factor TFE3 promotes autophagy, lysosomal biogenesis, and clearance of cellular debris. *Science Signaling*, *7*(January), ra9.
- Martina, J. a., Chen, Y., Gucek, M., & Puertollano, R. (2012). MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy*, *8*(June), 903–914.

- Martina, J. a., & Puertollano, R. (2013). Rag GTPases mediate amino acid-dependent recruitment of TFEB and MITF to lysosomes. *Journal of Cell Biology*, *200*, 475–491.
- Mathew, R., Kongara, S., Beaudoin, B., Karp, C. M., Bray, K., Degenhardt, K., ... White, E. (2007). chromosomal instability Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes & Development*, (Baehrecke 2003), 1367–1381.
- Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., ... Yoshimori, T. (2009). Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nature Cell Biology*, *11*(4), 385–396.
- McManus, E. J., Sakamoto, K., Armit, L. J., Ronaldson, L., Shpiro, N., Marquez, R., & Alessi, D. R. (2005). Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. *The EMBO Journal*, *24*(8), 1571–1583.
- Meares, G. P., & Jope, R. S. (2007). Resolution of the nuclear localization mechanism of glycogen synthase kinase-3: Functional effects in apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(23), 16989–17001.
- Medina, D. L., Di Paola, S., Peluso, I., Armani, A., De Stefani, D., Venditti, R., ... Ballabio, A. (2015). Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB. *Nature Cell Biology*, *17*(3), 288–299.
- Mercer, C. a., Kaliappan, A., & Dennis, P. B. (2009). A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy*, *5*(5), 649–662.
- Miller, A. J., Levy, C., Davis, I. J., Razin, E., & Fisher, D. E. (2005). Sumoylation of MITF and its related family members TFE3 and TFEB. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(1), 146–155.
- Mirzoeva, O. K., Hann, B., Hom, Y. K., Debnath, J., Aftab, D., Shokat, K., & Korn, W. M. (2011). Autophagy suppression promotes apoptotic cell death in response to inhibition of the PI3K-mTOR pathway in pancreatic adenocarcinoma. *Journal of Molecular Medicine*, *89*, 877–889.
- Moore, M. J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J. R., Gallinger, S., ... Parulekar, W. (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: A phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Journal of Clinical Oncology*, *25*(15), 1960–1966.
- Morselli, E., Galluzzi, L., Kepp, O., Vicencio, J. M., Criollo, A., Maiuri, M. C., & Kroemer, G. (2009). Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1793*(9), 1524–1532.

Ng, S. S., Mahmoudi, T., Danenberg, E., Bejaoui, I., de Lau, W., Korswagen, H. C., ... Clevers, H. (2009). Phosphatidylinositol 3-kinase signaling does not activate the Wnt cascade. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(51), 35308–35313.

Norman, J. M., Cohen, G. M., & Bampton, E. T. W. (2010). The in vitro cleavage of the hAtg proteins by cell death proteases. *Autophagy*, *6*(8), 1042–1056.

Ornitz, D. M., Hammer, R. E., Messing, A., Palmiter, R. D., & Brinster, R. L. (1987). Pancreatic neoplasia induced by SV40 T-antigen expression in acinar cells of transgenic mice. *Science (New York, N.Y.)*, *238*(4824), 188–193.

Ougolkov, A. V, Fernandez-Zapico, M. E., Bilim, V. N., Smyrk, T. C., Chari, S. T., & Billadeau, D. D. (2006). Aberrant nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3beta in human pancreatic cancer: association with kinase activity and tumor dedifferentiation. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *12*(9), 5074–5081.

Ougolkov, A. V, Fernandez-Zapico, M. E., Savoy, D. N., Urrutia, R. a, & Billadeau, D. D. (2005). Glycogen synthase kinase-3beta participates in nuclear factor kappaB-mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cancer cells. *Cancer Research*, *65*(6), 2076–2081.

Ouyang, H., Mou, L., Luk, C., Liu, N., Karaskova, J., Squire, J., & Tsao, M. S. (2000). Immortal human pancreatic duct epithelial cell lines with near normal genotype and phenotype. *The American Journal of Pathology*, *157*(5), 1623–1631.

Oz-Arslan, D., Itah, Z., Naghavi, A., Deveci, R., Karacali, S., & Gozuacik, D. (2012). Cleavage of Atg3 protein by caspase-8 regulates autophagy during receptor-activated cell death Ozlem Oral. *Apoptosis*, *17*(8), 810–820.

Pal, K., Cao, Y., Gaisina, I. N., Bhattacharya, S., Dutta, S. K., Wang, E., ... Mukhopadhyay, D. (2014). Inhibition of GSK-3 induces differentiation and impaired glucose metabolism in renal cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, *13*, 285–96.

Palacios, C., Martín-Pérez, R., López-Pérez, A. I., Pandiella, A., & López-Rivas, A. (2010). Autophagy inhibition sensitizes multiple myeloma cells to 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin-induced apoptosis. *Leukemia Research*, *34*(11), 1533–1538.

Palmieri, F. (2013). The mitochondrial transporter family SLC25: Identification, properties and physiopathology. *Molecular Aspects of Medicine*.

Pan, F. C., & Wright, C. (2011). Pancreas organogenesis: From bud to plexus to gland. *Developmental Dynamics*, *240*(February), 530–565.

Pan, H., Wang, Z., Jiang, L., Sui, X., You, L., Shou, J., ... Han, W. (2014). Autophagy inhibition sensitizes hepatocellular carcinoma to the multikinase inhibitor linifanib. *Scientific Reports*, *4*, 6683.

- Pap, M., & Cooper, G. M. (1998). Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(24), 19929–19932.
- Papademetrio, D. L., Cavaliere, V., Simunovich, T., Costantino, S., Campos, M. D., Lombardo, T., ... Álvarez, É. (2014). Interplay between autophagy and apoptosis in pancreatic tumors in response to gemcitabine. *Targeted Oncology*, 9, 123–134.
- Parr, C., Carzaniga, R., Gentleman, S. M., Van Leuven, F., Walter, J., & Sastre, M. (2012). Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibition Promotes Lysosomal Biogenesis and Autophagic Degradation of the Amyloid- Precursor Protein. *Molecular and Cellular Biology*, 32(August), 4410–4418.
- Pasca di Magliano, M., Biankin, A. V., Heiser, P. W., Cano, D. a., Gutierrez, P. J. a, Deramaudt, T., ... Hebrok, M. (2007). Common activation of canonical Wnt signaling in pancreatic adenocarcinoma. *PLoS ONE*, 2(11), 1–9.
- Pattingre, S., Bauvy, C., Carpentier, S., Levade, T., Levine, B., & Codogno, P. (2009). Role of JNK1-dependent Bcl-2 phosphorylation in ceramide-induced macroautophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 284(5), 2719–2728.
- Perera, R. M., Stoykova, S., Nicolay, B. N., Ross, K. N., Fitamant, J., Boukhali, M., ... Bardeesy, N. (2015). Transcriptional control of autophagy–lysosome function drives pancreatic cancer metabolism. *Nature*.
- Peterson, R. T., Desai, B. N., Hardwick, J. S., & Schreiber, S. L. (1999). Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycin-associated protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(8), 4438–4442.
- Picking, W. D., Kudlicki, W., Kramer, G., Hardesty, B., Vandenheede, J. R., Merlevede, W., ... DePaoli-Roach, A. (1991). Fluorescence studies on the interaction of inhibitor 2 and okadaic acid with the catalytic subunit of type 1 phosphoprotein phosphatases. *Biochemistry*, 30(42), 10280–10287.
- Puustinen, P., Rytter, A., Mortensen, M., Kohonen, P., Moreira, J. M., & Jäättelä, M. (2014). CIP2A oncoprotein controls cell growth and autophagy through mTORC1 activation. *Journal of Cell Biology*, 204(5), 713–727.
- Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., ... Levine, B. (2003). Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1809–1820.
- Quaife, C. J., Pinkert, C. A., Ornitz, D. M., Palmiter, R. D., & Brinster, R. L. (1987). Pancreatic neoplasia induced by ras expression in acinar cells of transgenic mice. *Cell*, 48, 1023–1034.

Rabinowitz, J. D., & White, E. (2010). Autophagy and metabolism. *Science (New York, N.Y.)*, 330(2010), 1344–1348.

Rangwala, R., Chang, Y. C., Hu, J., Algazy, K. M., Evans, T. L., Fecher, L. a., ... Amaravadi, R. K. (2014). Combined MTOR and autophagy inhibition: Phase I trial of hydroxychloroquine and temsirolimus in patients with advanced solid tumors and melanoma. *Autophagy*, 10(8), 1391–1402.

Rangwala, R., Leone, R., Chang, Y. C., Fecher, L. a., Schuchter, L. M., Kramer, A., ... Amaravadi, R. K. (2014). Phase I trial of hydroxychloroquine with dose-intense temozolomide in patients with advanced solid tumors and melanoma. *Autophagy*, 10(8), 1369–1379.

Ravikumar, B., Futter, M., Jahreiss, L., Korolchuk, V. I., Lichtenberg, M., Luo, S., ... Rubinsztein, D. C. (2009). Mammalian macroautophagy at a glance. *Journal of Cell Science*, 122, 1707–1711.

Redston, M. S., Caldas, C., Seymour, A. B., Hruban, R. H., Da Costa, L., Yeo, C. J., & Kern, S. E. (1994). p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Research*, 54(11), 3025–3033.

Roczniak-Ferguson, a., Petit, C. S., Froehlich, F., Qian, S., Ky, J., Angarola, B., ... Ferguson, S. M. (2012). The Transcription Factor TFEB Links mTORC1 Signaling to Transcriptional Control of Lysosome Homeostasis. *Science Signaling*, 5(June 2012), ra42–ra42.

Rosenfeld, M. R., Ye, X., Supko, J. G., Desideri, S., Grossman, S. a., Brem, S., ... Amaravadi, R. K. (2014). A phase I/II trial of hydroxychloroquine in conjunction with radiation therapy and concurrent and adjuvant temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Autophagy*, 10(8), 1359–1368.

Rosenfeldt, M. T., O'Prey, J., Morton, J. P., Nixon, C., MacKay, G., Mrowinska, A., ... Ryan, K. M. (2013). P53 Status Determines the Role of Autophagy in Pancreatic Tumour Development. *Nature*, 504(7479), 296–300.

Rouschop, K. M. a, Van Den Beucken, T., Dubois, L., Niessen, H., Bussink, J., Savelkoul, K., ... Wouters, B. G. (2010). The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *Journal of Clinical Investigation*, 120(1), 127–141.

Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Fiol, C., Munemitsu, S., & Polakis, P. (1996). Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5264), 1023–1026.

Rubinstein, A. D., & Kimchi, A. (2012). Life in the balance - a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 22), 5259–68.

- Rubinsztein, D. C., Codogno, P., & Levine, B. (2012). Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, *11*(September), 709–730.
- Russell, R. C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H. W., Chang, Y.-Y., Kim, J., ... Guan, K.-L. (2013). ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nature Cell Biology*, *15*(6), 741–50.
- Sánchez-Perez, I., Murguía, J. R., & Perona, R. (1998). Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death. *Oncogene*, *16*, 533–540.
- Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D. L., Valenza, M., Gennarino, V. A., ... Ballabio, A. (2009). A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science (New York, N.Y.)*, *325*(June), 473–477.
- Sato, K., Tsuchihara, K., Fujii, S., Sugiyama, M., Goya, T., Atomi, Y., ... Esumi, H. (2007). Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation. *Cancer Research*, *67*, 9677–9684.
- Sato, T., Nakashima, A., Guo, L., & Tamanoi, F. (2009). Specific Activation of mTORC1 by Rheb G-protein in Vitro Involves Enhanced Recruitment of Its Substrate Protein. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(19), 12783–12791.
- Schillace, R. V., Voltz, J. W., Sim, A. T. R., Shenolikar, S., & Scott, J. D. (2001). Multiple Interactions within the AKAP220 Signaling Complex Contribute to Protein Phosphatase 1 Regulation. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(15), 12128–12134.
- Schonewolf, C. a, Mehta, M., Schiff, D., Wu, H., Haffty, B. G., Karantza, V., & Jabbour, S. K. (2014). Autophagy inhibition by chloroquine sensitizes HT-29 colorectal cancer cells to concurrent chemoradiation. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, *6*(3), 74–82.
- Schutte, M., Hruban, R. H., Geradts, J., Maynard, R., Hilgers, W., Rabindran, S. K., ... Herman, J. G. (1997). Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Research*, *57*(15), 3126–3130.
- Selvakumaran, M., Amaravadi, R. K., Vasilevskaya, I. a., & O'Dwyer, P. J. (2013). Autophagy inhibition sensitizes colon cancer cells to antiangiogenic and cytotoxic therapy. *Clinical Cancer Research*, *19*, 2995–3007.
- Senft, D., & Ronai, Z. a. (2015). UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends in Biochemical Sciences*, *40*(3), 141–148.
- Seok, S., Fu, T., Choi, S., Li, Y., Zhu, R., Kumar, S., ... Kang, Y. (2014). Transcriptional regulation of autophagy by an FXR-CREB axis. *Nature*, *516*(7529), 108–111.

- Settembre, C., & Ballabio, A. (2014). Lysosome: regulator of lipid degradation pathways. *Trends in Cell Biology*, 1–8.
- Settembre, C., De Cegli, R., Mansueto, G., Saha, P. K., Vetrini, F., Visvikis, O., ... Ballabio, A. (2013). TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop. *Nature Cell Biology*, 15(6), 647–58.
- Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V. A., Garcia Arencibia, M., Vetrini, F., Erdin, S. S. U., ... Ballabio, A. (2011). TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 332(2011), 1429–1433.
- Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D. L., & Ballabio, A. (2013). Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 14(5), 283–296.
- Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D. L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., ... Ballabio, A. (2012). A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *The EMBO Journal*, 31(5), 1095–1108.
- Shakoori, A., Mai, W., Miyashita, K., Yasumoto, K., Takahashi, Y., Ooi, A., ... Minamoto, T. (2007). Inhibition of GSK-3 $\beta$  activity attenuates proliferation of human colon cancer cells in rodents. *Cancer Science*, 98, 1388–1393.
- Shakoori, A., Ougolkov, A., Yu, Z. W., Zhang, B., Modarressi, M. H., Billadeau, D. D., ... Minamoto, T. (2005). Deregulated GSK3 $\beta$  activity in colorectal cancer: its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334, 1365–1373.
- Shimasaki, T., Ishigaki, Y., Nakamura, Y., Takata, T., Nakaya, N., Nakajima, H., ... Motoo, Y. (2012). Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  inhibition sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine. *Journal of Gastroenterology*, 47(3), 321–333.
- Shin, S., Wolgamott, L., Tcherkezian, J., Vallabhapurapu, S., Yu, Y., Roux, P. P., & Yoon, S.-O. (2014). Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  positively regulates protein synthesis and cell proliferation through the regulation of translation initiation factor 4E-binding protein 1. *Oncogene*, 33(February), 1690–9.
- Shin, S., Wolgamott, L., Yu, Y., Blenis, J., & Yoon, S.-O. (2011). Glycogen synthase kinase (GSK)-3 promotes p70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) activity and cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(47), E1204–13.
- Singh, P. K., & Singh, S. (2015). Changing Shapes of Glycogen—Autophagy Nexus in Neurons: Perspective from a Rare Epilepsy. *Frontiers in Neurology*, 6(February), 1–6.

- Sinha, S., & B, L. (2009). The autophagy effector Beclin1: a novel BH3 only protein, 27(Suppl 1), 1–21.
- Sipos, B., Möser, S., Kalthoff, H., Török, V., Löhr, M., & Klöppel, G. (2003). A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform. *Virchows Archiv : An International Journal of Pathology*, 442, 444–452.
- Slack, J. M. (1995). Developmental biology of the pancreas. *Development (Cambridge, England)*, 121(6), 1569–1580.
- Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D., Grover-Bardwick, A., Heidecker, G., Rapp, U. R., & Karin, M. (1992). Oncoprotein-mediated signalling cascade stimulates c-Jun activity by phosphorylation of serines 63 and 73. *Molecular and Cellular Biology*, 12(8), 3507–3513.
- Song, L., Zhou, T., & Jope, R. S. (2004). Lithium facilitates apoptotic signaling induced by activation of the Fas death domain-containing receptor. *BMC Neuroscience*, 5, 20.
- Spampanato, C., Feeney, E., Li, L., Cardone, M., Lim, J. a., Annunziata, F., ... Raben, N. (2013). Transcription factor EB (TFEB) is a new therapeutic target for Pompe disease. *EMBO Molecular Medicine*, 5, 691–706.
- Stolz, A., Ernst, A., & Dikic, I. (2014). Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nature Cell Biology*, 16(6), 495–501.
- Strohecker, A. M., Guo, J. Y., Karsli-Uzunbas, G., Price, S. M., Chen, G. J., Mathew, R., ... White, E. (2013). Autophagy sustains mitochondrial glutamine metabolism and growth of BrafV600E-driven lung tumors. *Cancer Discovery*, 3, 1272–85.
- Sun, A., Li, C., Chen, R., Huang, Y., Chen, Q., Cui, X., ... Li, B. (2015). Gsk-3 b Controls Autophagy by Modulating LKB1-AMPK Pathway in Prostate Cancer Cells, (September).
- Suzuki, T., Bridges, D., Nakada, D., Skiniotis, G., Morrison, S. J., Lin, J. D., ... Inoki, K. (2013). Inhibition of AMPK catabolic action by GSK3. *Molecular Cell*, 50, 407–419.
- Taelman, V. F., Dobrowolski, R., Plouhinec, J. L., Fuentealba, L. C., Vorwald, P. P., Gumper, I., ... De Robertis, E. M. (2010). Wnt signaling requires sequestration of Glycogen Synthase Kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell*, 143(7), 1136–1148.
- Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cuauling, H. D., Sun, M., Sato, Y., ... Wang, H. (2007). Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nature Cell Biology*, 9(10), 1142–1151.

- Takahashi, Y., Hori, T., Cooper, T. K., Liao, J., Desai, N., Serfass, J. M., ... Wang, H. G. (2013). Bif-1 haploinsufficiency promotes chromosomal instability and accelerates Myc-driven lymphomagenesis via suppression of mitophagy. *Blood*, *121*(9), 1622–1632.
- Takamura, A., Komatsu, M., Hara, T., Sakamoto, A., Kishi, C., Waguri, S., ... Mizushima, N. (2011). Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes & ...*, *5*, 795–800.
- Takeo, S., Swanson, S. K., Nandan, K., Nakai, Y., Aigaki, T., Washburn, M. P., ... Hawley, R. S. (2012). Inaugural Article: Shaggy/glycogen synthase kinase 3 and phosphorylation of Sarah/regulator of calcineurin are essential for completion of Drosophila female meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(17), 6382–6389.
- Thomas, G. M., Frame, S., Goedert, M., Nathke, I., Polakis, P., & Cohen, P. (1999). A GSK3-binding peptide from FRAT1 selectively inhibits the GSK3-catalysed phosphorylation of Axin and  $\beta$ -catenin. *FEBS Letters*, *458*, 247–251.
- Tsun, Z. Y., Bar-Peled, L., Chantranupong, L., Zoncu, R., Wang, T., Kim, C., ... Sabatini, D. (2013). The folliculin tumor suppressor is a GAP for the RagC/D GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Molecular Cell*, *52*(4), 495–505.
- Tuveson, D. a., Zhu, L., Gopinathan, A., Willis, N. a., Kachatrian, L., Grochow, R., ... Konieczny, S. F. (2006). Mist1-Kras G12D knock-in mice develop mixed differentiation metastatic exocrine pancreatic carcinoma and hepatocellular carcinoma. *Cancer Research*, *66*(1), 242–247.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, a, Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P., & Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science (New York, N.Y.)*, *287*(5453), 664–666.
- Urano, J., Sato, T., Matsuo, T., Otsubo, Y., Yamamoto, M., & Tamanoi, F. (2007). Point mutations in TOR confer Rheb-independent growth in fission yeast and nutrient-independent mammalian TOR signaling in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(9), 3514–3519.
- Valsecchi, M. E., Díaz-Cantón, E., De La Vega, M., & Littman, S. J. (2014). Recent treatment advances and novel therapies in pancreas cancer: A review. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, *45*(2), 190–201.
- Van Amerongen, R., Nawijn, M., Franca-Koh, J., Zevenhoven, J., Van Der Gulden, H., Jonkers, J., & Berns, A. (2005). Frat is dispensable for canonical Wnt signaling in mammals. *Genes and Development*, *19*(4), 425–430.

Vidal, R. L., Figueroa, a., Court, F. a., Thielen, P., Molina, C., Wirth, C., ... Hetz, C. (2012). Targeting the UPR transcription factor XBP1 protects against Huntington's disease through the regulation of FoxO1 and autophagy. *Human Molecular Genetics*, 21(10), 2245–2262.

Vinyoles, M., DelValle-Pérez, B., Curto, J., Viñas-Castells, R., Alba-Castellón, L., García de Herreros, A., & Duñach, M. (2014). Multivesicular GSK3 Sequestration upon Wnt Signaling Is Controlled by p120-Catenin/Cadherin Interaction with LRP5/6. *Molecular Cell*, 53, 444–457.

Von Hoff, D. D., Ervin, T., Arena, F. P., Chiorean, E. G., Infante, J., Moore, M., ... Renschler, M. F. (2013). Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *The New England Journal of Medicine*, 369(18), 1691–703.

Wang, J., Gu, S., Huang, J., Chen, S., Zhang, Z., & Xu, M. (2014). Inhibition of autophagy potentiates the efficacy of Gli inhibitor GANT-61 in MYCN-amplified neuroblastoma cells. *BMC Cancer*, 14(1), 768.

Watcharasit, P., Bijur, G. N., Song, L., Zhu, J., Chen, X., & Jope, R. S. (2003). Glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) binds to and promotes the actions of p53. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(49), 48872–48879.

Weerasekara, V. K., Panek, D. J., Broadbent, D. G., Mortenson, J. B., Mathis, A. D., Logan, G. N., ... Andersen, L. (2014). Promotes Autophagy via a ULK1- and AMPK-Regulated 14-3-3 □ Interaction with Phosphorylated Atg9, 34(24), 4379–4388.

Wei, W., Jin, J., Schlisio, S., Harper, J. W., & Kaelin, W. G. (2005). The v-Jun point mutation allows c-Jun to escape GSK3-dependent recognition and destruction by the Fbw7 ubiquitin ligase. *Cancer Cell*, 8(July), 25–33.

Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., & Levine, B. (2008). JNK1-Mediated Phosphorylation of Bcl-2 Regulates Starvation-Induced Autophagy. *Molecular Cell*, 30, 678–688.

Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W. W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., ... Chandel, N. S. (2010). Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(19), 8788–8793.

Welsh, G. I., & Proud, C. G. (1993). Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B. *The Biochemical Journal*, 294 ( Pt 3), 625–629.

White, E., & DiPaola, R. S. (2009). The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clinical Cancer Research*, 15, 5308–5316.

- Whiting, J. L., Nygren, P. J., Tunquist, B. J., Langeberg, L. K., Seternes, O.-M., & Scott, J. D. (2015). Protein Kinase A Opposes the Phosphorylation-Dependent Recruitment of Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  to A-Kinase Anchoring Protein 220. *Journal of Biological Chemistry*, jbc.M115.654822.
- Wilentz, R. E., Iacobuzio-Donahue, C. A., Argani, P., McCarthy, D. M., Parsons, J. L., Yeo, C. J., ... Hruban, R. H. (2000). Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: Evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Research*, 60(7), 2002–2006.
- Wilson, W., & Baldwin, A. S. (2008). Maintenance of constitutive I $\kappa$ B kinase activity by glycogen synthase kinase-3 $\alpha/\beta$  in pancreatic cancer. *Cancer Research*, 68(19), 8156–8163.
- Wirawan, E., Vande Walle, L., Kersse, K., Cornelis, S., Claerhout, S., Vanoverberghe, I., ... Vandenabeele, P. (2010). Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death & Disease*, 1(1), e18.
- Wolpin, B. M., Hezel, A. F., Abrams, T., Blaszkowsky, L. S., Meyerhardt, J. a., Chan, J. a., ... Fuchs, C. S. (2009). Oral mTOR inhibitor everolimus in patients with gemcitabine-refractory metastatic pancreatic cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27(2), 193–198.
- Wu, Z., Chang, P.-C., Yang, J. C., Chu, C.-Y., Wang, L.-Y., Chen, N.-T., ... Kung, H.-J. (2010). Autophagy Blockade Sensitizes Prostate Cancer Cells towards Src Family Kinase Inhibitors. *Genes & Cancer*, 1(1), 40–49.
- Xavier, I. J., Mercier, P. a, McLoughlin, C. M., Ali, a, Woodgett, J. R., & Ovsenek, N. (2000). Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  negatively regulates both DNA-binding and transcriptional activities of heat shock factor 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(37), 29147–29152.
- Xie, Z., & Klionsky, D. J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*, 9(10), 1102–1109.
- Xu, P., Das, M., Reilly, J., & Davis, R. J. (2011). JNK regulates FoxO-dependent autophagy in neurons. *Genes and Development*, 25(4), 310–322.
- Yachida, S., Jones, S., Bozic, I., Antal, T., Leary, R., Fu, B., ... Iacobuzio-Donahue, C. a. (2010). Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*, 467(7319), 1114–1117.
- Yamamoto, H., Kishida, S., Kishida, M., Ikeda, S., Takada, S., & Kikuchi, A. (1999). Phosphorylation of axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates its stability. *Journal of Biological Chemistry*, 274(16), 10681–10684.

- Yang, A., Rajeshkumar, N. V., Wang, X., Yabuuchi, S., Alexander, B. M., Chu, G. C., ... Kimmelman, A. C. (2014). Autophagy is critical for pancreatic tumor growth and progression in tumors with p53 alterations. *Cancer Discovery*, *4*, 905–913.
- Yang, E. S., Nowsheen, S., Wang, T., Thotala, D. K., & Xia, F. (2011). Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  inhibition enhances repair of DNA double-strand breaks in irradiated hippocampal neurons. *Neuro-Oncology*, *13*(5), 459–470.
- Yang, J., Takahashi, Y., Cheng, E., Liu, J., Terranova, P. F., Zhao, B., ... Li, B. (2010). GSK-3 $\beta$  promotes cell survival by modulating Bif-1-dependent autophagy and cell death. *Journal of Cell Science*, *123*, 861–870.
- Yang, S., Wang, X., Contino, G., Liesa, M., Sahin, E., Ying, H., ... Kimmelman, A. C. (2011). Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes and Development*, *25*, 717–729.
- Yang, Z. J., Chee, C. E., Huang, S., & Sinicrope, F. a. (2011). The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Molecular Cancer Therapeutics*, *10*, 1533–1541.
- Yao, X. Q., Li, X. C., Zhang, X. X., Yin, Y. Y., Liu, B., Luo, D. J., ... Liu, G. P. (2012). Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates leucine-309 demethylation of protein phosphatase-2A via PPMT1 and PME-1. *FEBS Letters*, *586*(16), 2522–2528.
- Yao, X.-Q., Zhang, X.-X., Yin, Y.-Y., Liu, B., Luo, D.-J., Liu, D., ... Liu, G.-P. (2011). Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates Tyr307 phosphorylation of protein phosphatase-2A via protein tyrosine phosphatase 1B but not Src. *The Biochemical Journal*, *437*(2), 335–344.
- Ying, H., Kimmelman, A. C., Lyssiotis, C. a., Hua, S., Chu, G. C., Fletcher-Sananikone, E., ... Depinho, R. a. (2012). Oncogenic kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell*, *149*(3), 656–670.
- Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai, M., & Tashiro, Y. (1991). Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *Journal of Biological Chemistry*, *266*(26), 17707–17712.
- Young, A. R. J., Chan, E. Y. W., Hu, X. W., Köchl, R., Crawshaw, S. G., High, S., ... Tooze, S. a. (2006). Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *Journal of Cell Science*, *119*, 3888–3900.
- Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., ... Simon, H.-U. (2006). Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nature Cell Biology*, *8*(10), 1124–1132.

- Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A. J., & Heintz, N. (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(25), 15077–15082.
- Zhou, J., Tan, S.-H., Nicolas, V., Bauvy, C., Yang, N.-D., Zhang, J., ... Shen, H.-M. (2013). Activation of lysosomal function in the course of autophagy via mTORC1 suppression and autophagosome-lysosome fusion. *Cell Research*, *23*, 508–23.
- Zhou, W., Capello, M., Fredolini, C., Racanicchi, L., Piemonti, L., Liotta, L. a., ... Petricoin, E. F. (2012). Proteomic analysis reveals warburg effect and anomalous metabolism of glutamine in pancreatic cancer cells. *Journal of Proteome Research*, *11*, 554–563.
- Zhou, Y., Uddin, S., Zimmerman, T., Kang, J.-A., Ulaszek, J., & Wickrema, A. (2008). Growth control of multiple myeloma cells through inhibition of glycogen synthase kinase-3. *Leukemia & Lymphoma*, *49*(783016891), 1945–1953.
- Zhu, Q., Yang, J., Han, S., Liu, J., Holzbeierlein, J., Thrasher, J. B., & Li, B. (2011). Suppression of glycogen synthase kinase 3 activity reduces tumor growth of prostate cancer in vivo. *The Prostate*, *71*(July 2010), 835–845.
- Zhu, Y., Zhao, L., Liu, L., Gao, P., Tian, W., Wang, X., ... Chen, Q. (2010). Beclin 1 cleavage by caspase-3 inactivates autophagy and promotes apoptosis. *Protein and Cell*, *1*(5), 468–477.
- Zirin, J., Nieuwenhuis, J., & Perrimon, N. (2013). Role of Autophagy in Glycogen Breakdown and Its Relevance to Chloroquine Myopathy. *PLoS Biology*, *11*(11).
- Zmijewski, J. W., & Jope, R. S. (2004). Nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 during replicative senescence of human fibroblasts. *Aging Cell*, *3*(June), 309–317.
- Zoncu, R., Efeyan, A., & Sabatini, D. M. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *12*(1), 21–35.