



HAL
open science

SQSTM1, une plateforme de signalisation clé contrôlant l'autophagie sélective jusqu'à la reprogrammation tumorale

Amine Belaïd

► **To cite this version:**

Amine Belaïd. SQSTM1, une plateforme de signalisation clé contrôlant l'autophagie sélective jusqu'à la reprogrammation tumorale. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2013. Français. NNT : 2013NICE4145 . tel-00945776

HAL Id: tel-00945776

<https://theses.hal.science/tel-00945776v1>

Submitted on 12 Feb 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE NICE SOPHIA-ANTIPOLIS, UFR SCIENCES

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

Présentée pour obtenir le titre de

Docteur es Sciences de l'Université de Nice Sophia-Antipolis

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

par

Amine BELAID

**SQSTM1, une plateforme de signalisation clé contrôlant
l'autophagie sélective jusqu'à la reprogrammation tumorale**

Soutenue le 20 Décembre 2013 à l'IRCAN, Nice, devant les membres du jury :

Pr Paul HOFMAN
Dr Patrice CODOGNO
Dr Lluis FAJAS
Dr Mojgan MERGNY
Dr Patrick AUBERGER
Dr Jean GIUDICELLI
Dr Baharia MOGRABI

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Membre Invité
Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout particulièrement à attribuer mes sincères remerciements ainsi que ma reconnaissance au **Dr Baharia Mograbi** pour qui j'ai un profond respect et une très haute estime! Merci pour ce magnifique exemple de droiture et de motivation que rien n'arrête. Depuis ces 6 années durant lesquelles j'ai pu bénéficier de ta formation, je n'ai rien vu entacher ton envie d'aller de l'avant et de mener ta recherche à bien. Donc plus que l'apprentissage d'une technique, d'une approche scientifique ou d'un style d'écriture, je te suis réellement reconnaissant de m'avoir démontré ce dont le courage et surtout la passion sont capables. Un énorme merci pour t'être battue pour que cette thèse soit possible aussi sur le plan du financement de thèse, ce qui a été une bataille ardue. J'espère pouvoir mettre en pratique le fruit de tes enseignements lors de ma poursuite de carrière.

Je remercie également les membres du jury : le **Dr Mergny**, le **Pr Fajas**, le **Dr Codogno**, le **Dr Auberger**, le **Dr Giudicelli** et le **Pr Hofman** pour juger de mon travail de thèse. C'est réellement un honneur pour moi de vous compter parmi ce jury de thèse. Merci pour votre disponibilité malgré vos emplois du temps chargés.

Un grand merci à **toute l'équipe** pour l'ambiance et surtout le soutien dans la vie de labo de tous les jours. L'environnement de travail fut plus qu'agréable durant ces quatre dernières années.

Je tiens à remercier le **Pr Paul Hofman** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et permis de réaliser cette thèse alors même que la question du financement était incertaine.

Merci au **Dr Patrick Brest** pour toutes les discussions scientifiques, la formation aux techniques qui touchent de près de ou de loin à la biologie moléculaire, le soutien et les encouragements dans les moments de doute. J'ai plus qu'apprécié la camaraderie ainsi que le coup de main déménagement X2 (emménagement en tant que couple puis de nouveau en tant que célibataire).

Merci aussi au **Dr Valérie Vouret** pour les conseils, avis et discussions scientifiques. De même sur le plan personnel avec les coups de pouces bricolage, le logement quand j'étais temporairement "sans domicile fixe" et les astuces-bons plans sports d'hiver !

Je n'oublie pas le personnel "du J" pour l'accueil et l'aide à la réalisation de manipulations au sein du LPCE-Tumorotheque : les **Virginies Tanga** et **Lespinet**, **Eric Selva**, les **Oliviers Bordone** et **Carruggi**, **Céline Coëlle**, **Mireille Mari**, **Yvonne Bille** et **Pascal Grier**.

Aux vues des différents projets abordés durant ma thèse, je remercie également les collaborateurs pour leur aide et leurs conseils : le **Dr Michel Samson**, le **Dr Jean Giudicelli**, le **Dr Ez-Zoubir Amri**, le **Dr Didier Pisani**, le **Dr Konstanina Fragaki**, le **Pr Florence Pedoutour**, le **Dr Jean-Marie Guignonis**, le **Dr Etienne Boulter**, le **Dr Georges Carle**, le **Dr Valérie Pierrefite-**

Carle, le Dr Isabelle Rubera, le Dr Christophe Duranton, le Dr Véronique Imbert et le Dr Corine Bertolotto.

Merci au **Dr Patrick Auberger** ainsi qu'à son équipe (le **Dr Fred Luciano**, le **Dr Guillaume Robert** et le **Dr Arnaud Jacquél**) pour le soutien lors des deux premières éditions du CFATG à Lyon puis à la Grande Motte.

J'adresse un merci mais surtout des encouragements à la jeune recrue en thèse et pipelette N°1 de "La Grave", **Giusi** ! Désolé de quitter le navire en pleine traversée en quête de terre ferme mais tu vas pouvoir compter sur l'accompagnement et l'aide non négligeable de **Sir Papounet** !

Forcément la pipelette N°2 qui vient directement ensuite n'est autre que l'ancienne camarade thésarde et jeune **Dr Sanda Mimouna**. Bravo pour le chemin parcourus et j'espère qu'il te mènera vers des paysages plus verts.

Je ne peux parler de navire ni de galère qui vogue sans penser à **Titou**. Merci pour la compagnie, les p'tits coups de main en renfort au labo et surtout pour le partage de ces magnifiques moments sur LA Yole !

Merci également au **Dr Pascal Colosetti** pour sa gentillesse et son aide.

Je n'oublie pas les autres personnes de passage au labo **Diogo, Laetichia, Sylvia, Nicolas, Hussein, Amine**, ainsi que les anciens thésards, les **Dr Chargui, le Dr Cesaro** et le **Dr Cane** !

Je ne peux m'empêcher d'avoir une très grosse pensée pour les autres camarades de fac puis de thèse ainsi que les personnes côtoyées à Pasteur et qui sont devenus des amis : **Mèl, Sandy, Diogo, Julien, Jean, Cécile, Cathy, Pape, David, Myriam, Grazia, Mèl** (encore une), **Nico, Elé, Flo, JC...** Pardon à ceux que j'oublie, les amis de labeur.

Forcément un énorme MERCI aux proches (**Baya, Amel, Djamel**) ainsi qu'à **Anne** pour le soutien lors des moments pas faciles et coups de blues que représente obligatoirement une thèse.

"Il y a une différence entre connaître le chemin, et arpenter le chemin"

Andy Wachowski

Table des Matières

INTRODUCTION	2
A. Pathologies liées à SQSTM1	6
1. Maladie de Paget – mutations de SQSTM1	6
2. Maladies de Charcot – mutations de SQSTM1	7
3. Dégénérescence cellulaire et surexpression de SQSTM1	8
4. Arguments impliquant un défaut de SQSTM1 dans l' Obésité.....	11
5. Cancers.....	13
B. Fonctions moléculaires de SQSTM1 dans la tumorigénèse ..	17
1. Réponse au stress, NFκB et survie cellulaire	19
1. SQSTM1 et activation de la voie NFκB	19
2. Contrôle du stress oxydatif par SQSTM1 : KEAP1-NRF2.....	21
3. SQSTM1 et activation de P38.....	23
2. Fonctions nucléaires de SQSTM1	24
3. SQSTM1, mTOR et prolifération cellulaire.....	26
4. SQSTM1, oligomérisation et signalisation.....	27
1. Le domaine d'oligomérisation PB1:	27
2. Le domaine de liaison à l'ubiquitine (UBA) de SQSTM1	28
3. Caspase8 : Exemple d'activation	30
4. Exemple d'inactivation	32
5. Régulation de l'oligomérisation de SQSTM1 par phosphorylation.....	32
C. Régulation de SQSTM1	33
1. Transcription.....	33
1. Régulation transcriptionnelle en réponse au stress oxydatif	34
2. Régulation transcriptionnelle <i>via</i> le facteur de transcription AP-1	34

3. Régulation transcriptionnelle <i>via</i> NFκB:	35
2. Dégradations... ..	35
3. Surexpression de SQSTM1 dans le développement tumoral ...	35

D. Autophagie : un mécanisme garde -fou pour limiter

SQSTM1.....38

1. Description du processus	38
2. Les différentes formes d'autophagie	38
1. La microautophagie.....	39
2. CMA.....	40
3. La macroautophagie	40
3. Régulation de l'autophagie : Rôles de SQSTM1/TRAF6	46
1. Inhibition de l'autophagie	46
2. Activation de l'autophagie.....	47
4. Régulation croisée entre l'autophagie, SQSTM1 et les miRs.....	49
1. Régulation de l'autophagie par les miRs.....	49
2. Régulation de SQSTM1 par les miRs	50
3. Autophagie, miRs et pathologies	50
4. L'autophagie régule les miRs.....	54
5. Fonctions de l'autophagie dans le cancer	55
1. Enjeu de santé publique.....	56
2. Fonctions anti-tumorales de l'autophagie	57
3. Fonctions pro-tumorales de l'autophagie	61

RESULTATS.....70

Article I: Vers une meilleure définition de la fonction anti-tumorale de l'autophagie **72**

Articles: Signalphagie : Arrêt de la signalisation par dégradation autophagique _____ **75**

II à IV sélective des molécules actives : mise en évidence avec RhoA-GTP

Article V: Rôle de SQSTM1 dans la programmation tumorale _____ **79**

Brevet

Liste des abréviations

AA:	Acides Aminés
ADN:	Acide DésoxyriboNucléique
AG :	Acides Gras
ALS:	Sclérose Amyotrophique Latérale
ALIS:	Aggresome-Like Induced Structures
AMBRA :	Activating Molecule in Beclin 1-Regulated Autophagy
AMPc :	Adénosine Monophosphate Cyclique
ARE :	AU-Rich Elements
ARN:	Acide RiboNucléique
Atg:	Autophagic genes
CC1/2:	Coil-Coil 1/2
CD:	Maladie de Crohn
CK2:	Casein Kinase 2
CMA:	Chaperone Mediated Autophagy
CUL3:	Cullin-Based E3
FIP200:	FAK family kinase-Interacting Protein 200 kDa
H2O2:	peroxide d'hydrogène
HSC70:	Heat Shock Cognate protein 70 kDa
IL-3:	Interleukine 3
IPOD:	Insoluble Protein Deposit
IRGM:	Immunity-Related GTPase family M protein
JUNK:	JUxta Nuclear Quality control compartment
K48:	Lysine 48
K63:	Lysine 63
KEAP1:	Kelch-like ECH-Associated Protein 1
KIR:	Keap1 interacting region
KO:	Knock Out
LIR:	LC3 interacting region
LC3:	Light Chain 3
LMC:	Leucémie Myéloïde Chronique
LPS:	LipoPolySaccharides
MEF:	Mouse Embryonic Fibroblast
miRNA:	micro RNA

mTORC1:	mammalian Target Of Rapamycin Complex 1
NES:	Nuclear Export Signal
NFκB :	Nuclear Factor kappa B
NLS:	Nuclear Localization Signal
NRF2:	Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2
NSCLC:	Non Small Cell Lung Cancer
PB1:	Phox and Bem1
PDE4A:	phosphodiesterase 4a
PHD3:	Prolyl Hydroxylase 3
PI3K:	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKB:	Protéine Kinase B
PML:	ProMyelocytic Leukemia protein
RISC:	RNA Interference Silencing Complex
RBX1:	Ring box1
RIP:	Receptor Interacting Protein
ROS:	Reactive oxygen species
siRNA:	silencing RNA
shRNA:	short hairpin RNA
SNARE:	Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
SQSTM1:	Séquestosome 1
TBK1:	TANK-Binding Kinase 1
TBS:	Traf6 Biding Site
TNF:	Tumor Necrosis Factor
TRAIL:	Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand
TRAF6:	TNF Receptor Associated Factor 6
TSC1/2:	Tuberin Sclerosis Complex 1/2
UBA:	UBiquitin-Associated domain
UCP1:	mitochondrial UnCoupling Protein 1
ULK1:	Unc-51 Like autophagy activating Kinase 1
UVRAG:	UltraViolet Radiation resistance-Associated Gene
WIPI:	WD repeat domain phosphoinositide-interacting proteins
ZZ:	Zinc finger

Liste des figures

Figure 1. Fonctions de SQSTM1	p4
Figure 2. Mutations de SQSTM1	p5
Figure 3. SQSTM1 et développement tumoral	p15
Figure 4. Domaines de SQSTM1	p17
Figure 5. Rôle de SQSTM1 dans la voie de signalisation NFκB	p20
Figure 6. Relation entre SQSTM1 et KEAP1-NRF2	p22
Figure 7. Phosphorylation de SQSTM1 dans la réponse au stress oxydatif	p22
Figure 8. Régulation de l'activation de mTOR par SQSTM1	p27
Figure 9. Les trois types de domaines PB1	p28
Figure 10. Structure 3D du domaine UBA de SQSTM1	p29
Figure 11. Différents types de chaînes de polyubiquitination sur lysine, et fonctions cellulaires associées	p30
Figure 12. Promoteur, gène et formes épissées de SQSTM1	p34
Figure 13. SQSTM1 et tumorigénèse	p36
Figure 14. Boucles de rétrocontrôle positives de SQSTM1	p37
Figure 15. Les trois types majeurs d'autophagies	p39
Figure 16. Processus autophagique au niveau vésiculaire	p42
Figure 17. Processus autophagique au niveau moléculaire	p44
Figure 18. Régulation du flux autophagique par la poly-Ub K63 via les complexes SQSTM1/TRAF6 et AMBRA/TRAF6	p48
Figure 19. Conséquences des oncomiRs et des mirs suppresseurs de tumeur sur le processus autophagique	p53
Figure 20. Dégradation de miR par l'autophagie	p54
Figure 21. Les fonctions de l'autophagie	p55
Figure 22. Conséquences d'un défaut autophagique	p60
Figure 23. Amplifications et délétions de SQSTM1 dans les cancers	p61
Figure 24. Autophagie et métabolisme tumoral	p65

Liste des tableaux

Tableau 1. Appellations de SQSTM1	p3
Tableau 2. Protéinopathies où des agrégats riches en SQSTM1 ont été rapportés	p10
Tableau 3. Modèles KO de SQSTM1 dans la dégénérescence cellulaire	p10
Tableau 4. Modèles KO de SQSTM1 dans l'obésité	p13
Tableau 5. Domaines de SQSTM1 et leurs séquences	p17
Tableau 6. Partenaires de SQSTM1	p18
Tableau 7. Régulation de la translocation de SQSTM1 par phosphorylation	p25
Tableau 8. Régulation de l'affinité de SQSTM1 par ses phosphorylations	p32
Tableau 9. Gènes autophagiques	p43
Tableau 10. MiRs ciblant l'autophagie et surexprimés dans les maladies inflammatoires	p51
Tableau 11. Autophagies sélectives	p59
Tableau 12. Etudes portant sur la relation entre l'oncogène Ras et l'autophagie	p64

INTRODUCTION

Initialement *SQSTM1* a été cloné grâce à son interaction avec la tyrosine kinase P56LCK (Joung et al., 1996). Elle fut d'abord nommée A170/STAP chez la souris (Ishii et al., 1996), ZIP et ZIP2 chez le rat (Stratagene) et enfin SQSTM1 chez l'homme (Park et al., 1995). Aujourd'hui, pour ces trois protéines qui partagent 90% d'homologies, un seul nom est utilisé SQSTM1/p62.

A170	nom de l'anticorps	souris	(Ishii et al., 1996)
STAP	Signal Transduction and Adapter Protein	souris	(Okazaki et al., 1999)
ZIP ZIP2	Zeta protein kinase C Interacting Protein Variant 2	rat	(Puls et al., 1997)
SQSTM1/P62	Sequestosome1, protéine P62	homme	(Laurin et al., 2002)

Tableau 1. Appellations de SQSTM1

En l'espace de 16 ans et notamment ces cinq dernières années, l'augmentation du nombre d'études concernant SQSTM1 est impressionnante. Son défaut comme sa surexpression ont été impliqués dans une liste croissante de pathologies fréquentes comme la maladie de Paget, les maladies neurodégénératives, les cancers, l'obésité, etc...

L'importance de SQSTM1 en physiopathologie s'illustre par le fait qu'il constitue une plateforme de signalisation essentielle régissant des mécanismes aussi variés tels que la croissance, la différenciation, la survie, l'apoptose, le métabolisme et l'inflammation. SQSTM1 interagit avec de nombreuses protéines de signalisation : elle comprend des sérines/thréonines kinases (ERK1, MEK5, aPKC, P38, MEKK3, RIP), des tyrosines kinases (TRKA, P56/LCK), des protéines régulatrices (RAPTOR, RAG), des facteurs de transcription (PPAR α), des protéases et protéines apoptotiques (CASPASE8, Par-4), des ubiquitine ligases (TRFA6, KEAP1), des déubiquitinases (CYLD), et d'autres molécules d'adressage (NBR1, SQSTM1, LC3, ubiquitine). Cependant cette liste n'est pas exhaustive, ni finalisée puisque de nouveaux partenaires viennent d'être mis en évidence et font l'objet de recherches intensives.

Globalement, il se dégage de l'ensemble de la littérature, que la fonction principale de SQSTM1 est associée à l'activation de la voie de signalisation de NF κ B. Au moment où j'ai

initié ma thèse, SQSTM1 venait juste d'être décrit comme un acteur pro-oncogénique essentiel au développement tumoral et un substrat de l'autophagie, un processus catabolique que l'on suppose suppresseur de tumeur. En 2009, les mécanismes cellulaires sous-jacents à ces fonctions pro-oncogéniques et suppresseur tumoral n'étaient pas connus.

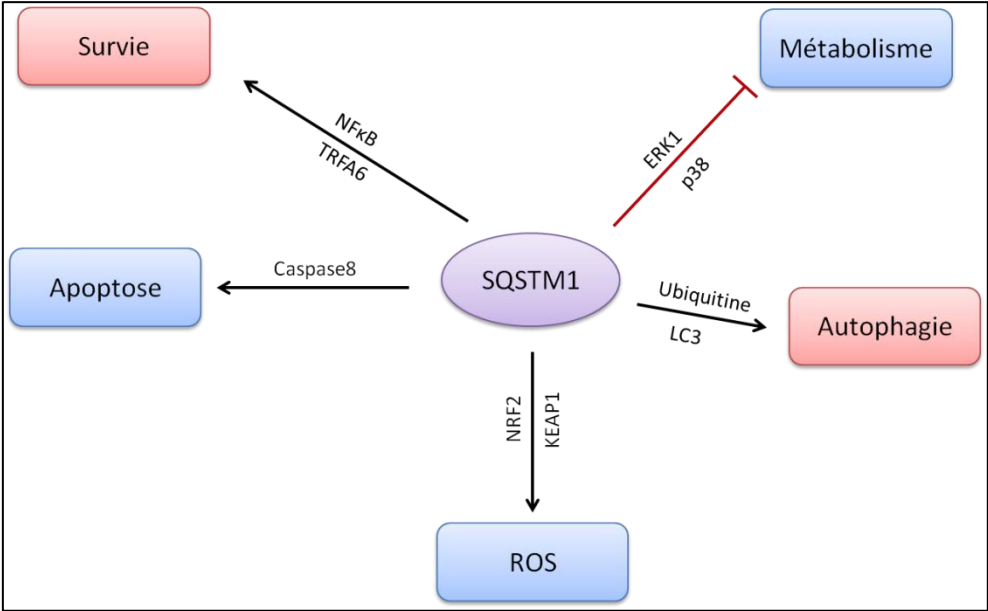
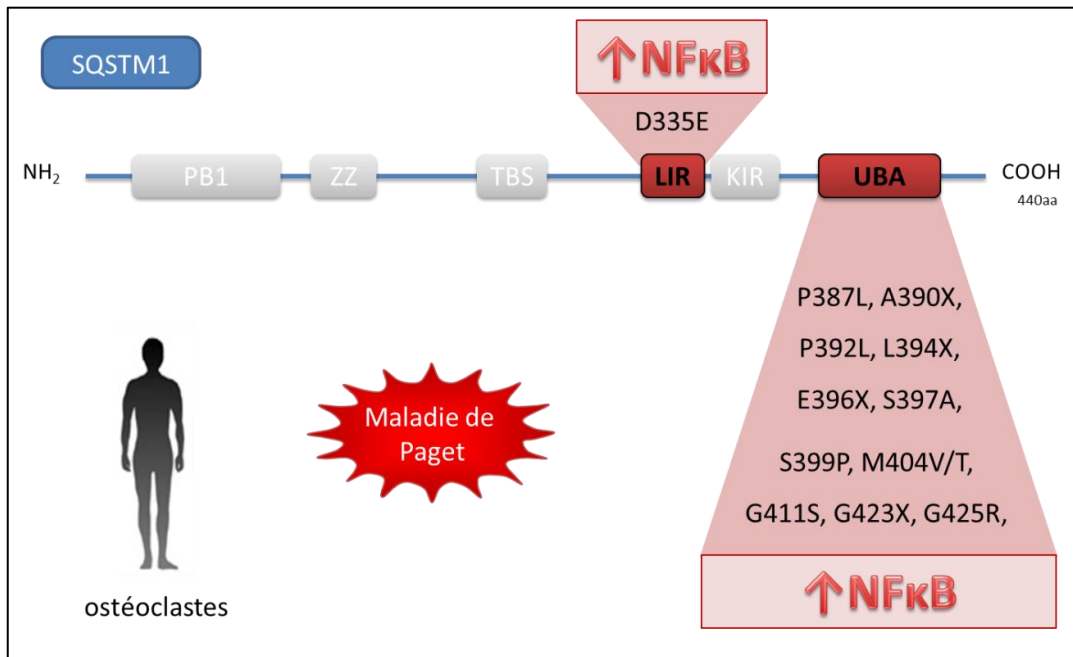


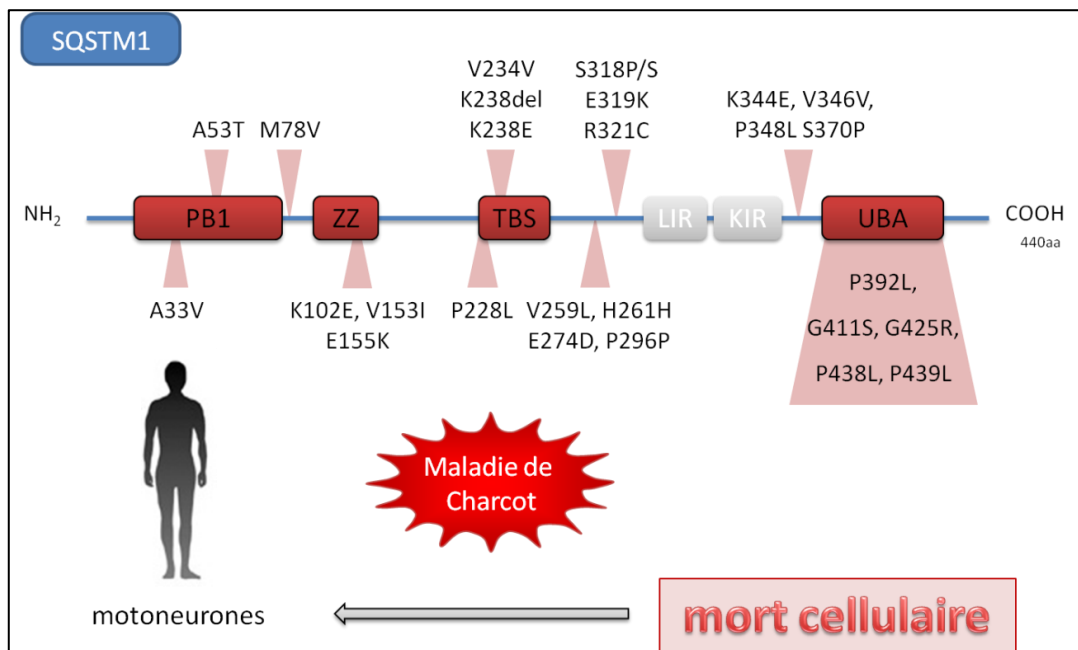
Figure 1. Fonctions de SQSTM1

Figure 2. Mutations de *SQSTM1*

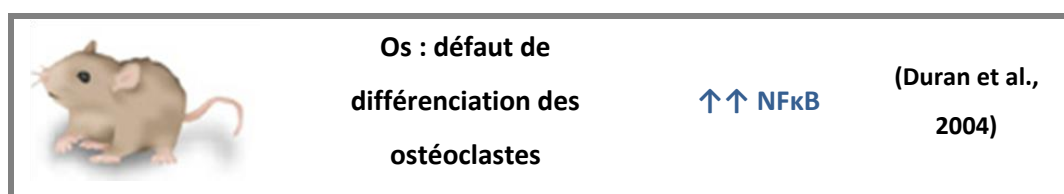
a) Dans la maladie de Paget



b) Dans la maladie de Charcot



c) Phénotype des souris *Sqstm1*^{-/-}



A. Pathologies liées à SQSTM1

Les anomalies concernant SQSTM1 (mutations, amplifications, surexpression ou défaut d'expression) ont été associées avec plusieurs pathologies humaines comme la maladie de Paget, les maladies neurodégénératives, les maladies hépatiques, l'obésité ainsi que le développement tumoral.

1. Maladie de Paget – mutations de SQSTM1

La pathologie la plus étudiée et la mieux décrite dans laquelle SQSTM1 est impliquée, est sans conteste la maladie de Paget qui touche 3 à 4% de la population de plus de 50 ans. Elle se caractérise par une dystrophie osseuse condensante, avec une construction désordonnée entre les ostéoclastes et les ostéoblastes. La cause de cette pathologie reste inconnue, mais une contribution génétique mettant en jeu au moins huit loci est démontrée dans certaines formes familiales. *SQSTM1* est un des gènes causatifs (10% des patients en France) de la pathologie en raison d'une vingtaine de mutations entre les exons 7 et 8 codant pour le domaine C-terminale de liaison à l'ubiquitine (nommé UBA pour "UBiquitin-Associated domain") (Goode and Layfield, 2010 ; Morissette et al., 2006).

Nature des mutations : Les mutations de *SQSTM1* rapportées à ce jour dans la maladie de Paget sont soit des mutations non-sens (A390X, L394X, E396X et D423X) aboutissant à une protéine tronquée du domaine UBA ou des mutations faux sens (P392L, P387L, S397A, S399P, M404V, G411S et G425R) perturbant la fonction de ce domaine (**Figure 2a**). Parmi les partenaires du domaine UBA, il a été mis en évidence que ce domaine interagissait de manière indépendante à l'ubiquitine avec la déubiquitinase CYLD, un régulateur négatif de la voie NFκB. De ce fait le mécanisme communément admis dans la maladie de Paget pourrait faire intervenir une hyperstimulation de la voie de NFκB dans les ostéoclastes en réponse à la cytokine RANK-L (Goode and Layfield, 2010). Récemment, à ces mutations qui touchaient exclusivement le domaine UBA, viennent de se rajouter trois mutations faux sens (A381V, P364S et D335E) dont la mutation D335E qui touche le domaine de liaison à la protéine autophagique LC3, sans qu'aucun mécanisme ne soit proposé (Falchetti et al., 2009). De manière analogue à CYLD, l'autophagie étant un régulateur négatif

de la voie de signalisation NFκB (Fliss et al., 2012 ; Kim et al., 2010; Niida et al., 2010; Qing et al., 2006), nous proposons que cette mutation puisse également aboutir à l'hyperstimulation de la voie de NFκB.

2. Maladies de Charcot – mutations de SQSTM1

Etant donné le caractère ubiquitaire de SQSTM1, il est frappant de constater que dans les formes familiales de la maladie de Paget, les mutations germinales de *SQSTM1* n'engendrent pas d'autres traits cliniques touchant d'autres cellules cibles. Ce qui soulève plusieurs hypothèses, à savoir

- l'existence d'une redondance protéique faisant intervenir d'autres protéines qui prendraient le relais,
- la spécificité tissulaire qui témoignerait d'une sensibilité plus importante des ostéoclastes vis-à-vis de ces mutations,
- l'intervention de facteurs environnementaux pas encore identifiés,
- ou que ces mutations n'aient pas été recherchées dans d'autres pathologies.

Or ces deux dernières années, une vingtaine de mutations ont été retrouvées dans SQSTM1 chez les patients atteints de la maladie de Charcot ou de la sclérose amyotrophique latérale (ALS) (Fecto et al., 2011 ; Hirano et al., 2013 ; Rubino et al., 2012 ; Shimizu et al., 2013 ; Teyssou et al., 2013) (**Figure 2b**). A la différence de la maladie de Paget, ces mutations affectent tous les domaines de SQSTM1. Jusqu'à présent dans ce sujet émergent, ni les conséquences de ces mutations sur la fonction de SQSTM1, ni la preuve qu'elles soient responsables de la pathologie n'ont été apportées. Seule une corrélation entre la présence de ces mutations et une mort cellulaire plus importante des neurones a été détectée dans ces cas cliniques. Au total, en l'espace de 2 ans, une trentaine de mutations sur *SQSTM1* ont été identifiées dans les maladies de Paget, de Charcot et peut être dans la maladie de Parkinson. Au niveau moléculaire cette implication croissante de SQSTM1 va de pair avec ses fonctions de signalisation. Il serait intéressant de savoir si ces mutations prédisposent ou constitueraient un facteur de risque pour des pathologies de plus en plus fréquentes. Fait marquant, trois de ces mutations (P392L, G411S et G425R) sont communes aux maladies de Paget et de Charcot, et constitueraient un facteur de risque pour ces deux pathologies (Kwok

et al., 2013). D'autre part, l'analyse *post mortem* d'un patient porteur de mutation de SQSTM1 a montré la présence de corps de Lewy, rapprochant de la maladie de Parkinson (Shimizu et al., 2013). De ce fait il est important de poursuivre l'étude des conséquences de ces mutations et élargir la recherche de mutations à d'autres pathologies.

3. Dégénérescence cellulaire et surexpression de SQSTM1

Une caractéristique histologique commune à de nombreuses maladies dégénératives est l'accumulation de protéines mutées, mal conformées, endommagées ou toxiques, qui ont tendance à former des agrégats riches en SQSTM1. Ces maladies sont regroupées sous le terme de protéinopathies et comprennent notamment les maladies neurodégénératives (**Tableau 2**) (Bjorkoy et al., 2005; Donaldson et al., 2003; Gal et al., 2007). Ces inclusions ont été rapportées dans les cellules nerveuses (Kuusisto et al., 2003; Kuusisto et al., 2001) (Parkinson et al., 2006), dans les hépatocytes où elles portent le nom de corps de Mallory (Stumptner et al., 1999) (Zatloukal et al., 2002) (Stumptner et al., 2002), ainsi que dans d'autres types cellulaires tels que les macrophages et les cellules dendritiques (Lamark and Johansen, 2012).

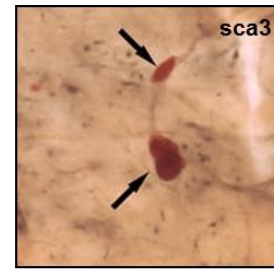
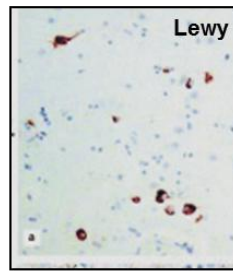
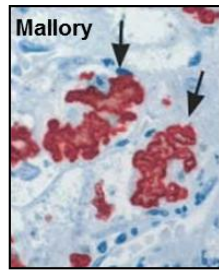
Ces agrégats sont alors dénommés selon leur localisation subcellulaire :

- Agrésomes et JUNK (pour "JUxta Nuclear Quality control compartment") au niveau du centre organisateur des microtubules (MTOC).
- IPOD ("Insoluble Protein Deposit") à proximité de la vacuole (levure) ou des organelles.
- DALIS ("Dendritic cell Aggresome-like Structures") identifiés dans les cellules dendritiques en réponse au LPS, aux agents pro-inflammatoires et infectieux.
- ALIS ("aggresome-like induced structures") agrégats de protéines ubiquitinées semblables aux DALIS mais qui s'observent dans les cellules immunitaires et non-immunitaires en réponse à différents stress. DALIS et ALIS sont des agrégats réversibles, distincts des agrésomes: ils ne sont pas colocalisés avec le MTOC et ne sont pas pris dans une cage de vimentine et de F-actine.

Quel que soit leur appellation, ce sont des structures insolubles, résistantes aux protéases, de taille, de forme et de composition variables. Cette composition comprend des protéines ubiquitinées (JUNK, DALIS, ALIS) ou non ubiquitinées (IPOD) (Lamark and

Johansen, 2012), et systématiquement SQSTM1. Ce qui conforte l'importance de SQSTM1 dans la composition et la formation des agrégats (Duran et al., 2011; Jin et al., 2009; Komatsu et al., 2007) (Okatsu et al., 2010) ; (Narendra and et al., 2010). Par différentes approches (souris transgéniques SQSTM1^{-/-}, shRNA, surexpression) il a été mis en évidence que la surexpression de SQSTM1 est nécessaire et suffisante à la formation de ces agrégats, alors que son invalidation l'abolit (Komatsu et al., 2007) (**Tableau 3**).

A ce stade, nous pouvons nous interroger si cette surexpression de SQSTM1 récurrente et la formation de ces agrégats est bénéfique pour la cellule. Globalement il se dégage de l'ensemble de la littérature que ces agrégats sont bénéfiques puisqu'ils séquestrent des protéines mal repliées toxiques pour la cellule (Babu et al., 2005). D'autre part, SQSTM1 est non seulement une protéine constituante de l'agrésome mais également un récepteur essentiel à la dégradation sélective par l'autophagie, l'agréphagie (page 59) (Bartlett et al., 2011). Il est important de souligner, que dans toutes ces pathologies, la présence de ces agrégats entretient un stress oxydatif qui va amplifier, par l'accumulation croissante de SQSTM1, la dégénérescence tissulaire.




	Maladie	Inclusions protéiques	Protéine toxique
	Stéatose alcoolique	Corps de Mallory	Kératines et protéines chaperonnes
	Alzheimer	plaque sénile et dépôts amyloïdes	Tau, amyloïde β , préséniline 1 mutée
	Parkinson	Corps de Lewy	α -synucléine normale et mutée, parkine mutée
	Charcot	Corps de Bunina	SOD, TDP43
	Huntington	agrégats de huntingtine	Huntingtine mutée
	Expansion de polyglutamine (Ataxie spinocérébelleuse de type 3 ou SCA3)	agrégats nucléaires et cytoplasmiques	Protéines à expansion poly-GLU et ataxine 3 mutée (SCA3)
	Creutzfeldt-Jakob	dépôts amyloïdes	prion
	Mucoviscidose	agrésomes	CFTR mutée

Tableau 2. Protéinopathies où des agrégats riches en SQSTM1 ont été rapportés


Pathologie	Type KO	Tissu/type cellulaire	Effet cellulaire	Voie de signalisation	Rèf
 Alzheimer, neuro-dégénérescence	Tous les tissus	Cerveau + MEF KO	\uparrow dommages à ADN, \downarrow survie	Stress oxydatif Vieillesse	(Du et al., 2009)
	Tous les tissus	cerveau	\uparrow agrégats tau K63 polyUb, atteinte neuronale	Stress oxydatif agrésome	(Babu et al., 2005)
	Tous les tissus	cerveau	Accumulation de TrkA	Protéasome	(Geetha et al., 2008)
Neuro-dégénérescence	Tous les tissus	cerveau	\uparrow TrkA K63 polyUb	Protéasome Stress oxydatif	(Wooten et al., 2008)
Dégénérescence cellulaire	Foie et neurones	hépatocytes neurones	\downarrow agrégats prot Ub, réduit toxicité	Agrésome	(Komatsu et al., 2007)
Stress oxydatif	Tous les tissus	MEF KO	Défaut d'import facteur Tfam ds mitochondrie	Intégrité mitochondrie, Stress oxydatif	(Seibenhener et al., 2013)

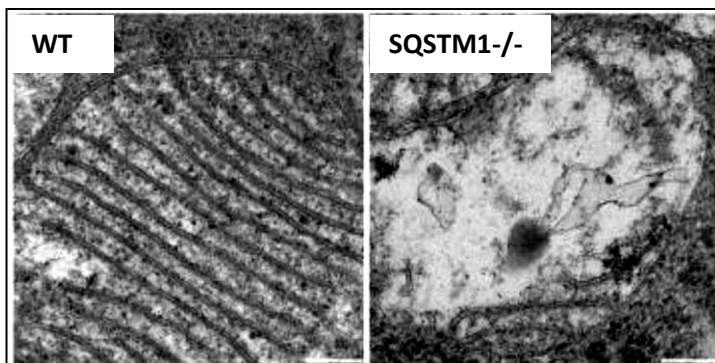
Tableau 3. Modèles KO de SQSTM1 dans la dégénérescence cellulaire

4. Arguments impliquant un défaut de SQSTM1 dans l'Obésité

La mise en évidence surprenante du rôle de SQSTM1 dans l'obésité est très récente et n'a sollicité que peu d'équipes dans son exploration. Elle repose sur l'observation selon laquelle différents modèles murins d'inactivation de SQSTM1 deviennent obèses et développent un syndrome métabolique (Duran et al., 2004; Komatsu et al., 2007; Muller et al., 2013) (Tableau 4).

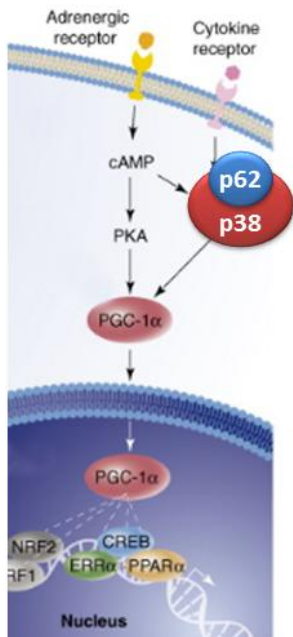
Afin d'identifier le défaut tissulaire responsable de cette obésité *in vivo*, l'équipe de Moscat et al, a utilisé le système Cre-lox pour cibler l'extinction de *SQSTM1* dans les tissus clés. Ainsi, ils ont mis en évidence que la délétion spécifique de *SQSTM1* dans le système nerveux central, le foie, le muscle squelettique et les macrophages n'affecte pas le métabolisme systémique, évalué par la prise de poids, le taux de graisse et la perte de masses musculaires.

A l'inverse, l'extinction ciblée de *SQSTM1* dans les adipocytes conduit à une obésité des souris, qu'elles soient nourries sous régime normal (5,6% de graisse) ou hyper lipidique (58% de graisse). Ces observations signifient que cette obésité est indépendante du régime alimentaire, d'une augmentation de l'appétit (système nerveux central) ou d'un manque d'exercice (muscle squelettique).



Faits marquants, cette équipe a mis en évidence que l'absence de SQSTM1 dans le tissu adipeux favorise la formation de tissu adipeux blanc au dépend du tissu adipeux brun. Dans ce dernier, nous assistons à une réponse inflammatoire caractéristique de l'obésité, à une

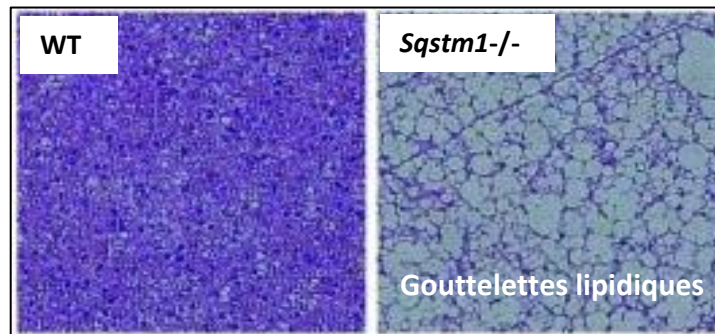
réduction de la masse (mitochondries déformées avec peu de crêtes) et de la fonction mitochondriale.



A l'origine, les auteurs associent le défaut métabolique dû à l'absence de SQSTM1 à un des défauts d'un de ses partenaires :

- A l'activation d'ERK ; normalement réprimé par SQSTM1
- Ou à l'inactivation de la voie de signalisation P38/PGC1α/UCP1 ; normalement activée par SQSTM1 et nécessaire à la thermogénèse ainsi qu'à la biogénèse mitochondriale des adipocytes bruns.

Ainsi, schématiquement les adipocytes bruns des souris *Sqstm1*^{-/-} ne "brûlent plus assez de calories" et accumulent des graisses (ci -dessous).



De là, nous pourrions rebondir chez l'homme en s'interrogeant sur l'importance d'un défaut de SQSTM1 dans l'obésité; puisque jusqu'à présent toutes les études ont été menées sur des modèles murins. Au niveau mondial, l'obésité est le cinquième facteur de risque de décès (organisation mondiale de la santé). Cette maladie multifactorielle est liée principalement à un déséquilibre alimentaire associé à un régime riche en graisse mais aussi une composante génétique avec un risque d'obésité deux à huit fois plus élevé dans certaines familles. Il serait par conséquent intéressant de déterminer en outre ● si des mutations «perte de fonction» de SQSTM1 prédisposent à la prise de poids et à l'obésité ; et ● si une alimentation riche en graisses pourraient diminuer l'expression de *SQSTM1*. Cette découverte du rôle de SQSTM1 devrait conduire à l'émergence de nouvelles pistes thérapeutiques pour faire "fondre le tissu adipeux" comme le souligne le Dr Moscat.


Pathologie	Type KO	Tissu/type cellulaire	Phénotype	Voie de signalisation	Rèf
 Obésité, diabète et stéatose	Tous les tissus	adipocyte, muscle, foie, rate	obésité, ↑diff adipocytaire	↑ERK	(Lee et al., 2010; Rodriguez et al., 2006)
	Inductible et tissu spécifique	tissu adipeux brun	obésité + défaut de thermogénèse, mitochondrie	↑ERK, (↓p38/Pgc1α)	(Muller et al., 2013)
	Tous les tissus	Hépatocytes adipocytes	Obésité + traitement Acarbose : ↓obésité ↓steatose	↑PPARα, Ucp2, abca1 (hépatocytes), ↑srebp1c, PPARα, γ (adipocytes)	(Okada et al., 2009)
Athérome (syndrome métabolique)	Tous les tissus	Cellules musculaires vasculaires	↑prolifération ↑migration	↑p38/ERK1/2	(Sugimoto et al., 2010)

Tableau 4. Modèles KO de SQSTM1 dans l'obésité

5. Cancers

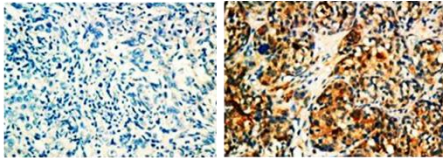
De toutes les pathologies dans lesquelles SQSTM1 serait impliqué, plusieurs études récentes scientifiques et cliniques soulignent l'importance de cette molécule dans le développement tumoral. En clinique, une surexpression de SQSTM1 est fréquemment observée dans les cancers du sein, les glioblastomes, les hépatocarcinomes, les cancers du rein déficients en tubérine (TSC2), les cancers de la prostate, et les cancers du poumon à non petites cellules (NSCLC) par rapport aux tissus sains où le niveau de SQSTM1 est indétectable (Galavotti et al., 2013; Inami et al., 2011; Parkhitko et al., 2011; Takamura et al., 2011); (Kitamura et al., 2006); (Duran et al., 2008; Inoue et al., 2012; Thompson et al., 2003) (**Figure 3a**). Fait marquant, pour tous ces cancers, la surexpression de SQSTM1 est de mauvais pronostic associé aux formes les plus agressives (Rolland et al., 2007; Thompson et al., 2003); ce qui semble indiquer que sa fonction pro-tumorale pourrait être majeure et ubiquitaire.

De fait, il est important de déterminer si la surexpression de SQSTM1 apporte un avantage sélectif à la cellule tumorale. Par transgénèse et xéno greffe, cinq groupes ont démontré de manière indépendante que la surexpression de SQSTM1 est absolument requise pour la tumorigénèse dans différents tissus, qu'elle soit induite par l'oncogène Kras ou la perte de gènes suppresseur de tumeur (*TSC2*, *ATG5* et *ATG7*) (Duran et al., 2008; Ling et al., 2012; Mathew et al., 2009; Parkhitko et al., 2011; Takamura et al., 2011). La première étude en 2008, de l'équipe de Moscat J et al, a mis en évidence qu'en l'absence de SQSTM1 l'expression de l'oncogène RasV12 n'est plus capable de transformer des fibroblastes *in vitro* ou d'induire des cancers du poumon dans des souris transgénique (*KrasG12D*) ; alors que 90 % des animaux exprimant *KrasG12D* et SQSTM1 présentent des tumeurs (Duran et al., 2008). Ces résultats surprenants ont été par la suite validés dans des modèles murins de cancer du pancréas, du rein et d'hépatocarcinomes induits par l'oncogène *KrasG12D*, la perte de suppresseur de tumeur de *TSC2* ou d'*ATG7* (Duran et al., 2008; Parkhitko et al., 2011; Takamura et al., 2011). Fait marquant, l'équipe d'Eileen White a démontré que la transfection de SQSTM1 suffit à induire des tumeurs par xéno greffes de cellules (iBMK) *Atg5*^{-/-} alors que des cellules *Atg5*^{-/-} seules, et des cellules sauvages n'en développent pas (Mathew et al., 2009).

Contre toute attente, l'ensemble de ces résultats murins suggèrent que l'expression d'oncogènes Kras ou la perte de suppresseur de tumeur n'est pas suffisante à induire le cancer. Ceci est à rapprocher de la détection de la mutation Kras chez 10 à 20% de la population saine et qui pourtant ne développe pas de cancer (Daniluk et al., 2012). Après les mutations oncogéniques, ces études suggèrent que la surexpression de SQSTM1 serait l'événement déclenchant responsable de l'engagement irréversible vers le cancer. Rappelons que cette surexpression peut être induite par l'inflammation (NFκB) (Duran et al., 2008), le stress oxydatif (NRF2), des défauts autophagiques, ou une amplification génique (région 5q35) qui sont des événements fréquents du développement tumoral ([The Cancer Genome Atlas - Cancer Genome - TCGA, Figure 3b](#)).

a) Overexpression protéique de SQSTM1

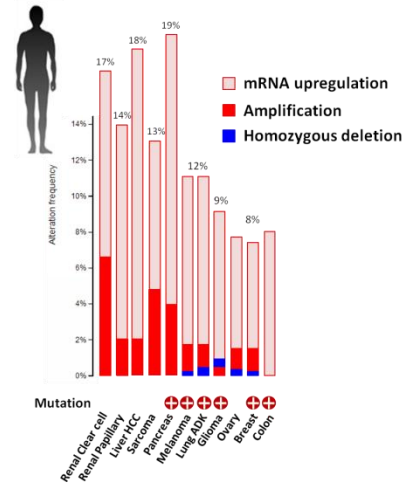
Cancer	Grade	Pronostic	corrélation	patients	Ref
Sein	Agressifs	Mauvais	/	163	Thompson H, 2003 Luo RZ, 2013
Cerveau (Gliomes)	Agressifs	Mauvais	↑migration invasion	467	Galavotti S, 2012
Foie	Stade II	Mauvais	↑survie	102	Inami Y, 2011 Takamura A, 2011
Rein	/	/	/	3	Parkhitko A, 2011
Prostate	tous	/	/	45	Kitamura H, 2006
Poumon (NSCLC)	Agressifs	Mauvais	↑migration invasion	109	Inoue D, 2012 ; Duran A, 2008



Tissu sain Cancer du sein

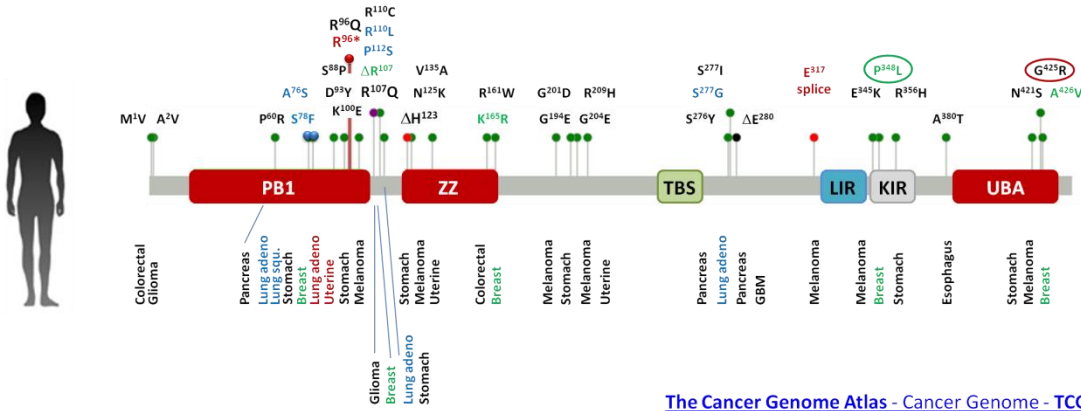
Luo RZ et al, Onco Targets Ther 2013

b) Amplification et surexpression du messager



The Cancer Genome Atlas - Cancer Genome - TCGA

c) 46 mutations



The Cancer Genome Atlas - Cancer Genome - TCGA

d) Modèles murins



Génotype	SQSTM1	Tissu	tumeur	Signalisation	Rèf
KrasG12D	KO	poumon	Pas de Tumeur	↑@ JNK ↓NFκB	Duran A et al, 2008
KrasG12D	shRNA	Xénogreffe, poumon, pancréas	↓taille	↓NFκB	Ling J et al, 2012
TSC2 ^{-/-}	shRNA	Xénogreffe p53 ^{-/-}	↓taille	↓@ERK ↓NFκB	Parkhitko A et al, 2011
AGT7 ^{-/-}	KO	foie	↓taille	/	Takamura A et al, 2011
ATG5 ^{-/-}	Surexpression	Xénogreffe	↑taille	↓NFκB	Mathew R et al, 2009

Figure 3. SQSTM1 et développement tumoral

Ces derniers mois, le projet «Cancer Genome Atlas» a mis au jour une cinquantaine de mutations de SQSTM1 dans les cancers du poumon, du sein, du pancréas, des mélanomes, et des gliomes. De façon intéressante, deux de ces mutations (P348L, et G425R) qui bloque la liaison de SQSTM1 aux protéines ubiquitinées et touche le domaine de liaison à

KEAP1 (KIR) sont communes aux mélanomes, aux cancers du sein et aux maladies de Paget et de Charcot. Il serait important maintenant de connaître les conséquences de ces mutations sur la fonction de SQSTM1, et leur importance dans l'agressivité tumorale (**Figure 3c**).

In vitro, SQSTM1 peut promouvoir la survie (Duran et al., 2008; Ling et al., 2012; Mathew et al., 2009), la prolifération (Chen et al., 2013; Inami et al., 2011), la migration (Galavotti et al., 2013) et potentiellement le métabolisme tumoral (Guo et al., 2011; Rodriguez et al., 2006). Par toutes ses propriétés, SQSTM1 est un acteur "oncogénique". De plus son intérêt clinique est indéniable car il est non seulement un facteur de mauvais pronostic mais aussi une cible thérapeutique anti-tumorale prometteuse contre les cancers Kras ; cancers les plus agressifs (pancréas, poumon etc...) et pour lesquels il n'y a pas de traitements efficaces.

Dans la suite de cet exposé, nous détaillerons au niveau moléculaire comment la surexpression de SQSTM1 en perturbant des voies de signalisation affecte le développement tumoral. Et de ce fait comment SQSTM1 est maintenu à un niveau faible dans les cellules saines par un processus prépondérant, la dégradation autophagique.

B. Fonctions moléculaires de SQSTM1 dans la tumorigénèse

Comme nous l'avons vu précédemment, l'implication de SQSTM1 dans la tumorigénèse est indéniable, à la fois en tant que marqueur de mauvais pronostic mais également acteur "pro-oncogénique". Ceci peut s'expliquer par le fait que SQSTM1 a été clairement défini comme une plateforme (scaffold protein) qui peut lier jusqu'à 20 molécules de signalisation. Au sein de SQSTM1, 7 domaines de liaison ont été identifiés grâce à des bases de données SMART et Blast, puis vérifiés par double hybride, mutagenèse dirigée et co-immunoprécipitation avec des protéines recombinantes étiquetées.

La liste des domaines et des partenaires de SQSTM1 est représentée dans la **Figure 4** et les tableaux suivants (**Tableaux 5** et **Tableau 6**).

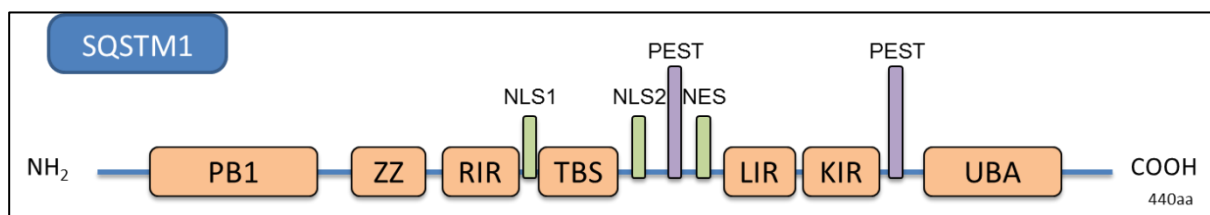


Figure 4. Domaines de SQSTM1

Domaine	Acronyme	Position	rèf
PB1	Phox and Bem1	1–104 aa	(Ito et al., 2001)
ZZ	Zinc finger	128–163 aa	(Sanz et al., 2000)
"RIR"	"Raptor Interacting Region"		(Duran et al.)
TBS	Traf6 Biding Site	217–266 aa	(Sanz et al., 2000)
LIR	Lc3 Interacting Region	321–342 aa	(Pankiv and et al., 2007)
KIR	Keap1 Interacting Region	346–359 aa	(Komatsu et al.)
UBA	Ub-Associated	386–434 aa	(Geetha and Wooten, 2002)
NLS 1 et 2	Nuclear Localisation Signal	186–189 et 247–287 aa	(Pankiv et al., 2010)
NES	Nuclear Export Signal	303–320 aa	
PEST	Séquence riche en Proline, acide glutamique, sérine et thréonine	266–294 et 345–377 aa	(Geetha and Wooten, 2002)

Tableau 5. Domaines de SQSTM1 et leurs séquences

Partenaires	Domaine d'interaction	Interaction constitutive/induite	Type cellulaire	Intérêts	Références
p56 lck	PB1 (80 aa)	Constitutif <i>via</i> surexpression	HeLa	Activation Lympho T	(Park et al., 1995)
MEKK3		Constitutif <i>via</i> surexpression	HEK 293	Activation NFκB <i>via</i> TRAF6	(Nakamura et al., 2010)
MEK5 (PB1 Type I)		Constitutif mais <i>via</i> p62-GST : surexpression	HEK 293	Croissance cellulaire, survie et différenciation	(Lamark et al., 2003)
ERK1		Constitutif <i>via</i> surexpression	HEK 293	Modulation adipogénèse et obésité	(Lee et al., 2010)
αPKC (PB1 Type I/II)		Constitutif <i>via</i> surexpression	HEK 293	polarisation cellulaire et NFκB	(Lamark et al., 2003)
NBR1 (PB1 Type I)		Constitutif <i>via</i> plasmide NBR1-Myc : surexpression	HEK 293	autophagie sélective	(Lamark et al., 2003)
Rpt1		Induction NGF, et surexpression	HEK 293	NFκB	(Geetha et al., 2008)
CYLD		Induction RANKL en endogène	293T	Inhibition/régulation de l'ubiquitination de TRAF6	(Jin et al., 2008)
Par-4		Constitutif <i>via</i> surexpression	HeLa	apoptose et NFκB	(Chang et al., 2002)
KEAP1	KIR	Constitutif <i>via</i> surexpression	HEK 293	stress oxydant NRF2	(Komatsu et al., 2010)
P38	NPI	Constitutif <i>via</i> surexpression	HeLa et Cos-7	réponse au stress	(Diradourian et al., 2008 ; Kawai et al., 2008 ; Qiang et al., 2013)
	?	Induit (UVB + KO Atg5), forme endogène	MEF		
Raptor RagC et RagD	"RIR"	Constitutif <i>via</i> surexpression	NIH 3T3 et HEK 293	mTOR	(Duran et al., 2011)
Caspase8	UBA - polyUb			Apoptose	(Jin et al., 2008; Zhang et al., 2013)
RIP	ZZ	Constitutif <i>via</i> surexpression	HEK 293	NFκB	(Sanz et al., 2000)
LC3	LIR	Constitutif <i>via</i> surexpression	HeLa	autophagie sélective	(Pankiv and et al., 2007)
Ubiquitine	UBA	constitutif	HeLa	autophagie sélective	(Vadlamudi et al., 1996)
TrkA		Induction NGF, et surexpression	HEK 293	NFκB	(Wooten et al., 2008)
TRAF6	TB	Constitutif <i>via</i> surexpression	HEK 293	NFκB	(Sanz et al., 2000)
PPARα		Constitutif <i>via</i> surexpression	Cos-7	métabolisme cellulaire et inflammation	(Diradourian et al., 2008)

Tableau 6. Partenaires de SQSTM1

1. Réponse au stress, NFκB et survie cellulaire

Jusqu'à aujourd'hui, les effets pro-oncogéniques de SQSTM1 sont en grande partie attribués dans la littérature à son importance dans la voie de signalisation NFκB. En effet, ce facteur de transcription est impliqué dans l'expression de nombreux gènes cellulaires associés aux réponses inflammatoires, à la prolifération, la survie cellulaires ou encore à l'oncogénèse. Ces trois dernières années vient de se rajouter le contrôle de la réponse anti-oxydante KEAP1-NRF2 par SQSTM1. De ce fait, il semblerait que la fonction majeure de SQSTM1 dans la tumorigénèse soit la prévention du stress et la promotion de la survie. Ainsi nous allons détailler son rôle au sein de ces deux voies. A cela nous pouvons rajouter l'interaction entre SQSTM1 et MEK5 (Lamark et al., 2003), qui pourrait en aval moduler ERK5 qui confère une résistance aux chimiothérapies ainsi qu'aux signaux pro-apoptotiques (Drew et al., 2012).

1. SQSTM1 et activation de la voie NFκB

En réponse à des facteurs de croissance (NGF (Wooten et al., 2001)), des cytokines inflammatoires (RANK-L, (Duran et al., 2004) et l'IL-1 (Sanz et al., 2000)), ou des oncogènes (KrasG12D, (Ling et al., 2012)), SQSTM1 joue un rôle crucial dans l'activation de la voie NFκB.

Après activation, SQSTM1 fait en effet partie des premières protéines recrutées au niveau du domaine cytoplasmique du récepteur. Cette interaction fournit un point d'ancrage pour une ubiquitine ligase TRAF6 (TNF Related Associated Factor 6) et autres ser/thr kinases clés à l'activation des IKKs telles que RIP (Receptor Interacting Protein), MEKK3 et PKC atypiques. De cette manière, SQSTM1 favorise par son oligomérisation l'activation de TRAF6. TRAF6 une fois activée permet le recrutement des IKKs, dont les deux sous-unités IKKα et IKKβ sont alors activées par phosphorylation par une des kinases RIP, MEKK3 et aPKC présentes également sur SQSTM1. IKK à son tour phosphoryle et entraîne la dégradation des protéines inhibitrices de la famille IκB par le protéasome. Ces événements conduisent à la libération de NFκB qui est alors capable de transloquer dans le noyau pour activer ces gènes cibles (**Figure 5**).

Soulignons que SQSTM1 lie *via* son domaine PB1 les kinases PKC atypiques (aPKC) (Moscat et al., 2009), et MEKK3 (Nakamura et al., 2010), RIP *via* son domaine ZZ (Sanz et al., 2000), et l'ubiquitine ligase TRAF6 *via* son domaine TBS (Duran et al., 2004).

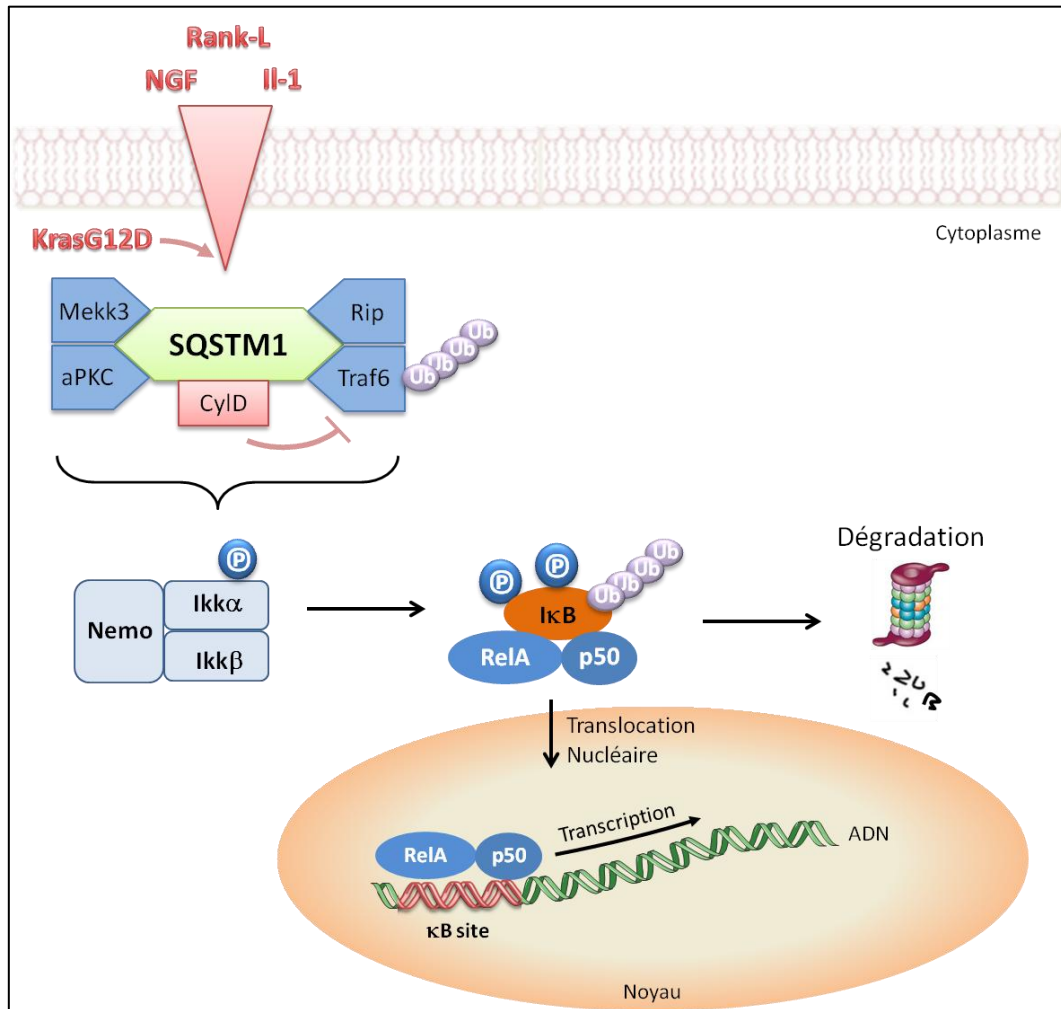


Figure 5. Rôle de SQSTM1 dans la voie de signalisation NFκB

La littérature de SQSTM1 s'est focalisée sur son rôle dans la voie NFκB, car plusieurs arguments soulignent l'importance de cette voie dans le développement tumoral : notamment dans le cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC).

- Une activation aberrante de ce facteur de transcription joue un rôle critique dans le développement d'une inflammation exacerbée et la progression tumorale.
- La surexpression de TRAF6 est notamment nécessaire et suffisante au caractère transformé des cellules (croissance indépendante de l'ancrage, et formation de tumeurs) (Starczynowski et al., 2011).

- Ou la surexpression de SQSTM1 est absolument requise à l'activation de la voie NFκB ainsi qu'à la tumorigénèse induite par Kras (Duran et al., 2008).
- Fait marquant, SQSTM1 occupe une position clé car il est essentiel à l'activation de TRAF6 mais également à son inhibition puisqu'il lie de manière constitutive la déubiquitinase CYLD. Ceci assure l'activation de la voie NFκB qu'en présence du ligand (Jin et al., 2008).
- De façon intéressante, NFκB induit l'expression de SQSTM1 formant une boucle de rétrocontrôle positive (page 37, **Figure 14**) (Duran et al., 2008 ; Ling et al., 2012)

2. Contrôle du stress oxydatif par SQSTM1 : KEAP1-NRF2

NRF2 est un facteur de transcription constitutivement ubiquitiné par l'ubiquitine ligase E3 KEAP1 et rapidement dégradé par le protéasome (Itoh et al., 1999) (**Figure 6**). En réponse à un stress oxydatif, KEAP1 est inactivé, conduisant à la stabilisation de NRF2, qui peut alors transloquer dans le noyau et induire une réponse anti-oxydante (GSTA4, GSTM1, CYP2A5, HMOX1, NQO1, MRP4, HO-1) avec SQSTM1 comme cible. Suite à cette augmentation, SQSTM1 entre en compétition avec KEAP1 *via* son domaine KIR (KEAP Interacting Region), dissociant le complexe KEAP1-NRF2, amplifiant l'activation et la translocation nucléaire de NRF2 (Jain et al., 2010; Komatsu et al., 2010) (**Figure 6**).

Par transgénèse, il a été démontré que l'accumulation de SQSTM1 est indispensable à l'induction de cette réponse anti-oxydante (Inami et al., 2011; Komatsu et al., 2010; Takamura et al., 2011). Ce processus contribue à l'induction d'une boucle de rétrocontrôle positive dans laquelle SQSTM1 et NRF2 s'auto-induisent (Jain et al., 2010) (**Figure 6**). Le retour à la normale dès lors que le stress oxydatif s'arrête repose sur la dégradation autophagique de SQSTM1 qui revient à un niveau basal. KEAP1 peut alors à nouveau se réassocier à NRF2 entraînant sa dégradation.

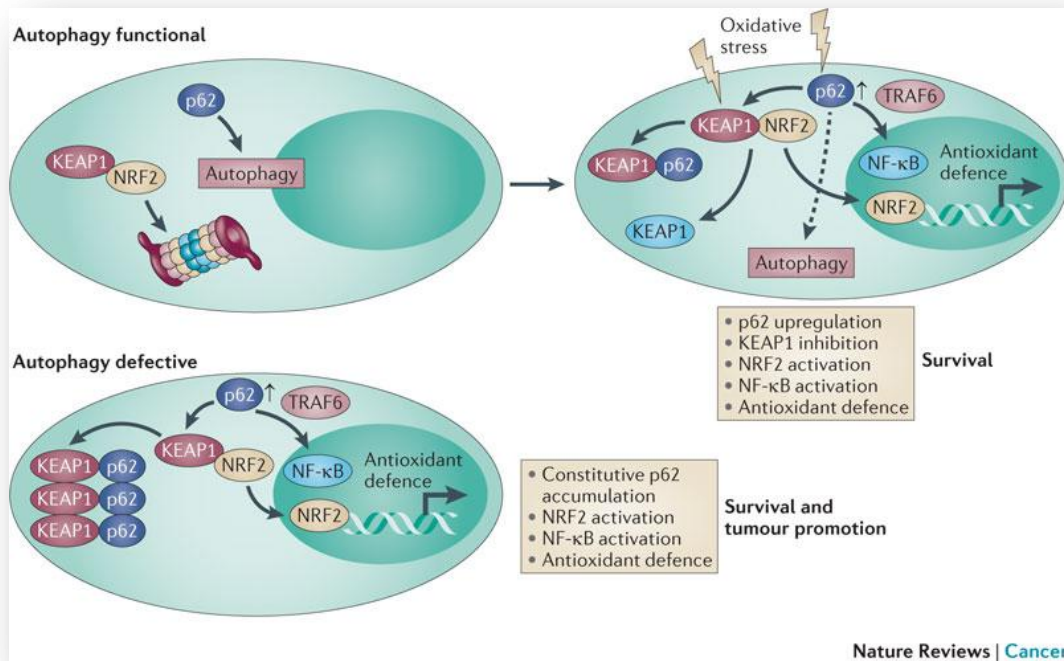


Figure 6. Relation entre SQSTM1 et KEAP1-NRF2 (White, 2012)

Très récemment l'équipe de Komatsu a démontré que l'interaction entre SQSTM1 et KEAP1 est régulée par phosphorylation (Ichimura et al., 2013). mTOR en réponse à des nutriments, est capable de phosphoryler SQSTM1 sur la sérine 351 (S351) au niveau du domaine KIR ; ce qui augmente son affinité pour KEAP1 libérant NRF2 suivi de la dégradation du complexe SQSTM1-KEAP1 par l'autophagie sélective (Ichimura et al., 2013).

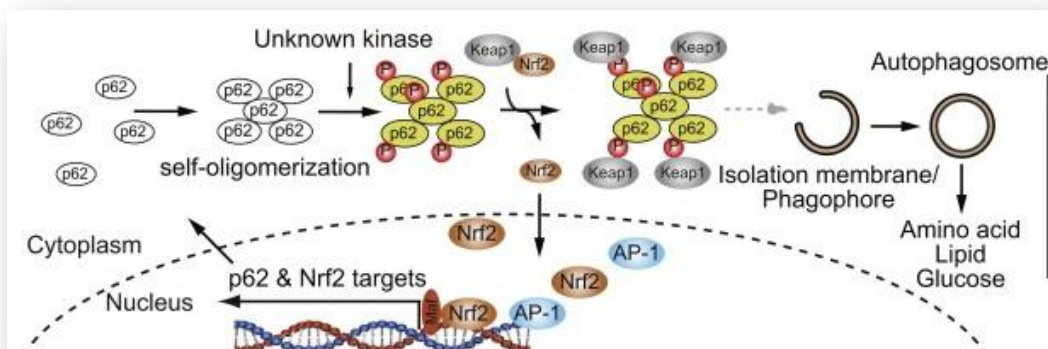


Figure 7. Phosphorylation de SQSTM1 dans la réponse au stress oxydatif (Ichimura et al., 2013)

Cette démonstration élégante de Komatsu et al, souligne le rôle intégratif de SQSTM1 associant une autophagie sélective au déclenchement d'une réponse anti-oxydante offrant un avantage sélectif indispensable à la prolifération des hépatocarcinomes (Ichimura et al.,

2013). Pour preuve, 25% des hépatocarcinomes humains présentent des agrégats positifs pour SQSTM1-KEAP1 ainsi qu'une activation des cibles de NRF2 (Inami et al., 2011),

Néanmoins, nous pouvons nous interroger sur la fonction pro-tumorale de NRF2, dès lors qu'il est surexprimé, suite à l'expression d'oncogènes (Braf, Kras et Myc), ou à la présence de mutations de NRF2 ou de KEAP1 ; comme cela a pu être observé dans les cancers du poumon, de la prostate, et du foie (DeNicola et al., 2011 ; Okawa et al., 2006; Shelton and Jaiswal, 2013 ; Shibata et al., 2008; Singh et al., 2008). NRF2 est en fait un suppresseur de tumeur reconnu qui induit une réponse anti-oxydante et des enzymes de désintoxication de phase II qui neutralisent les intermédiaires hautement réactifs des carcinogènes. Les souris déficientes en NRF2 sont plus sensibles aux carcinogènes (Ramos-Gomez et al., 2001), présentent des dommages à l'ADN (Aoki et al., 2001), et fournissent un micro-environnement inflammatoire propice à la promotion de métastases de cancers du poumon (Sato et al., 2010).

Compte tenu de la boucle d'amplification NRF2 SQSTM1 s'induisant l'un l'autre, il serait intéressant maintenant de déterminer si NRF2 serait pro-oncogénique parce qu'il induirait SQSTM1. A l'appui, un défaut d'expression de SQSTM1 a été rapporté dans des hépatocytes doublement déficients en autophagie et en NRF2 (Inami et al., 2011; Takamura et al., 2011). Il serait également intéressant de déterminer si la dégradation de KEAP1 dépendante de SQSTM1 n'active pas en plus de NRF2, d'autres voies oncogéniques, comme le suggère l'activation de la voie NF κ B (Lee et al., 2009).

3. SQSTM1 et activation de P38

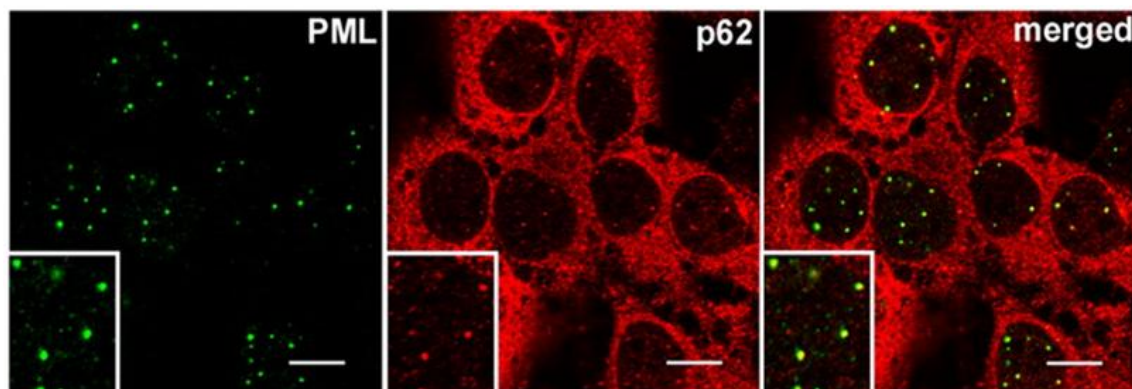
En plus de NF κ B et NRF2, SQSTM1 est également essentielle à l'activation de la kinase P38: l'inactivation de SQSTM1 bloque en effet l'activation de P38 en réponse à des cytokines (Kawai et al., 2008), à l'isoproterenol (Muller et al., 2013), à l'anisomycine (Diradourian et al., 2008) ou aux UVB (Qiang et al., 2013) (*in vitro*, siRNA et modèles murins *Sqstm1*^{-/-}). Trois domaines de liaison de SQSTM1 à P38 ont été mis en évidence : NPI (N-terminal P38 interaction, 173-182 aa), CPI (C-terminal P38 interaction; 335-344 aa) et Le domaine TB (TRAF6 binding site) (Diradourian et al., 2008; Kawai et al., 2008 ; Saito et al., 2008; Sudo et al., 2000).

Selon le type cellulaire et l'effecteur, l'effet de SQSTM1 sur P38 va induire des réponses différentes. En effet, dans les adipocytes et à travers la voie P38/PGC1 α , SQSTM1 régule l'intégrité structurale et fonctionnelle des mitochondries (Muller et al., 2013). Suite à l'anisomycine, SQSTM1 va permettre à p38 de phosphoryler et d'inhiber l'activité transcriptionnelle de PPAR α (COS-7 et hépatocarcinomes H4IIE (Diradourian et al., 2008). Alors qu'en réponse à un stress génotoxique UVB (MEF et mélanomes), l'accumulation de SQSTM1 active la voie p38 et induit l'apoptose *via* la caspase8 (Qiang et al., 2013 ; Turchi et al., 2008; Van Laethem et al., 2004).

2. Fonctions nucléaires de SQSTM1

Outre la prévention du stress oxydatif, qui pourrait à terme induire une instabilité génomique, plusieurs arguments suggèrent que SQSTM1 pourrait être impliquée dans le maintien de l'intégrité nucléaire.

- Il a été rapporté que SQSTM1 peut transloquer dans le noyau sous l'effet de l'anisomycine (Diradourian et al., 2008). Il est également présent au sein d'agrégats nucléaires (riches en PML, "promyelocytic leukemia protein", colocalisation visualisée par des points jaunes dans la figure ci-dessous) notamment dans certaines maladies dégénératives (Pankiv et al., 2010; Pikkarainen et al., 2008; Pikkarainen et al., 2011).



- L'équipe de Johansen T et al. a mis en évidence dans la séquence de SQSTM1 deux séquences d'import (NSL1 et NSL2) et une séquence d'export nucléaire (NES) (Pankiv et al., 2010). Le transfert de SQSTM1 entre le noyau et le cytoplasme semble continu, et extrêmement rapide. Il est régulé positivement par la phosphorylation de SQSTM1 par une kinase inconnue sur la sérine 272 (S272) et la thréonine 269 (T269), et négativement

via sa phosphorylation sur la S266, toutes trois à proximité de son site NLS2 (Pankiv et al., 2010).

- L'équipe de Moscat et al. a ensuite montré que la phosphorylation de ces deux sites (S272 et T269) est médiée par la kinase CDK1 en début de mitose, et serait indispensable pour le maintien d'un niveau approprié de cycline B1 permettant une entrée et sortie correcte des cellules en mitose (Linares et al., 2011) (**Tableau7**).

site	domaine	kinase	effet	rèf
T269	NLS2	CDK1	↑ translocation noyau	(Linares et al., 2011; Pankiv et al., 2010)
S272	NLS2	CDK1	↑ translocation noyau	(Linares et al., 2011; Pankiv et al., 2010)
S266	NLS2	?	↓ translocation noyau	(Pankiv et al., 2010)

Tableau 7. Régulation de la translocation de SQSTM1 par phosphorylation

Ainsi, la translocation de SQSTM1 laisse présager de nouvelles fonctions nucléaires, encore peu définies. Les premières observations suggèrent que SQSTM1 pourrait réguler l'activité de facteurs de transcription (PPARA, suite à l'anisomycine, (Diradourian et al., 2008), ou le recrutement de protéines ubiquitinées (mutant d'ataxine1) aux corps nucléaires riches en PML, et leur dégradation probable par le protéasome localisé à proximité (siRNA et MEF SQSTM1-/-, (Pankiv et al., 2010). Ceci pourrait assurer le bon maintien de plusieurs fonctions nucléaires régulées par les corps PML ; incluant la transcription et la réplication de l'ADN.

A ce stade, il serait intéressant de savoir si SQSTM1 pourrait dans le noyau comme il le fait dans le cytosol, être un senseur du stress protéotoxique, et faire intervenir un processus autophagique. A l'appui de cette hypothèse, l'équipe de Kroemer G et al, a rapporté la dégradation autophagique sélective des micronuclei, qualifié de micronucléophagie, avec notamment la colocalisation de SQSTM1 (Rello-Varona et al., 2012).

3. SQSTM1, mTOR et prolifération cellulaire

Un autre exemple important en faveur du rôle de SQSTM1 dans la tumorigénèse repose sur l'importance de SQSTM1 dans l'activation de mTORC1 (mammalian target of rapamycin) ; une sérine thréonine kinase qui favorise la croissance cellulaire et qui est très fréquemment activée dans les cancers (Duran et al., 2011). L'équipe de Diaz-Meco et al, a en effet mis en évidence qu'en réponse aux acides aminés, SQSTM1 se lie aux petites GTPases RagC and RagD, favorise par son oligomérisation la formation de l'hétérodimère actif RagB^{GTP}/RagC^{GDP} qui permet la translocation du complexe mTORC1 au niveau de la membrane externe lysosomale, qu'il stabilise grâce à sa liaison à Raptor. La région de SQSTM1 responsable de l'interaction avec Raptor a été identifiée entre les domaines ZZ et TBS (Duran et al., 2011).

Dans un deuxième temps, la même équipe a mis en évidence que l'activation de mTOR est dépendante de sa polyubiquitination sur la K⁷⁷⁷/K⁷⁸²/K⁷⁸⁴ par TRAF6, une K63 ubiquitine ligase (mutant de mTOR A⁷⁷⁷A⁷⁸²A⁷⁸⁴, mutant K⁶³R d'ubiquitine, ShRNA TRAF6) qui est elle-même recrutée à la membrane des lysosomes *via* SQSTM1 en réponse aux acides aminés. Il est important de souligner que mTOR n'est pas ubiquitinée en réponse à l'insuline ou à d'autres facteurs de croissance sériques. Ainsi, SQSTM1 serait un membre à part entière du complexe mTORC1 en tant que senseur spécifique des nutriments (Linares et al., 2013) (**Figure 8**).

De façon très élégante, les auteurs ont montré grâce à l'emploi du mutant mTOR AAA, de cellules invalidées pour TRAF6 ou de peptides neutralisants l'importance de cette voie SQSTM1/TRAF6/mTOR dans la prolifération des cellules HEK, des cellules transformées par l'oncogène Kras V12 ou des lignées tumorales A549 et CaP2 (Linares et al., 2013).

A l'instar de NFκB et de NRF2, il est important de souligner que l'action de SQSTM1 sur mTORC1 forme une boucle de rétro contrôle positive conduisant à l'accumulation de SQSTM1 *via* l'inhibition de l'autophagie (Nazio et al., 2013).

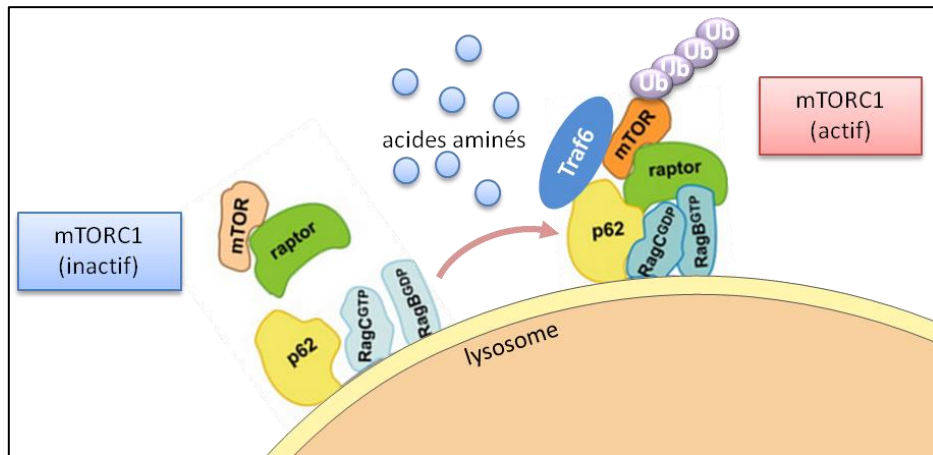


Figure 8. Régulation de l'activation de mTOR par SQSTM1 (Linares et al., 2013)

4. SQSTM1, oligomérisation et signalisation

Pour une communication cellulaire efficace, les avantages de SQSTM1 en signalisation sont multiples, à savoir :

- Elle permet tout d'abord par son oligomérisation d'atteindre le seuil requis à l'activation des molécules de signalisation.
- Elle offre une plateforme qui relie les kinases à leurs substrats. Ceci assure l'intégration de nombreuses voies de signalisation et ainsi l'exécution d'une réponse cellulaire appropriée.
- SQSTM1 permet également de séquestrer, d'inactiver et d'adresser des inhibiteurs à la dégradation autophagique (détaillé plus tard).

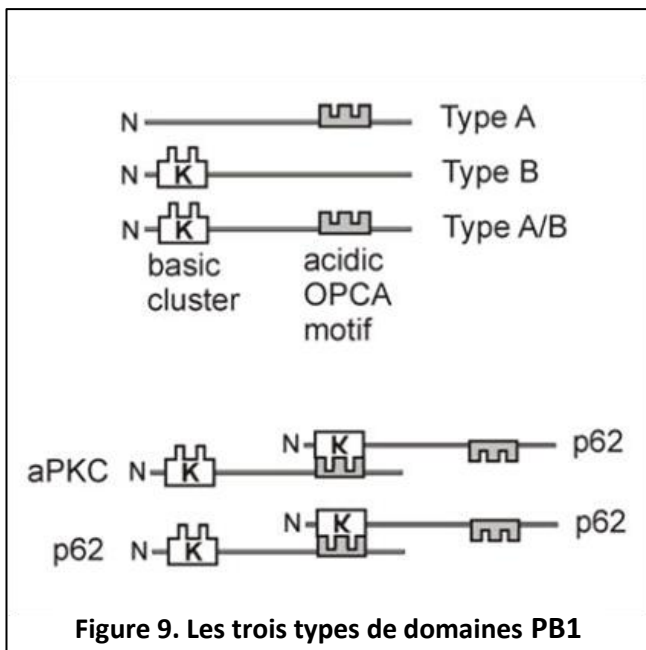
A l'évidence, cette oligomérisation de SQSTM1 va influencer positivement ou négativement sur l'activité de ses partenaires telles que TRAF6 pour la voie NFκB, ERK1 pour l'adipogénèse, aPKC pour la polarité apico-basale, KEAP1 pour la réponse anti-oxydative, PHD3 pour la sensibilité à l'oxygène etc...

1. Le domaine d'oligomérisation PB1:

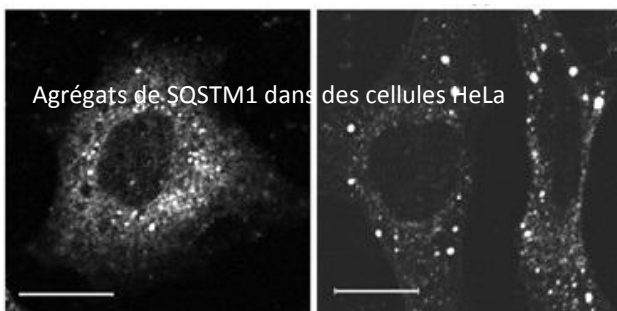
Il est responsable de l'oligomérisation de SQSTM1, ainsi que son interaction avec 29 autres protéines de signalisation qui présentent également ce domaine PB1 (PAR-6, aPKC, MEKK2, MEKK3, MEK5 et NBR1 (Lamark et al., 2003, Wilson, 2003 #471)), formant des hétérodimères (Seibenhener et al., 2007). Le domaine PB1 comprend ~80 acides aminés possédant une conformation de type ubiquitine et est groupé en trois types : le type I (ou A),

le type II (ou B) et le type I/II (ou AB) (Lamark et al., 2003; Moscat et al., 2006; Moscat et al., 2009; Seibenhener et al., 2007; Sumimoto et al., 2007) :

- Le type I contient le motif acide dénommé OPCA (ensemble des motifs OPR, Phox-Cdc et du Domaine d'Interaction à la protéine kinase C Atypique) (Ponting et al., 2002).
- Le type II contient le cluster basique.
- Le type I/II contient à la fois le motif OPCA et le cluster basique.



Les interactions entre les domaines PB1 sont électrostatiques (Lamark et al., 2003) : les lysines du cluster basique interagissent avec le motif acide OPCA. Dans cette configuration, SQSTM1 et aPKC peuvent interagir librement entre elles ainsi qu'avec les domaines PB1 d'autres protéines. Sur ce même principe, l'oligomérisation de SQSTM1 repose sur la liaison entre le cluster basique d'une première protéine SQSTM1 et le motif OPCA d'une deuxième protéine SQSTM1 (Wilson et al., 2003) (Figure 9).



Ainsi grâce à ce domaine PB1, SQSTM1 forme des agrégats. Alors que SQSTM1 présente un marquage diffus quasiment indétectable dans les cellules saines, il est détecté de manière récurrente sous formes d'agrégats protéiques dans des cellules tumorales. Ces agrégats sont de taille variable et peuvent atteindre entre 0,1 et 2µm de diamètre

(Bjorkoy et al., 2005).

2. Le domaine de liaison à l'ubiquitine (UBA) de SQSTM1

occupe une place prépondérante dans la formation de plateformes de signalisation ainsi que la dégradation sélective de ces plateformes par l'autophagie. Il a été initialement identifié par des analyses bio-informatiques, au sein de plusieurs protéines impliquées dans

l'adressage de protéines ubiquitinées au protéasome (Hofmann and Bucher, 1996). Ce domaine situé en région C-terminale de SQSTM1, est composé d'une séquence de 45 AA très conservée, et dont la structure compacte de trois hélices expose des motifs hydrophobes qui interagissent avec des substrats ubiquitinés (Bertolaet et al., 2001; Dieckmann et al., 1998; Vadlamudi et al., 1996).

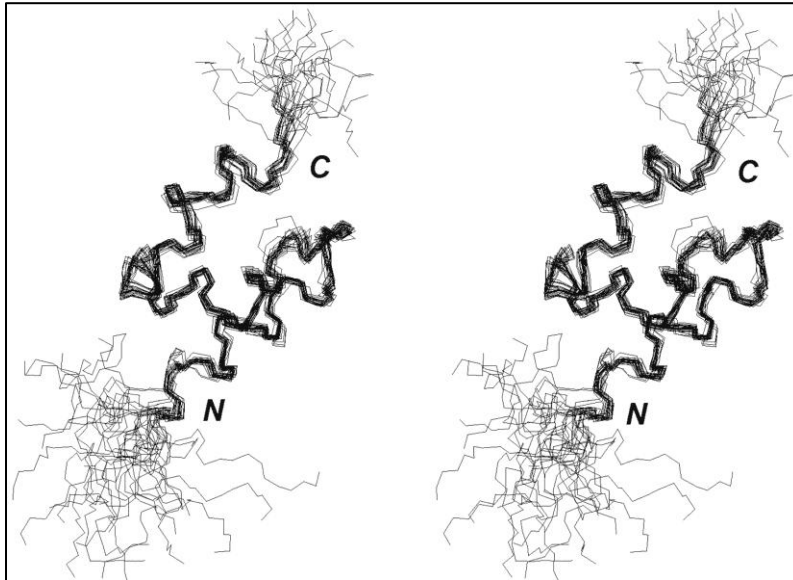


Figure 10. Structure 3D du domaine UBA de SQSTM1 (Ciani et al., 2003)

Dans la plupart des cas, les domaines UBA sont plus enclins à lier des chaînes de poly-ubiquitine (Poly-Ub) plutôt que de mono-ubiquitine (Ub) (Chen et al., 2001b; Wilkinson et al., 2001). Les protéines peuvent être étiquetées par une ubiquitine, plusieurs ubiquitines ou une chaîne de poly-ubiquitine; l'ubiquitine pouvant elle-même être ubiquitinée sur ses 7 résidus lysines (Sun and Chen, 2004). Ces types d'étiquette déterminent le destin de la protéine puisque:

- la liaison d'une seule ubiquitine n'est pas associée à la dégradation, mais à l'endocytose du substrat.
- la liaison d'une chaîne de quatre ubiquitines reliées entre elles au niveau de la lysine K48 (Poly-Ub K48) adresse ce substrat au protéasome pour y être dégradé.
- Par opposition, la conjugaison des protéines à une chaîne d'Ub reliées au niveau de la lysine 63 (Poly-Ub K63), favorise la formation de plateformes de signalisation, et n'adresse pas ces protéines au protéasome mais à l'autophagie (Kerscher et al., 2006; Peng et al., 2003).

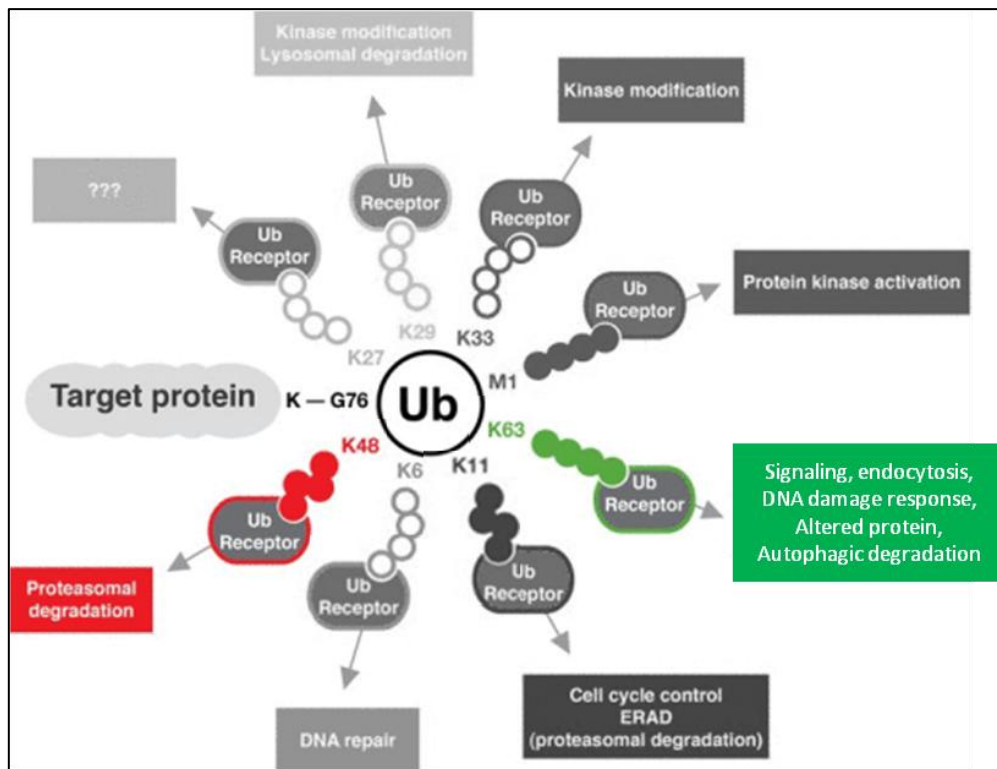


Figure 11. Différents types de chaînes de polyubiquitination sur lysine, et fonctions cellulaires associées

L'équipe de Seibenhener et al, a déterminé grâce à des expériences de pull down *in vitro* que le domaine UBA de SQSTM1 se lie à la fois aux chaînes de poly-Ub K48 et K63 (Seibenhener et al., 2007). Cependant, ces résultats *in vitro* sont controversés dans la mesure où la majorité des études *in vivo* ont depuis démontré une liaison préférentielle avec les chaînes de poly-Ub K63 (Lamark and Johansen, 2012; Long et al., 2008; Matsumoto et al., 2011; Raasi et al., 2005; Wooten et al., 2008). Remarquons qu'*in vivo* SQSTM1 régule spécifiquement l'extension des chaînes de poly-Ub K63 de ses substrats *via* son interaction avec l'ubiquitine ligase TRAF6 (Wooten et al., 2005), se lie à ces chaînes de poly-Ub K63 et les adressent à la dégradation autophagique (Olzmann and Chin, 2008) ainsi qu'à des plateformes de signalisation (Mukhopadhyay and Riezman, 2007; Sun and Chen, 2004), ce qui est en accord avec le rôle scaffold de SQSTM1.

3. Caspase8 : Exemple d'activation

SQSTM1 constituant l'interface labile entre les stress cellulaires et les voies de survie, il n'est pas surprenant qu'elle puisse réguler l'apoptose et la nécrose. En effet, l'accumulation de SQSTM1 médie l'oligomérisation et l'activation de la caspase8 en réponse à divers stress, comme TRAIL, l'augmentation de la concentration intracellulaire du calcium,

le stress du réticulum endoplasmique, l'inhibition du protéasome ou de la sphingosine kinase SKI-1, et HAMLET (Kovacs et al., 2012; Pan et al., 2013; Pan et al., 2011; Young et al., 2012; Zhang et al., 2013). L'interaction entre SQSTM1 et la caspase8 s'établie *via* la polyubiquitination de la caspase8 par l'ubiquitine ligase CUL3/RBX1 (chaines poly-Ub K63) et le domaine UBA de SQSTM1. Elle induit la mort par apoptose (Jin et al., 2009).

Il est important de souligner que cette activation de la caspase8 par la surexpression de SQSTM1 s'observe systématiquement en réponse à un défaut autophagique ; situation que l'on rencontre fréquemment dans les cancers. D'autre part, cette activation de la caspase8 par SQSTM1 est indépendante des récepteurs de mort, mais nécessite un stress. Elle constitue de ce fait une stratégie prometteuse pour éradiquer des cellules tumorales résistantes aux chimiothérapies.

Une question importante qui reste inexplorée, est : au lieu d'être pro-apoptotique, est-ce que dans les cellules tumorales où il y a accumulation massive de SQSTM1, cette activation de la caspase8 pourrait avoir des fonctions pro-tumorales ? En effet, durant l'embryogénèse, l'activation de la caspase8 induit principalement la survie en clivant CYLD et en activant ainsi la voie NFκB inhibant la nécrose et l'apoptose; une fonction qui pourrait être régulée dans les cellules souches tumorales (O'Donnell et al., 2011).

Dans le même ordre d'idée, est-ce que cette interaction entre SQSTM1 et la caspase8 n'induirait pas sa dégradation autophagique, retardant le déclenchement de l'apoptose ? Hypothèse qui n'a été qu'à peine évoquée. Il est intéressant de remarquer que d'une part, que la Caspase8 et CYLD interagissent avec SQSTM1, et que d'autre part que SQSTM1 interagit également avec KEAP1, une sous unité de l'ubiquitine ligase CUL3/RBX1 (Zhang et al., 2004). Ainsi, SQSTM1 en induisant la dégradation de KEAP1 pourrait également induire celle de tout le complexe KEAP1/CUL3/RBX1, retardant l'activation de la caspase8 et le déclenchement de l'apoptose. Par ailleurs, les membranes autophagosomales servent de plateformes indispensables à la réticulation du complexe Caspase8/SQSTM1 (siRNA LC3, ATG5, ATG3) (Pan et al., 2013; Pan et al., 2011; Young et al., 2012). De cette manière, il est très probable que la résultante entre la survie et l'apoptose induite par ce complexe SQSTM1/Caspase8 dépend de la quantité finale de SQSTM1 et donc par corrélation de la fonctionnalité du processus autophagique.

4. Exemple d'inactivation

A contrario, SQSTM1 en trappant spécifiquement certaines molécules de signalisation peut aussi bloquer leurs activités, comme le souligne son appellation sequestosome. C'est le cas de la kinase ERK1, dont la régulation par SQSTM1 est telle, que la délétion de SQSTM1 dans un modèle murin conduit à un phénotype d'obésité (Lee et al., 2010). Il en est de même avec l'ubiquitine ligase E3 KEAP1, dont l'interaction directe avec SQSTM1 l'empêche d'ubiquitiner NRF2 et de l'adresser à la dégradation autophagique (Komatsu et al., 2010). Ou encore avec la séquestration de la phosphodiesterase 4a (PDE4A), qui ne peut plus probablement hydrolyser le messenger secondaire AMPc et ainsi moduler les nombreuses voies en aval (Christian et al., 2010). Enfin, SQSTM1 réprime en condition normoxique l'activité de la prolyl hydroxylase PHD3 en la séquestrant dans des agrégats et en l'adressant à la dégradation, ceci détermine les niveaux de PHD3 et en conséquence ceux d'HIF1- α (Rantanen et al., 2013).

5. Régulation de l'oligomérisation de SQSTM1 par phosphorylation

A l'heure actuelle, la régulation en amont de SQSTM1 quant à sa formation de plateforme oligomérique propice à la signalisation comme à la dégradation autophagique, reste évasive. Il est très probable que le niveau de SQSTM1 ainsi que sa phosphorylation au niveau de ses domaines régissent son interaction vis-à-vis de ses différents partenaires, comme l'attestent plusieurs études récentes **Tableau 8**:

- Phosphorylation (Ⓢ) de la sérine 403 du domaine UBA par TBK1 et/ou CK2 augmente son affinité pour les chaînes de poly-ubiquitine (Matsumoto et al., 2011).
- Ⓢ de la sérine 351 du domaine KIR par mTOR augmente son affinité pour KEAP1 (Ichimura et al., 2013).

site	domaine	kinase	effet	rèf
S403	UBA	TBK1/CK2	↑affinité chaînes poly Ub	(Matsumoto et al., 2011)
S351	KIR	Signalisation mTOR	↑affinité KEAP1	(Ichimura et al., 2013)

Tableau 8. Régulation de l'affinité de SQSTM1 par ses phosphorylations

Ainsi il semblerait que les interactions de SQSTM1 avec ses partenaires qui paraissent constitutives sont en fait régulées par phosphorylation.

C. Régulation de SQSTM1

La régulation de l'expression de SQSTM1 est déterminante au vue des impacts sur divers processus cellulaires. SQSTM1 est une protéine ubiquitaire, synthétisée à faible niveau de manière constitutive ; lui permettant d'assurer sa fonction essentielle de récepteur autophagique. Sa phosphorylation peut alors moduler son interaction avec ses partenaires, et affecter les voies de signalisation en aval. Pour protéger la cellule, son expression est rapidement augmentée en réponse aux stress inflammatoire et oxydatif. Cette surexpression nocive au bon fonctionnement de la cellule, est de fait extrêmement labile : SQSTM1 étant sensible aux dégradations autophagique et protéasomale (Joung et al., 1996).

1. Transcription

SQSTM1 est un gène de réponse précoce dont la transcription est induite dès les premières minutes (de 30 min à 2 heures) en réponse à une variété de traitements tels que les esters de phorbols (PMA), les ionophores calciques, les facteurs de croissance (IL-3) et les cytokines inflammatoires (Lee et al., 1998). L'augmentation de SQSTM1 est dans un premier temps due à la stabilisation de son ARN messenger, puis à l'augmentation de sa transcription (Lee et al., 1998).

Le gène de SQSTM1 localisé sur le chromosome 5, compte 7 introns et 8 exons (Vadlamudi and Shin, 1998). Il a été identifié 17 épissages alternatifs donnant lieu à 2 isoformes protéiques (bases de données GeneCards® et e!Ensembl) différant du domaine PB1 (Crocì et al., 2003; Gong et al., 1999). L'analyse du promoteur de SQSTM1 a révélé la présence de sites de liaison pour plusieurs facteurs de transcriptions tels que c-Fos et Jun (éléments de réponse pour TPA), c-Myc, NFκB, SP-1, AP-1, Ets-1, et NRF2 (Thompson et al., 2003; Vadlamudi and Shin, 1998).

Malgré l'importance du domaine PB1 dans la signalisation, nous ne disposons d'aucune information sur la régulation de l'épissage de SQSTM1 ; l'ensemble des travaux porte en effet sur la forme complète de 440 AA.

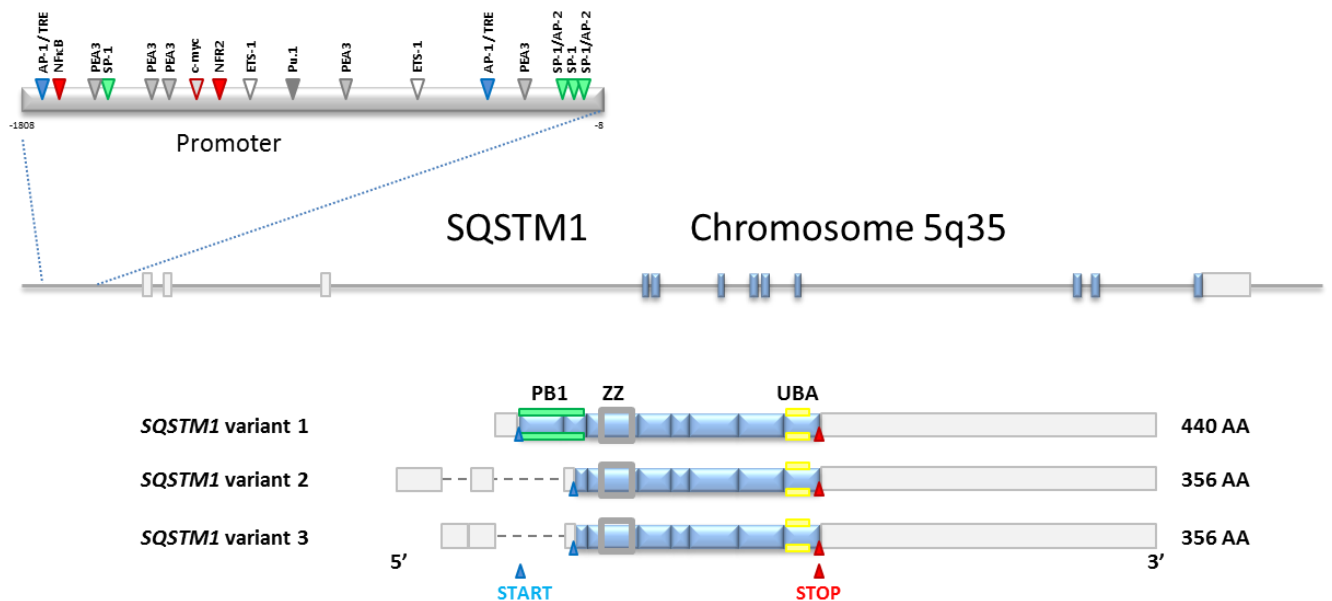


Figure 12. Promoteur, gène et formes épissées de SQSTM1

1. Régulation transcriptionnelle en réponse au stress oxydatif

En réponse à un stress oxydatif (tel que le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, des agents oxydants, des ionophores, le cadmium), NRF2 se lie spécifiquement à l'élément de réponse antioxydant (motif ARE) localisé dans le promoteur de SQSTM1 afin d'initier sa transcription (Jain et al., 2010; Kosaka et al., 2010; Liu et al., 2009; Xue et al., 2013).

2. Régulation transcriptionnelle *via* le facteur de transcription AP-1

L'équipe de Duran et al. a montré que les fibroblastes transformés par l'oncogène Ras surexprime l'ARNm de SQSTM1, qui n'est plus observé après délétion du site de liaison pour AP-1 situé en amont du gène de SQSTM1 (Duran et al., 2008).

Dans le cas de la leucémie myéloïde chronique (LMC), le Resveratrol augmente l'expression du messager de SQSTM1 *via* l'activation de la voie JNK, connue pour activer AP1 (Puissant and Auberger, 2010; Puissant et al., 2010). De la même manière, un composé présent dans l'huile d'olive (l'hydroxytyrosol) augmente aussi SQSTM1 *via* la voie JNK (Zou et al., 2012). L'ensemble de ces données sont en accord avec l'observation selon laquelle les cellules de Purkinje déficientes en JNK1/2/3 ont des niveaux de SQSTM1 indétectables (Xu et al., 2011b).

3. Régulation transcriptionnelle *via* NFκB:

Par la suite, une étude récente a aussi rapporté dans les adénocarcinomes de pancréas et de poumons (cohortes de patients, et souris transgénique) que l'expression de l'oncogène KrasG12D active AP-1 qui stimule la transcription de l'IL-1α, qui alors stimule la synthèse de SQSTM1 *via* l'activation de NFκB (Ling et al., 2012).

2. Dégradations...

Le moyen le plus efficace de mettre fin à une signalisation médiée par SQSTM1 n'est nulle autre que de le dégrader. Pour une dégradation efficace, SQSTM1 possède dans sa séquence un motif d'interaction avec LC3 (LIR), et deux motifs PEST [riches en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S), et thréonine (T)] ciblés par le protéasome, les calpaïnes et les caspases (Belizario et al., 2008; Rechsteiner and Rogers, 1996). Pour preuve, SQSTM1 est rapidement stabilisé quand on inhibe l'autophagie (Chloroquine, Bafilomycine, ShRNA Atg5), le protéasome (Mg132) et les caspases (Z-Vad) mais pas les calpaïnes (calpeptin).

Des trois, l'ensemble de la littérature s'accorde pour affirmer que l'autophagie est le processus catabolique qui maintient l'expression de SQSTM1 à un niveau bas, à la fois en condition constitutive (Bjorkoy et al., 2005; Komatsu et al., 2007) et en réponse à des stress (hypoxie, (Pursiheimo et al., 2009)). Par contre, l'inhibition du protéasome pourrait induire indirectement l'expression de SQSTM1 en stabilisant NRF2 (Komatsu et al., 2010; Zong et al., 2012). D'autres part, il a été rapporté que les caspases 6 et 8 clivent SQSTM1 seulement en réponse à Trail et la staurosporine ; ce qui inhibe l'adressage des protéines ubiquitinées à la machinerie autophagique (Norman et al., 2010).

La dégradation de SQSTM1 par l'autophagie est détaillée dans "Dégrader SQSTM1" page 60.

3. Surexpression de SQSTM1 dans le développement tumoral

En conclusion nous avons documenté les fonctions de signalisation de SQSTM1 impliquées dans des réponses cellulaires aussi variées que la prolifération, la survie, la croissance et le métabolisme cellulaire etc...

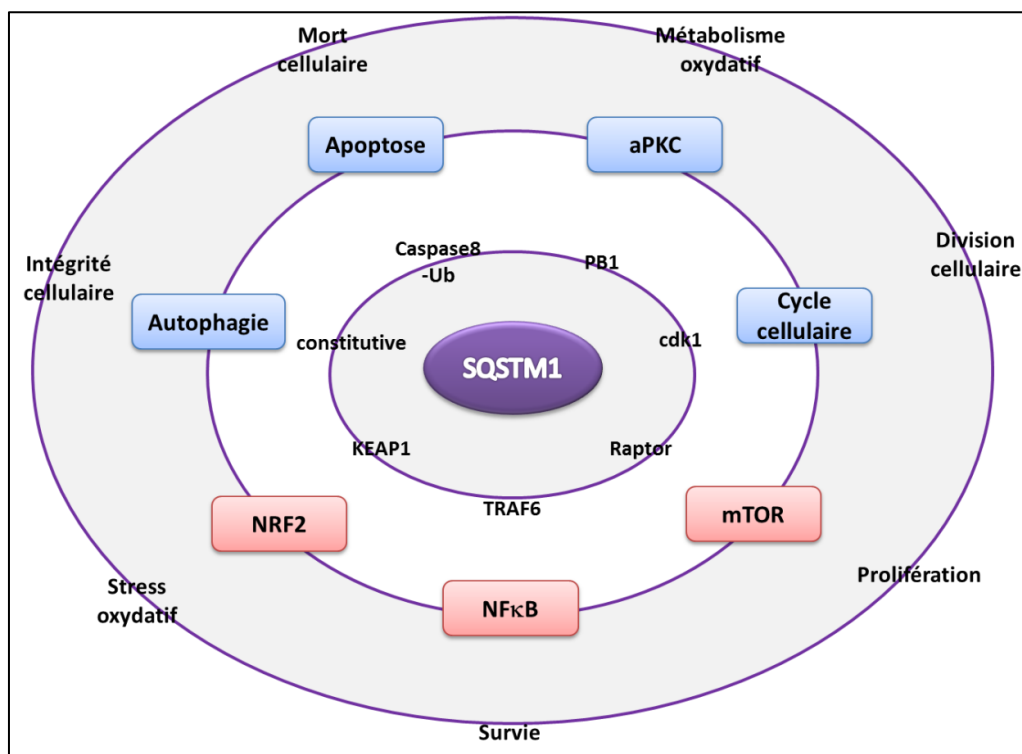


Figure 13. SQSTM1 et tumorigénèse

Quel que soient les modèles (transformation cellulaire, souris transgéniques ou xénogreffes), les types cellulaires et les oncogènes, l'ensemble de la littérature s'accorde pour affirmer que la surexpression de SQSTM1 est absolument requise pour la tumorigénèse. Selon les équipes, les effets pro-oncogéniques de SQSTM1 sont en grande partie attribués à l'une ou l'autre de ces trois voies de signalisations NFκB, KEAP1-NRF2 et mTORC1; impliquées dans les réponses inflammatoires, de prolifération, de croissance et de survie cellulaires (Duran et al., 2011; Duran et al., 2008; Inami et al., 2011; Komatsu et al., 2010) (**Figure 13**).

Fait marquant, dans ces trois voies de signalisation, SQSTM1 forme une boucle de rétro contrôle positive amplifiant ces voies de signalisation mais également sa propre surexpression (Duran et al., 2008; Jain et al., 2010 ; Nazio et al., 2013) (**Figure 14**). Dénotant ainsi l'importance de l'accumulation de SQSTM1 vis-à-vis de la pérennité du développement tumoral.

Ainsi, nous proposons que la surexpression de SQSTM1 apporte un avantage sélectif à la cellule tumorale, en perturbant ces processus cellulaires, avec pour conséquences une inflammation ou un stress oxydatif exacerbé ; propice au développement tumoral.

D. Autophagie : un mécanisme garde - fou pour limiter SQSTM1

1. Description du processus

Le terme autophagie désigne un processus par lequel la cellule s'auto-digère. De manière plus précise, ce processus consiste en la dégradation du matériel intracellulaire endommagé ou en excès (Eskelinen, 2005). A la différence du protéasome qui dégrade des protéines solubles à demi-vie courte (Glickman and Ciechanover, 2002), l'autophagie dégrade les organelles, les protéines à demi-vie longue, et les agrégats insolubles. La dégradation autophagique est assurée par le lysosome grâce à ses hydrolases (lipase, protéase, glycosidase et nucléase) activées par son pH acide (De Duve and Wattiaux, 1966). De fait, l'autophagie assure de nombreuses fonctions biologiques essentielles telles que la différenciation, l'adaptation face au stress et la survie cellulaire (Cecconi and Levine, 2008). Cette dégradation est indispensable à l'homéostasie cellulaire, qu'elle soit énergétique ou gardienne de l'intégrité des constituants cellulaires.

Il est important de souligner que SQSTM1 fut le premier substrat autophagique identifié (Bjorkoy et al., 2005). SQSTM1 fut également le premier récepteur autophagique caractérisé, notamment dans la dégradation sélective des agrégats, des mitochondries et des molécules de signalisation. Nous l'avons discuté précédemment, SQSTM1 est une plateforme de signalisation, dont les partenaires (kinases, ubiquitine ligase) nous le verrons régulent l'autophagie. En ce sens, SQSTM1 et l'autophagie s'autolimitent réciproquement; cette boucle de rétrocontrôle est probablement importante dans la prévention des pathologies et notamment du développement tumoral.

2. Les différentes formes d'autophagie

A l'heure actuelle, le terme autophagie regroupe trois mécanismes distincts : la microautophagie, l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes ou CMA (pour "Chaperone Mediated Autophagy") et la macroautophagie. Ces trois mécanismes complémentaires peuvent être induits par le même stimulus.

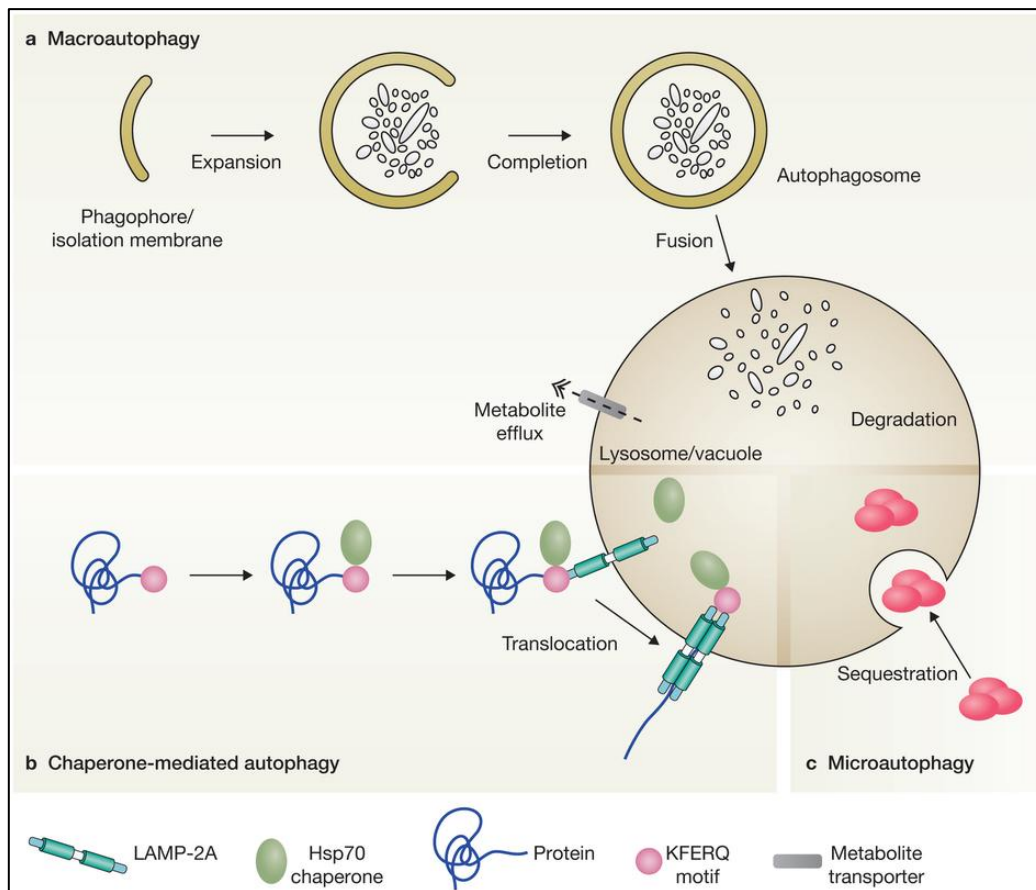


Figure 15. Les trois types majeurs d'autophagies (Boya et al., 2013)

1. La microautophagie

Elle consiste en l'internalisation directe de substrats solubles par l'invagination de la membrane lysosomale formant des structures tubulaires appelées "tubes autophagiques" sans nécessiter d'autophagosomes (Muller et al., 2000). C'est le type d'autophagie qui a été le moins étudié compte tenu du peu de partenaires mis en évidence (Santambrogio and Cuervo, 2011). En fonction de la nature des substrats internalisés, la microautophagie se subdivise en trois processus sélectifs qui sont la micropexophagie (prise en charge des peroxisomes), la micromitophagie (prise en charge des mitochondries) et la microautophagie par étape du noyau. Depuis peu, une autre forme de microautophagie a vu le jour et nécessite les endosomes tardifs et corps multi-vésiculaires à la place des lysosomes pour la dégradation du cargo protéique. Cette microautophagie endosomale est sélective puisque elle requiert la protéine chaperonne Hsc70 (Sahu et al., 2011). De manière générale, la microautophagie peut également être non sélective dans la mesure où elle dégrade aussi des portions de cytoplasme de manière aléatoire (Li et al., 2012).

2. CMA

La CMA est un processus hautement sélectif activée dès 4h de déprivation pour remplacer la macroautophagie non sélective et massive, afin d'éviter la lyse complète de la cellule. Une fois encore, ici, nul besoin d'autophagosome. La CMA fait intervenir des chaperonnes Hsc70 pour reconnaître spécifiquement et adresser au récepteur lysosomal Lamp-2A des protéines cibles cytosoliques dotées d'un motif KFERQ dans leur séquence (Dice et al., 1990; Majeski and Dice, 2004). Lamp-2A est alors responsable de la linéarisation du substrat, lui permettant d'être internalisé et dégradé dans le lysosome (Dice, 2007; Kon and Cuervo, 2010 ; Massey et al., 2004). L'expression de LAMP-2A, ainsi que l'activité de la CMA sont augmentées en réponse au stress oxydatif, à l'hypoxie, à la carence nutritionnelle ou à l'exposition à des agents toxiques (Cuervo et al., 1999; Cuervo et al., 1995 ; Dohi et al., 2012; Kiffin et al., 2004). La CMA peut également être constitutive à un niveau basal dans la plupart des cellules, pour assurer un contrôle qualité (Arias and Cuervo, 2011).

3. La macroautophagie

La macroautophagie (que nous appellerons ensuite autophagie), comme son nom l'indique, a la capacité de dégrader des organelles ou des agrégats protéiques de plus grande taille que la CMA et la microautophagie. Cette autophagie a été essentiellement identifiée comme un mécanisme d'adaptation cellulaire à un stress environnemental. En réponse à divers stress, notamment la carence en nutriment, mais aussi la déprivation en facteurs de croissance, l'hypoxie, le stress oxydatif, et l'infection..., l'autophagie va être augmentée pour digérer des portions de cytosol (protéines et organelles), et fournir les nutriments nécessaires à la survie de la cellule. Ce processus est très rapide (la demi-vie entre la formation des autophagosomes et sa dégradation est seulement de 8 minutes (Eskelinen, 2005) et s'arrête dès lors que le stress cesse. Toutefois, si le stress est trop intense ou long dans le temps, l'exacerbation de l'autophagie conduira à l'autodigestion de la cellule ou mort cellulaire de type II, qui est une mort propre sans induction d'inflammation ou de toxicité tissulaire.

Néanmoins, un certain nombre de données suggèrent qu'un niveau basal d'autophagie permet d'assurer constitutivement le maintien de l'homéostasie intracellulaire. Les différentes fonctions de l'autophagie constitutive et induite seront détaillées au cours du développement tumoral page 55.

2.3.1 Description du processus

Quel que soit le type d'autophagie (induite ou constitutive), le déroulement du processus est supposé similaire dès lors qu'il implique les mêmes organelles et la même machinerie autophagiques. La description de l'autophagie a été dans un premier temps, entièrement morphologique basée sur des clichés de microscopie électronique avant d'être appuyée par une approche moléculaire grâce à l'identification du marqueur LC3/Atg8 et des 28 gènes autophagiques, regroupés sous le terme de gènes ATG pour AuTophagy related (Klionsky et al., 2003).

Ainsi, contrairement aux deux autres types d'autophagies précédentes (CMA et microautophagie), l'autophagie se caractérise

- par la formation d'une membrane pré-autophagique, appelée phagophore, qui va séquestrer une portion du cytosol (appelé cargo et contenant des protéines ou des organelles). Ce phagophore va s'étendre par fusion avec d'autres vésicules jusqu'à sa fermeture pour donner l'autophagosome. L'origine du phagophore pourrait faire intervenir le Golgi, le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique (De Duve and Wattiaux, 1966; Juhasz and Neufeld, 2006 ; Mari et al., 2010; Ohashi and Munro, 2010).
- Les autophagosomes sont des vésicules à double membrane (encart) qui ne permettent pas la dégradation du cargo qu'elles séquestrent. Elles contiennent un contenu et des organelles identiques au cytosol.
- Cependant dès lors qu'elles fusionnent avec des lysosomes ou des endosomes tardifs (amphisomes), ces autolysosomes nouvellement formés acquièrent un milieu acide ainsi que des hydrolases propices à la protéolyse de la membrane externe et du contenu, visualisée sur les clichés de microscopie électronique par des vésicules à simple membrane contenant des corps denses aux électrons. Ainsi la dégradation des cargos dans l'autolysosome permet le recyclage des nutriments.

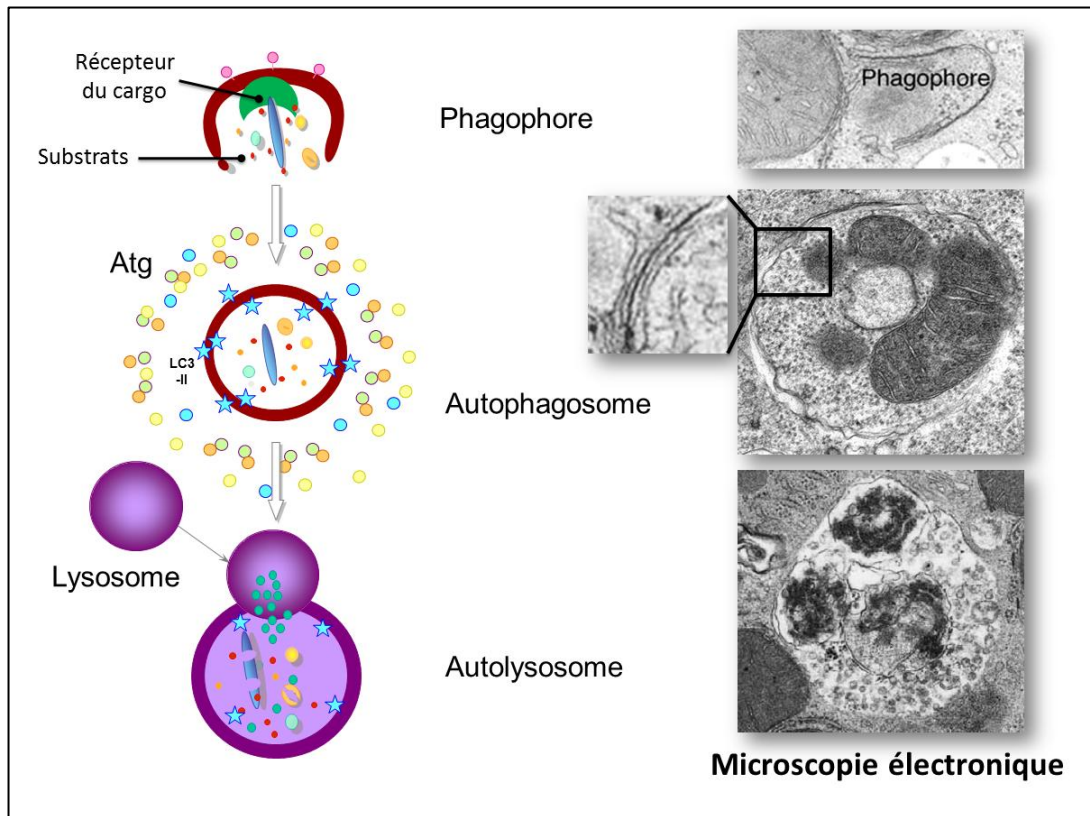


Figure 16. Processus autophagique au niveau vésiculaire





2.3.2 Machinerie autophagique

Comme nous pouvons le voir dans la **Figure 17** et le **Tableau 9**, la vingtaine de protéines Atg et le complexe PI3K interviennent dans le déroulement de l'autophagie (Mizushima et al., 2003a ; Mizushima et al., 2001; Mizushima et al., 2003b; Xie and Klionsky, 2007). Ces protéines se lient au phagophore, assure son expansion et des lors que l'autophagosome est formé, elles se détachent de la membrane externe juste avant la fusion avec le lysosome.

La machinerie autophagique peut être divisée en quatre groupes fonctionnels:

a) La formation de l'autophagosome

- Tout d'abord, la kinase autophagique ULK1 est impliquée dans l'induction de l'autophagie par la phosphorylation d'Atg13 et de FIP200 (Ganley et al., 2009; Hosokawa et al., 2009; Jung et al., 2009), le trafic de la seule Atg transmembranaire, Atg9, et l'activation du complexe BECN1/phosphatidylinositol-3-kinase de classe III (PI3K), au niveau du site d'initiation de l'autophagosome.

Phase Gène	Induction	Récepteur du cargo	Atg cycling	Nucléation vésicule	Expansion/ fermeture	Maturation autoφ
<i>ULK1</i>	Complexe					
<i>ULK2</i>	ULK					
<i>ATG13</i>						
<i>RB1CC1/FIP200</i>						
<i>ATG101</i>						
<i>ATG2A</i>						
<i>ATG2B</i>						
<i>WIPI1</i>						
<i>WIPI2</i>						
<i>SQSTM1</i>						
<i>ALFY</i>						
<i>NBR1</i>						
<i>NDP52</i>						
<i>Optineurin</i>						
<i>ATG14L</i>						
<i>AMBRA1</i>						
<i>PIK3C3</i>						
<i>BECN1</i>						
<i>UVRAG</i>						
<i>BIF-1</i>						
<i>Rubicon</i>						
<i>ATG9A</i>						
<i>ATG3</i>						
<i>ATG7</i>						
<i>ATG10</i>						
<i>ATG5</i>						
<i>ATG12</i>						
<i>ATG16L1</i>						
<i>ATG16L2</i>						
<i>ATG4A</i>						
<i>ATG4B</i>						
<i>ATG4C</i>						
<i>ATG4D</i>						
<i>MAP1LC3A</i>						
<i>MAP1LC3B</i>						
<i>MAP1LC3C</i>						
<i>MAP1LC3B2</i>						
<i>GABARAP</i>						
<i>GABARAPL1</i>						
<i>GABARAPL2</i>						
<i>GABARAPL3</i>						

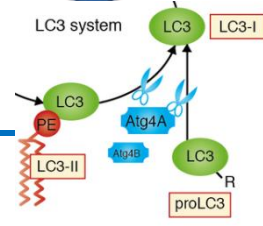
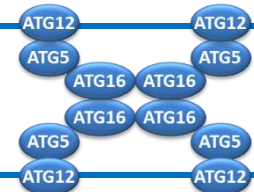
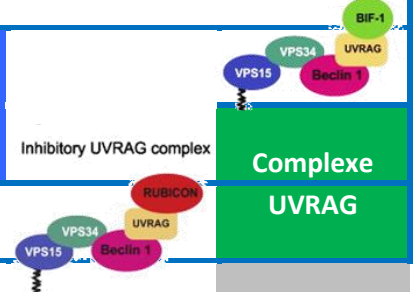
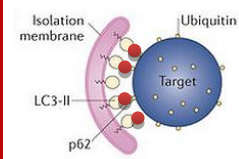


Tableau 9 : Gènes autophagiques

- Ensuite, Bécline-1 (BECN1) et ses deux partenaires Atg14L et AMBRA1 assurent le recrutement et l'activation du complexe PI3K de Classe III à la surface du réticulum endoplasmique (complexe ATG14L). La production de PI3P (phosphatidylinositol 3-phosphate) permet alors les recrutements successifs des WIPI-1-4 (WD repeat domain phosphoinositide-interacting proteins 1), d'Atg2 (à WIPI) et de la machinerie de conjugaison de LC3 au niveau du site d'initiation et d'élongation du phagophore, dans une structure appelé l'omegasome.
- Les protéines apparentées à l'ubiquitine LC3 et Atg12 composent les deux systèmes de conjugaison qui sont interdépendants et surtout indispensables à la formation et l'élongation de l'autophagosome. Atg8/LC3 après clivage protéolytique par Atg4/Autophagine1, est conjuguée à Atg7 (enzyme de type E1) puis transférée sur Atg3 (enzyme de type E2). Le deuxième système de conjugaison repose sur l'association d'Atg12 sur une lysine d'Atg5 (Mizushima et al., 1998). L'interaction entre Atg5 et Atg12 forme un complexe non covalent avec Atg16 (Mizushima et al., 1999). Ce complexe Atg16-Atg12-Atg5 de 350 kDa agit comme une E3 ubiquitine ligase qui détermine le site de lipidation de LC3 avec une phosphatidyléthanolamine (PE) membranaire, assurant la conversion de LC3-I en LC3-II liée aux membranes autophagiques (Ichimura et al., 2000).

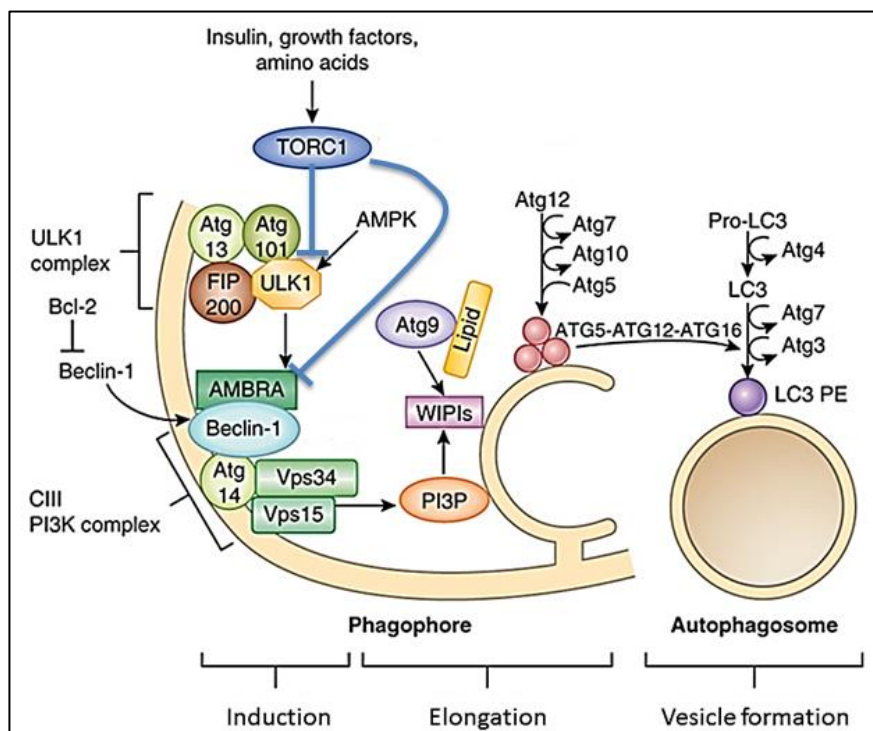


Figure 17. Processus autophagique au niveau moléculaire

- Enfin, n'oublions pas Atg9 et les SNAREs qui sont impliquées à la fois dans le recrutement des membranes et l'élongation du phagophore (Mari et al., 2010; Moreau et al., 2011; Nair et al., 2011; Ohashi and Munro, 2010; Orsi et al., 2012). L'ensemble des données récentes indiquent qu'ULK1, WIPI comme toutes les Atg sont également impliquées dans l'expansion et la fermeture des membranes autophagiques, même si beaucoup des revues les ont cantonnées à l'initiation.

Remarquons qu'au niveau de l'omegasome, l'exocyst est une plate-forme échafaudage où tous les membres de la machinerie autophagique, y compris les complexes ULK1, beclin 1/PI3K classe III et mTOR coexistent, se contrôlent mutuellement, et permettant ainsi d'ajuster finement le flux autophagique à l'environnement.

b) La maturation de l'autophagosome

- comprend plusieurs étapes à savoir sa fusion avec le lysosome, la dégradation du contenu et le recyclage. Les acteurs mis en jeu sont moins caractérisés qu'à l'étape précédente. Citons notamment deux partenaires de becline 1 ; UVRAG (Funderburk et al., 2010; Liang et al., 2008), et Rubicon (Matsunaga et al., 2009; Zhong et al., 2009) qui régulent positivement et négativement la fusion de l'autophagosome avec les endosomes/lysosomes, respectivement. Ainsi BECN1/PI3K intervient à la fois dans la formation des autophagosomes (*via* son interaction avec Atg14) ainsi que dans leur maturation (*via* son interaction avec UVRAG et Rubicon). La formation de ces différents complexes de BECN1 est perturbée dans la tumorigenèse, inhibant l'autophagie.
- A cela nous pouvons rajouter le cytosquelette de microtubules qui adresse les autophagosomes à proximité des lysosomes (Hoyvik et al., 1991; Jahreiss et al., 2008) et la machinerie de fusion membranaire composée essentiellement des SNAREs (Fader et al., 2009; Reggiori and Klionsky, 2002), des protéines GTPases Rab (Fader et al., 2008), et de ESCRT (Lee et al., 2007a; Rusten et al., 2007).
- Ensuite, la pompe à proton V-ATPase (vacuolar H⁺-ATPase) est aussi impliquée dans la fusion entre l'autophagosome et le lysosome. Elle fournit également un pH acide indispensable aux hydrolases et ainsi à la dégradation du cargo. (Kawai et al., 2007; Yamamoto et al., 1998). Les produits de dégradation sont ensuite transférés dans le cytoplasme grâce à des transporteurs enchâssés dans la membrane lysosomale (Teter et al., 2001; Yang et al., 2006).

c) La reconnaissance du cargo autophagique

- La dégradation sélective initialement considérée comme une fonction exclusive du protéasome s'est récemment avérée impliquer les lysosomes *via* le processus autophagique. Elle met alors en jeu différents récepteurs : SQSTM1, NBR1, Alfy, NDP52 et l'optineurine qui lient LC3 (Filimonenko et al., 2010; Johansen and Lamark, 2011; Kirkin et al., 2009; Thurston et al., 2009 ; von Muhlinen et al., 2010 ; Wild et al., 2011).

3. Régulation de l'autophagie : Rôles de SQSTM1/TRAF6

L'autophagie est un processus d'adaptation au stress : son flux (depuis la formation jusqu'à la dégradation) se doit d'être hautement dynamique, rapidement augmenté et réprimé par les voies de signalisation. Des réactions de phosphorylations, d'acétylations et aussi d'ubiquitinations modulent l'activité des membres de la machinerie autophagique (mTOR, ULK1, BECN2, Atg5, Atg7, Atg12, et LC3...) (McEwan and Dikic, 2011; Morselli et al., 2011). Cette partie sera présentée de manière succincte et mettra en lumière les partenaires de SQSTM1 qui jouent un rôle dans la régulation de l'autophagie : mTORC1, TRAF6, AKT....

Au centre de ce control se trouve la kinase mTOR (mammalian Target of Rapamycin).

1. Inhibition de l'autophagie

- En présence d'acides aminés et de facteurs de croissance, mTOR est activée, engage la synthèse protéique et réprime l'autophagie (Boya et al., 2013).
- SQSTM1 occupe ici encore une position clé : l'équipe de Diaz-Meco MT a en effet démontré l'importance de SQSTM1 en tant que senseur des AA, et de son partenaire TRAF6 dans le recrutement à la membrane lysosomale, la stabilisation et l'activation du complexe mTORC1 (composé de mTOR, RAPTOR, PRAS40, DEPTOR, et MLST8) (Linares et al., 2013). Une fois activée, mTORC1 réprime la formation des autophagosomes *via* la phosphorylation d'ULK et d'Atg13 (Ganley et al., 2009; Hosokawa et al., 2009; Jung et al., 2009; Nazio et al., 2013).
- Les facteurs de croissance (Insuline et IGF1) entraînent l'activation de la voie Akt (ou protéine kinase B PKB) qui phosphoryle et inactive TSC1/TSC2 ; ce qui conduit à une activité accrue de mTORC1 et une diminution de l'autophagie (Huang and Manning,

2009 ; Zhang et al., 2003). Comme verrou de sécurité supplémentaire, Akt inhibe également l'autophagie par la phosphorylation de BECN1 (Wang et al., 2012). A l'instar de mTOR, la poly-ubiquitination K63 de Akt par TRAF6 joue un rôle essentiel dans le recrutement à la membrane et l'activation d'Akt par des facteurs de croissance (Yang et al., 2009).

2. Activation de l'autophagie

- A l'inverse, la carence nutritionnelle, l'hypoxie ou une baisse de la concentration en ATP, activent l'AMPK, un senseur énergétique. L'AMPK aboutit à l'activation de l'autophagie d'une part par l'inhibition de mTORC1 par phosphorylation de TSC2 et Raptor et d'autre part par l'activation d'ULK1 (Boya et al., 2013; Egan et al., 2011 ; Kim et al., 2011; Meijer and Codogno, 2009). ULK1 une fois activée transloque au réticulum endoplasmique, où elle phosphoryle BECN1 et recrute le complexe PI3K de classe III (BECN1, Vps34, AMBRA1, et p150).
- De manière surprenante, des données récentes indiquent que la poly-ubiquitination K63 par TRAF6 peut également réguler positivement l'autophagie. En réponse à la déprivation en AA, mTOR ne phosphoryle plus AMBRA1, qui peut alors s'associer à TRAF6, ce qui conduit à la poly-ubiquitination K63 et la stabilisation d'ULK1 (Nazio et al., 2013).
- En réponse à l'inflammation (LPS, l'interleukine-1), TRAF6 induit la poly-ubiquitination de BECN1 sur la Lys¹¹⁷ présente dans le domaine BH3 qui lie Bcl2. Cette ubiquitination libère BECN1 de l'inhibiteur Bcl2, un événement critique dans la formation des autophagosomes dans les macrophages (Shi and Kehrl, 2010).
- En réponse à IL1, TRAF6 est également un activateur bien connu de la voie de signalisation TAK1-JNK, qui phosphoryle protéine Bcl-2, et dissocie ainsi le complexe BECN1-Bcl-2 (Pattingre et al., 2005).

Ainsi, Traf6 se révèle être un régulateur majeur de l'autophagie puisque la poly-Ub K63 peut selon le statut métabolique :

- inhiber l'autophagie en activant mTORC1 et Akt en présence d'AA et de facteurs de croissance (Linares et al., 2013; Yang et al., 2009).
- ou activer l'autophagie en activant ULK1 et BECN1/PI3K en absence de nutriments ou en réponse à des stress inflammatoires (Nazio et al., 2013 ; Shi and Kehrl, 2010).

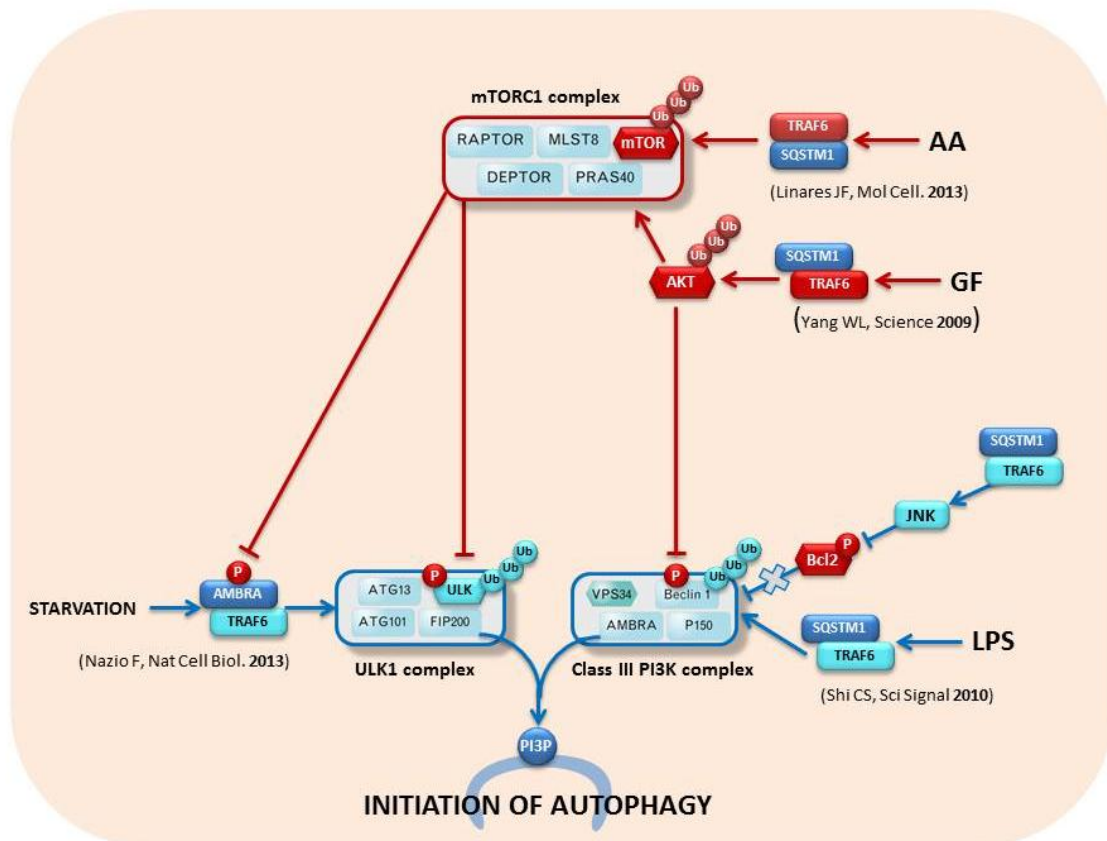


Figure 18. Régulation du flux autophagique par la poly-Ub K63 via les complexes SQSTM1/TRAFA6 et AMBRA/TRAFA6

A l'heure actuelle, compte tenu de la nature intégrative de SQSTM1, partenaire constitutif à la fois de TRAF6 et des kinases, il serait intéressant de revisiter la régulation de l'induction autophagique par SQSTM1 : Déterminer en l'occurrence l'importance de SQSTM1 sur l'activation de la PKC qui phosphoryle et inhibe LC3-II (Cherra et al., 2010; Stephan et al., 2009).

A cela nous pouvons également rajouter l'acétylation de plusieurs membres de la machinerie autophagique par les acétylases TIP60, EP300 et la déacétylase SIRT1: ULK1 (Lin et al., 2012), ATG5, ATG7, ATG8, et ATG12 (Hamai and Codogno, 2012; Morselli et al., 2011). Dans ce contexte, il serait important d'étudier si les acétylases, les déacétylases et les

ubiquitine ligases qui modifient les lysines entrent en compétition pour réguler finement le flux de l'autophagie.

4. Régulation croisée entre l'autophagie, SQSTM1 et les miRs

L'activité autophagique est régie par des "rétrocontrôles" complexes qui impliquent des voies de signalisation, des facteurs de transcription et récemment des micro-ARNs (miR). Durant les 4 dernières années, un nombre croissant d'études ont été mis en lumière l'importance des miRs sur la régulation fine de l'autophagie et inversement de l'autophagie sur l'homéostasie des miRs (Frankel and Lund, 2012).

1. Régulation de l'autophagie par les miRs

Les micro-ARNs sont de petits ARN non codants de 22 nucléotides qui répriment au moins 60% de l'expression des gènes humains. Ils se lient de manière complémentaire à une séquence « seed » de 6 nucléotides présente dans l'extrémité 3' non codante ou la région codante de leur ARNm cible, et bloquent ainsi sa traduction ou induisent sa dégradation.

Jusqu'ici, une vingtaine de miRs ont été rapportés pour bloquer plusieurs étapes du processus autophagique (**Figure 19**):

- Initiation (miR-18a, miR-101, miR-106a et miR-885-3p)
- La nucléation vésiculaire (miR-30a, miR-376b, miR-519a, miR-374a et miR-630)
- L'expansion et la fermeture de l'autophagosome (miR-519a, miR-30a, miR-181a, miR-885-3p, miR-101, miR-376b, miR-199a-5p, miR-375, et miR-204)
- L'arrimage et la fusion (miR-34)
- La fusion lysosomale (miRNAs régulant UVRAG, miR-630 et miR-374a)
- L'adressage sélectif des substrats (SQSTM1: miR-17, miR-20, miR-93, miR-106; (Lu et al., 2013; Meenhuis et al., 2011))

La plupart de ces miRs affectent les étapes précoces de la formation des autophagosomes, empêchant l'accumulation des autophagosomes. De manière intéressante, certains d'entre eux (miR-376b et miR-101) sont induits par des stimuli autophagiques (la carence en nutriments, des traitements à la rapamycine et à l'étoposide).

Il est donc logique de supposer que l'induction de ces miRs représente une importante boucle de rétrocontrôle qui freine l'initiation de l'autophagie. Pour réguler l'autophagie, les miRs ciblent principalement la machinerie autophagique (LC3 ainsi que sa protéase ATG4, les systèmes de conjugaison ATG5, ATG7, ATG12, ATG16L1, et BECN1) et fonctionne tel un garde-fou. Néanmoins ces miRs peuvent aussi agir sur des régulateurs en amont de l'autophagie (Bcl-2, p53, RAB5A et les voies de signalisation mTOR et PI3K/AKT), et de cette manière moduler positivement ou négativement le flux autophagique (rôle de rhéostat).

2. Régulation de SQSTM1 par les miRs

Quatre miRs (miR-17, miR-20, miR-93, miR-106) qui sont abondamment exprimés dans les progéniteurs myéloïdes et sous-exprimés dans les neutrophiles matures, ont pour cible SQSTM1. Pour l'instant, la seule conséquence de ces miRs réside en la diminution de l'expression de SQSTM1 et la sur-activation de sa cible ERK ; néanmoins nous ignorons l'effet de cette sous-expression de SQSTM1 sur l'adressage des substrats autophagiques. *A contrario*, le « cluster » miR-106 a également pour cible l'autophagie et plus précisément ATG16L1 et ATG9 (Lu et al., 2013; Lu et al., 2011). Il est donc nécessaire de clarifier si le niveau de SQSTM1 sous l'effet de miR106b et miR93 correspond à un blocage de la dégradation autophagique ou à une action directe sur SQSTM1.

3. Autophagie, miRs et pathologies

Il est important de constater que la dérégulation (gain ou perte) de certains miRs est impliquée dans une liste croissante de pathologies humaines, et plus particulièrement les pathologies inflammatoires et les cancers où ces miRs agissent tels des oncogènes ou des suppresseurs de tumeur.

Notre équipe a été la première à décrire chez les patients atteints de la maladie de Crohn (CD) un polymorphisme silencieux sur le gène *IRGM* (Immunity-related GTPase family M protein), touchant la région « seed » de liaison au miR-196. Il en résulte une diminution de la défense contre les mycobactéries invasives (xénophagie) et par conséquent une prédisposition aux pathologies inflammatoires de l'intestin (Brest et al., 2011). Ensuite, plusieurs équipes ont mis en évidence que la sur-expression de miRs conduit à un défaut d'autophagie dans des maladies inflammatoires (**Tableau 10**).

miRNA	Target	INFLAMMATORY DISEASES		Consequence	Ref
miR196	IRGM (c.313C>T) SNP	In vitro CD Patients	overexpressed in CD	↓ Xenophagy	(Brest et al., 2011)
miR30C miR130A	ATG5 ATG16L1	In vitro CD Patients	Induced by NFκB	↓ Xenophagy ↑ inflammation	(Thu Nguyen et al., 2013))
miR93 miR106B	ATG16L1 ATG12	In vitro CD Patients	Induced by cMYC	↓ Xenophagy	(Archanioti et al., 2011; Lu et al., 2013; Zhai et al., 2013)
miR30B	ATG12 BECN1	In vitro Patient	H. pylori infection	↓ Xenophagy	(Tang et al., 2012))
miR106 cluster	ATG16L1 ATG9		↓ miR-106 Monocyte differentiation into dendritic cells	↑ Autophagy	(Lu et al., 2011)
miR17 miR20 miR93 miR106	SQSTM1	in vitro in mice	↓ miR93 miR106B Neutrophil differentiation	↑ ERK Autophagy ?	(Lu et al., 2013; Meenhuis et al., 2011)

Tableau 10. MiRs ciblant l'autophagie et surexprimés dans les maladies inflammatoires

4.3.1 Implication des oncomiRs dans le processus autophagique pour augmenter la résistance thérapeutique

Des oncomiRs ont récemment été décrits pour activer (miR-18a) ou inhiber l'autophagie (miR106a, miR-885-3p, miR-290-295 cluster, miR-376b, miR31, miR34c...), conférant des avantages de survie en réponse à la carence en nutriments, la déprivation en glucose, le stress génotoxique, l'hypoxie et la chimiothérapie (Liu et al., 2013). L'expression d'oncomiR est fortement stimulée dans les cellules tumorales pendant la progression tumorale, et après la chimiothérapie et les radiations (**Figure 19**).

4.3.2 Les miRs suppresseurs de tumeur inhibent l'autophagie dans le but de limiter la résistance tumorale

La résistance à la chimiothérapie reste l'obstacle majeur au traitement du cancer. Récemment, une liste croissante d'arguments indique que l'activation de l'autophagie est impliquée dans la résistance aux chimiothérapies et radiothérapies. L'expression de plusieurs miRs (miR-30a, miR-34a, miR-101, miR-204 and miR-375) qui inhibent l'autophagie est réprimée dans des cancers résistants et métastatiques (cancer du sein, du foie et de la prostate). Ces miRs sont aussi sous-exprimés suite à un traitement au cisplatine, au taxol et aux radiations ionisantes. Cela laisse supposer que la perte progressive de ces miRs suppresseurs de tumeur contribue à une autophagie exacerbée dans ces cellules tumorales, permettant à la tumeur de faire face aux stress métaboliques et aux chimiothérapies. A l'inverse, la modulation du niveau d'expression de ces miRs restaure la sensibilité des cellules tumorales aux agents cytotoxiques *via* l'inhibition du processus autophagique (**Figure 19**).

De manière intéressante, l'expression de BECN1 est à la fois diminuée par l'oncomiR miR-376b et augmentée par le miR suppresseur de tumeur miR-30a. De la même façon, Atg4 est ciblée par l'oncomiR miR-376b et par le miR suppresseur de tumeur miR-101. A l'évidence, ce paradoxe pourrait être une conséquence du rôle ambivalent de l'autophagie qui agit à la fois comme un processus pro et anti-tumoral.

4. L'autophagie régule les miRs

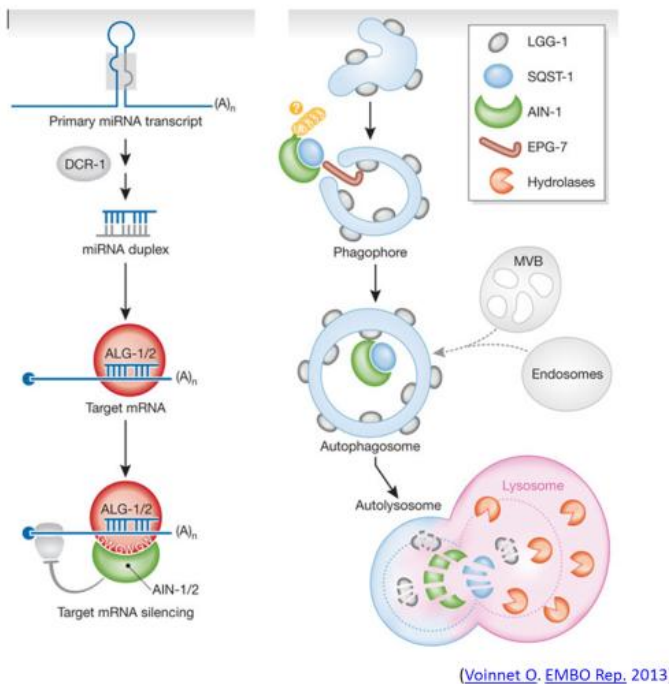
Les miRs sont transcrits par l'ARN polymérase II en un transcrit long qui subit deux étapes de maturation successives par la ribonucléase III nucléaire DROSHA et la RNase III cytosolique DICER pour générer un duplex de miRs matures d'une vingtaine de nucléotides. Dans le cytosol, un brin de ce duplex (appelé brin guide) se lie à la protéine Argonaute (AGO). L'expression des ARNm cibles parfaitement complémentaires à ce miR est alors réprimée par l'inhibition de leur traduction et par leur dégradation médiée par *RNA Interference Silencing Complex* (RISC) qui interagit avec AGO.

Récemment, il a été démontré que l'autophagie sélective peut dégrader deux protéines du complexe RISC, l'enzyme de maturation DICER (DICER1), et l'effecteur principal

AGO2 (EIF2C2), toutes deux liées de tout miRNA, ubiquitinées et adressées à la dégradation autophagique par le récepteur NDP52 (Figure 20 à gauche) (Gibbins et al., 2012).

Par ailleurs, il a été mis en évidence que l'autophagie dégrade l'oncomiR miR-224, ce qui diminue la progression des hépatocarcinomes en réponse à un inducteur autophagique l'amiodarone (couplant la microscopie électronique à l'hybridation *in situ*) (Lan et al., 2013).

Ce rôle inattendu de l'autophagie dans le contrôle de l'homéostasie des miRs suggère que les pathologies associées à un défaut d'autophagie présentent de ce fait des défauts d'expression des miRs, notamment dans le cancer.



Autophagy degradation of				
OncomiR	miR-224	hepatocellular carcinoma (HCC)	recruited and degraded by autophagy Unknown receptor ?	(Lan SH, Hepatology, 2013)
key miRISC component	Dicer	Mammalian cells	selective autophagic degradation by NDP52	(Gibbins D, Nat Cell Biol 2012)
	AGO1 UB	Arabidopsis (Plants)	Induced by viral P0 (E3 ligase) Induced in a nonviral context, when production of miRNAs is impaired.	(Derrien B et al PNAS 2012)
	AIN-1 ALG-1, -2 (AGO)	C. elegans	Involved epg-7 but not sqstm-1	(Zhang P, EMBO Rep 2013)
miRNA-loaded AGO2 complex			is sorted into lysosomes for secretion or lysosomal degradation	(Lee et al. Nat Cell Biol 2009)

5. Fonctions de l'autophagie dans le cancer

Tout au long de notre vie, l'autophagie est un processus d'homéostasie cellulaire qui dégrade dans toutes nos cellules des protéines et des organelles endommagées comme les mitochondries dépolarisées et les agrégats protéiques, toxiques pour la cellule. Ce processus catabolique est essentiel à la survie cellulaire, il produit par la dégradation les précurseurs métaboliques nécessaires à la réparation, que ce soit en condition basale ou en réponse à un stress (Levine and Kroemer, 2008; Mizushima et al., 2008; Ravikumar et al., 2010). L'importance de l'autophagie s'illustre non seulement par la létalité (Kuma et al., 2004) mais aussi par la liste croissante de pathologies associées à un défaut d'autophagie : comme les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Huntington), des cancers (poumon, ovaires, prostate, sein), des myopathies (cardiomyopathies), des stéatoses alcooliques, des pathologies infectieuses (bactéries, virus et parasites), et les maladies inflammatoires. Faits marquant toutes ces pathologies sont associées à une accumulation de SQSTM1 (chapitre A Pathologies liées à SQSTM1, page5) (Choi et al., 2013).

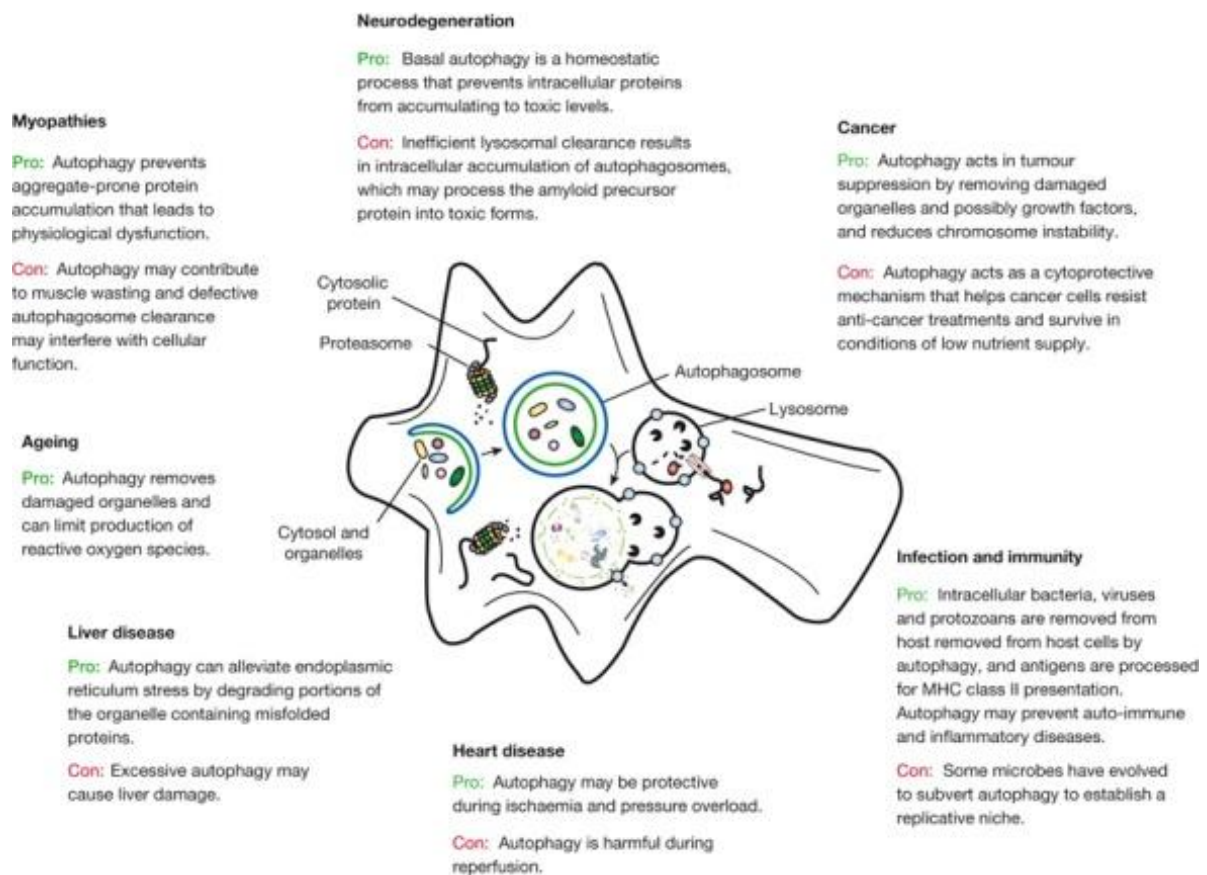


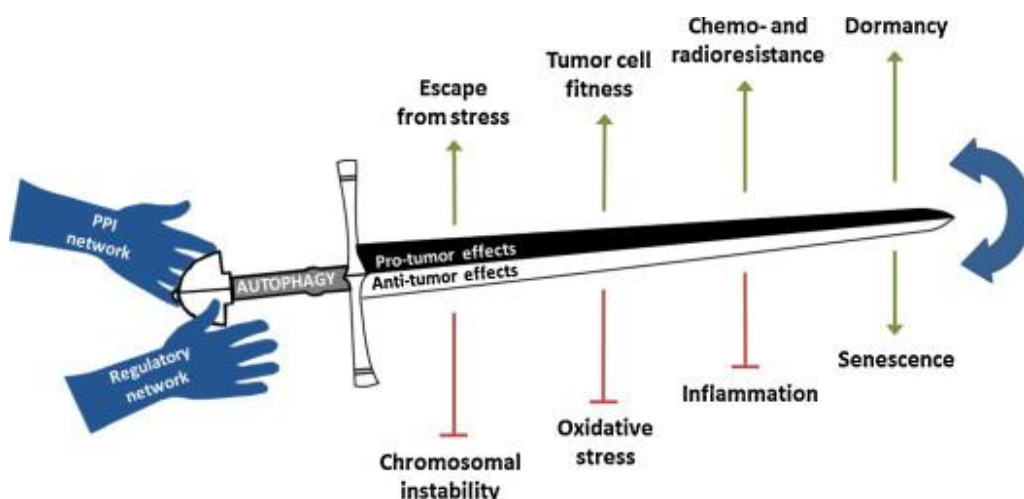
Figure 21: Les fonctions de l'autophagie (Mizushima et al., 2008)

1. Enjeu de santé publique

Nous tenons à rappeler que l'activité du processus autophagique diminue avec l'âge. Le corollaire immédiat serait que les cancers et les maladies neurodégénératives associées au vieillissement, seraient dus à ce défaut d'autophagie. L'équipe que j'ai rejoint a démontré que des polymorphismes des gènes autophagiques ainsi que des expositions à des carcinogènes environnementaux, inhibe l'efficacité du processus autophagique (Brest et al., 2011 ; Chargui et al., 2011; Corcelle et al., 2006). Nous devons garder à l'esprit que ces polymorphismes d'Atg16L1 et IRGM sont fréquents dans la population générale, de 10 à 50 pour cent, et pourrait prédisposer à ces pathologies. Sur la base des travaux menés sur des souris transgéniques, nous pouvons supposer que les personnes présentant ces polymorphismes ne développeraient pas ces pathologies, tant qu'ils ne sont pas exposés à un risque environnemental particulier (Brest et al., 2011).

Les enjeux en santé publique sont multiples : nous espérons à terme, définir une population à risque présentant des polymorphismes de gènes autophagiques, réduire au maximum l'exposition à des facteurs de risques et enfin proposer de thérapies restaurant ou augmentant le processus autophagique, pour retarder le plus longtemps possibles le développement de ces pathologies fréquentes.

L'objectif de ma thèse est de mieux comprendre les fonctions de l'autophagie et de SQSTM1 dans le cancer. Cette relation entre l'autophagie et le cancer fait l'objet, encore aujourd'hui, d'intenses controverses. En effet, l'autophagie exerce des fonctions opposées : anti et pro-tumorale sur l'initiation et la progression tumorale, de même que sur la sensibilité et la résistance aux chimiothérapies.



2. Fonctions anti-tumorales de l'autophagie

Plusieurs arguments scientifiques et cliniques suggèrent que l'autophagie est un processus anti-tumoral important : la perte mono-allélique de *BECN1* est en effet un évènement fréquent détectée dans 40 à 70% des cancers du sein, de l'ovaire et de la prostate; associé à un mauvais pronostic (Gao et al., 1995; Giatromanolaki et al., 2011; Koukourakis et al., 2010; Liang et al., 1999; Ravikumar et al., 2010 ; Rubinsztein et al., 2012 ; Saito et al., 1993). Par transgénèse, il a été démontré que l'haplo-insuffisance de *Becn1* est suffisante pour prédisposer les souris au développement de lymphomes, d'hépatocarcinomes, et de cancers du poumon, ce qui a défini l'autophagie ou du moins *BECN1* comme un suppresseur de tumeur (Qu et al., 2003; Yue et al., 2003). Par la même approche, les défauts d'autres gènes autophagiques (*Uvrag*, *Bif1*, *Atg5* et *Atg7*) sont capables de transformer ou d'induire des tumeurs chez la souris (Liang et al., 2006; Mariño et al., 2007; Takahashi et al., 2007; Takamura et al., 2011).

A l'origine de ce défaut autophagique, nous l'avons vu des délétions (*BECN1*) ou des mutations (*BECN1*, *ATG2B*, *ATG5*, *ATG9B*, *ATG12*, *UVRAG*) des gènes autophagiques ont été rapportées (Lee et al., 2007b; Liang et al., 2006). Par ailleurs, plusieurs suppresseurs de tumeurs fréquemment délétés dans les cancers comme PTEN, TSC1/2, LKB1 et p53 stimulent l'autophagie (Rubinsztein et al., 2012). A l'inverse, plusieurs oncogènes activés dans les cancers (PI3K/Akt, et mTOR...) inhibent ce processus (Wang et al., 2012). La finalité de la voie mTOR est à première vue d'inhiber ce processus catabolique pour favoriser la croissance et la prolifération rapide des cellules tumorales. Ici encore, nous pouvons remarquer que l'activation de ces voies oncogéniques est dépendante de SQSTM1 (**Figure 18**, page 48).

5.2.1 Limiter l'inflammation

L'autophagie contrôle l'intensité et la durée des réponses inflammatoires à plusieurs niveaux : ● par la protection des cellules contre le stress oxydatif, ● l'inhibition de l'inflammasome; ● de la calpaïne et ● de l'activation de la voie NF-κB. Elle limite ainsi la production de cytokines inflammatoires (IL-1β, IL-1α et IL18) et un défaut d'autophagie suffit à l'instauration d'une inflammation exacerbée (souris *atg5*- et *Atg16*-) (Nakahira et al., 2011; Saitoh et al., 2008; Shrivastava et al., 2011) (Deretic V, Nat Rev Immunol 2013)

1) En effet, l'autophagie assure la dégradation des mitochondries endommagées, qui

produisent de fortes quantités d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), à l'origine de mutations mais aussi de l'activation de l'inflammasome et de la calpaïne.

- 2) L'autophagie dégrade également les composants de l'inflammasome agrégés et les molécules de signalisation pro-inflammatoires (BCL-10, NEMO).

5.2.2 Engager la Sénescence

La sénescence est un arrêt de croissance prolongée où la cellule devient insensible à la stimulation par des facteurs de croissance. Elle est induite par des oncogènes, l'apparition de télomères courts et tout dommage de l'ADN. Quel que soit la nature du stress (expression de l'oncogène HrasV12 ou chimiothérapies), il est clair aujourd'hui que l'autophagie et la sénescence sont induites de façon concomitante, et que l'autophagie accélère l'engagement de cette dernière, limitant ainsi la transformation cellulaire (inhibiteurs et shRNA *ATG5* et *ATG7*, cancer du sein, du colon, mélanomes, et NSCLC (Goehe et al., 2012 ; Singh et al., 2012; Young et al., 2009).

5.2.3 Maintenir la stabilité génomique

Une autre fonction de l'autophagie est son rôle en tant que gardien du génome, avec notamment la dégradation sélective des micronucléi (Rello-Varona et al., 2012) et des corps mitotiques en fin de cytokinèse (Isakson, 2013 #52; Pohl, 2009 #199). Au moment où j'ai initié ma thèse, l'équipe de White E a montré en 2007 que l'inhibition de l'autophagie par l'haplo-insuffisance des gènes *BECN1* ou *ATG5* sensibilise les cellules aux stress métaboliques, augmente les dommages à l'ADN et induit une aneuploïdie, propice à la progression tumorale (Mathew et al., 2007b). L'explication avancée par les auteurs réside dans le fait que l'accumulation des mitochondries endommagées, due à un défaut autophagique, induiraient un stress oxydatif génotoxique. Les dommages de l'ADN qui en résultent ne pourraient être réparés en raison de la faible production d'ATP des cellules déficientes en autophagie. Ils ont également rapporté des centrosomes surnuméraires responsables de la formation de fuseau mitotique multipolaire et donc d'une répartition inégale du matériel génétique. Il reste que Les mécanismes impliqués dans ce rôle protecteur de l'autophagie vis-à-vis du génome restent inconnus.

5.2.4 Maintenir l'homéostasie cellulaire *via* SQSTM1

a) Notion d'autophagie sélective

En parallèle de la fonction de SQSTM1 au sein de voies de signalisation, son autre fonction majeure est sans nul la fonction de récepteur autophagique. Quel que soit la nature du substrat, il convient de souligner que l'élimination des mitochondries, des agrégats d'inflammasome, et des molécules de signalisation n'est pas un processus passif. Il met systématiquement en jeu le recrutement de SQSTM1 à un substrat poly-ub K63 dans la quasi-totalité des cas (Babu et al., 2005; Seibenhener et al., 2004). Ainsi grâce à ses deux régions UBA (ubiquitine) et LIR (LC3), SQSTM1 représente le récepteur idéal à l'élimination spécifique de ces cargos par l'autophagie qui est alors qualifiée de sélective (Bjorkoy et al., 2005; Bjorkoy et al., 2006; Kirkin et al., 2009; Pankiv and et al., 2007; Shvets et al., 2008; Wooten et al., 2008).

Ainsi l'autophagie participe à la dégradation de différentes organelles, agrégats et molécules de signalisation (**Tableau 11**) (Johansen and Lamark, 2011; Komatsu and Ichimura, 2010; Rello-Varona et al., 2012; Singh et al., 2009; Wang and Klionsky, 2011).

Nom	Substrat	Etiquette	Récepteur
Mitophagie	Mitochondries	Poly- Ub	SQSTM1
Agréphagie	Agrégats	Poly- Ub	SQSTM1 NBR1
Xénophagie	Virus, bactéries	Ub	SQSTM1 NDP52
Réticulophagie	Réticulum endoplasmique	?	?
Ribophagie	Ribosomes	?	?
Péxophagie	Peroxisomes	Ub	SQSTM1 NBR1
Lipophagie	Gouttelettes lipidiques	?	?
Micronucleophagie	Micronucléi	?	SQSTM1
	Corps mitotiques	Poly- Ub	SQSTM1 NBR1
Molécules de signalisation	STAT5A, mutant SOD1	/	SQSTM1
	BCL10 RELA DVL2	Poly- Ub	SQSTM1

Tableau 11. Autophagies sélectives

De façon importante, l'interaction constitutive de SQSTM1 avec l'ubiquitine ligase TRAF6 qui ubiquitine BECN1, est un atout pour initier rapidement l'autophagie, et contrecarrer toute inflammation exacerbée. Cependant l'ensemble de ces données a été

pour la plupart rapportées dans les macrophages et les maladies inflammatoires, en réponse à des pathogènes mais cela n'a pas été étudié dans les tumeurs.

b) Dégrader SQSTM1

SQSTM1 fut le premier substrat protéique autophagique identifié (Bjorkoy et al., 2005). Il possède en effet une séquence de 11 AA nommée LIR (région d'interaction à LC3, localisé entre les AA 332-343) qui lui permet d'interagir avec toutes les isoformes de LC3 (LC3A, LC3B, GABARAP ...) et ainsi d'être adressé à la dégradation autophagique (Pankiv and et al., 2007). Un défaut d'autophagie, quel que soit sa nature, entraîne son accumulation (Komatsu et al., 2007).

En 2009, l'équipe d'E. White a démontré par invalidation et surexpression que l'accumulation de SQSTM1 est absolument requise pour la tumorigénèse de cellules

tumorales déficientes en autophagie (Atg5^{-/-}). Parmi les réponses altérées, cette accumulation de SQSTM1 est associée à la formation d'agrégats, à un stress oxydatif, à la sur-activation des voies NRF2 et NFκB, responsable des d'une inflammation exacerbée. Ainsi, les auteurs clament que l'autophagie serait un processus supprimeur de tumeur parce qu'elle dégrade SQSTM1 (Mathew et al., 2009).

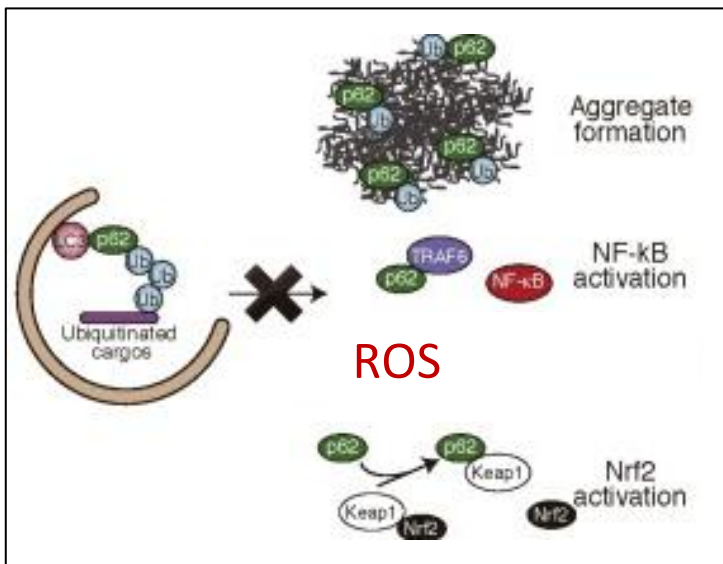
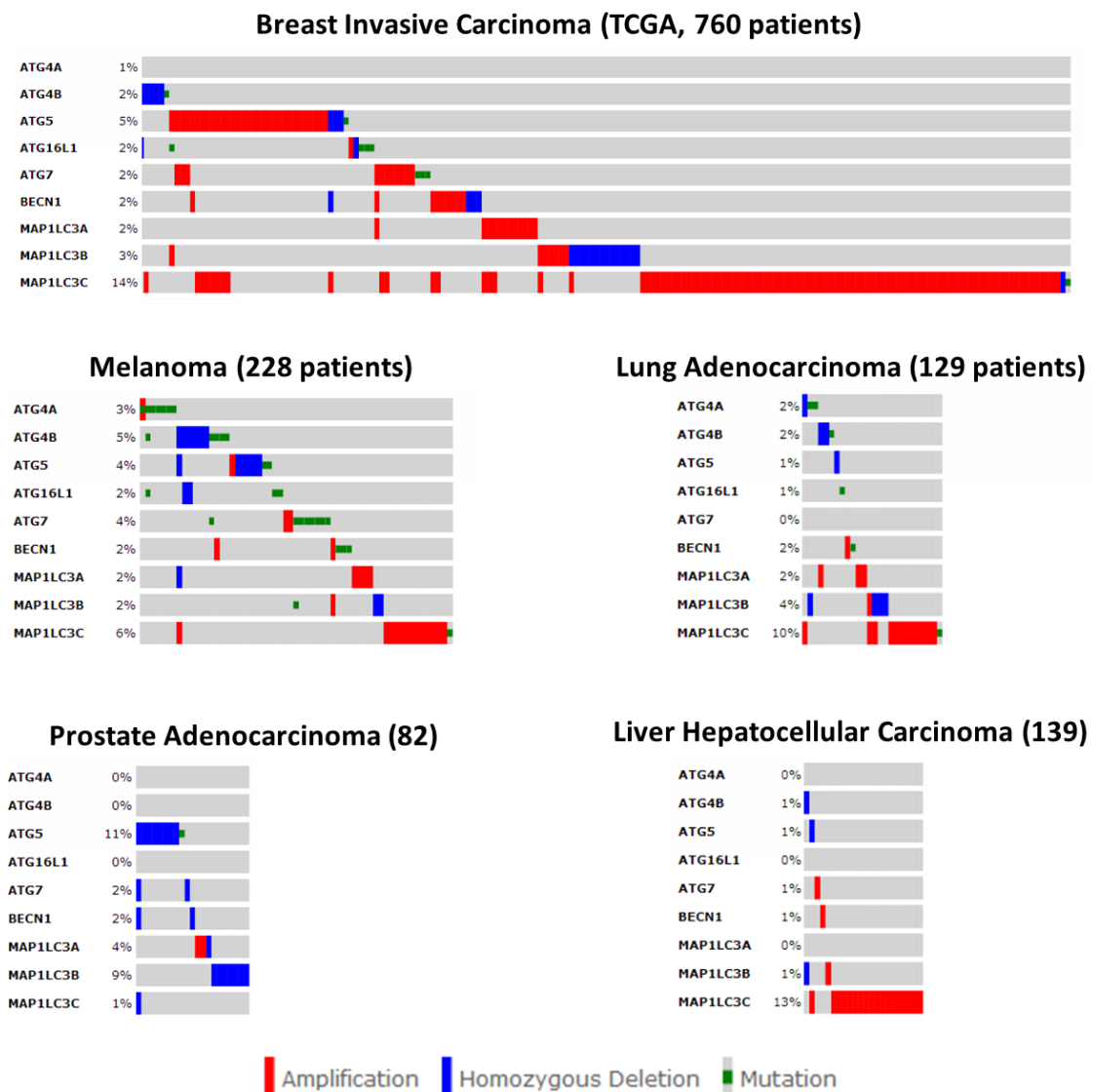


Figure 22. Conséquences d'un défaut autophagique (Komatsu et al., 2012)

3. Fonctions pro-tumorales de l'autophagie

De façon paradoxale, autant d'arguments scientifiques et cliniques suggèrent que l'autophagie peut également favoriser le développement tumoral (Mathew et al., 2007a). A titre d'exemple, la surexpression des protéines clés de la machinerie autophagique, comme LC3 et BECN1, a été rapportée dans les stades précoces et avancés des cancers colorectaux. D'autant plus que des amplifications de gènes autophagiques sont retrouvées dans les cancers (Levine and Kroemer, 2008) (**Figure 23**). Contrairement aux tissus sains, un marquage ponctiforme de LC3, témoin de l'accumulation des autophagosomes, est fréquemment observé dans les tissus tumoraux, associé à un mauvais pronostic (Ladoire et al., 2012).



[The Cancer Genome Atlas - Cancer Genome - TCGA](#)

(Belaid et al. en préparation)

Figure 23. Amplifications et délétions de SQSTM1 dans les cancers

5.3.1 Adapter la cellule tumorale à son environnement

De fait une fois le cancer établi, l'autophagie peut permettre aux cellules tumorales de résister à l'hypoxie, à la carence de nutriments et à l'absence de facteurs de croissance qui sont autant de stress présents au centre des tumeurs peu vascularisées (Mathew et al., 2007a). Les avantages sélectifs fournis par l'autophagie sont multiples : les cellules dans ce milieu appauvri utilisent l'autophagie non seulement comme source énergétique, mais aussi pour une meilleure tolérance à l'instabilité génétique et aux dommages à l'ADN (Karantza-Wadsworth et al., 2007 ; Mathew et al., 2007b). Dès lors que l'environnement est à nouveau favorable, l'autophagie étant réversible revient à son niveau basal, et les cellules tumorales croissent d'autant plus vite (Degenhardt et al., 2006; Jin et al., 2007; Lum et al., 2005).

5.3.2 Retarder l'apoptose – Résister aux chimiothérapies

Même si une autophagie excessive pourrait sur le principe entraîner la "mort autophagique", dite mort cellulaire programmée de type II, l'ensemble des arguments à la fois génétiques et biochimiques suggère que l'autophagie, serait en fait un mécanisme de survie retardant l'apoptose durant la métastase (anoïkis) {Lock, 2008 #249 ; Fung, 2008 #200} et les thérapies (Boya et al., 2005; Lum et al., 2005). A l'heure actuelle, il est clair que la plupart des chimiothérapies, des radiothérapies, et signaux apoptotiques induisent l'autophagie ; car les machineries autophagique et apoptotique sont interconnectées (Bhogal et al., 2012; Gozuacik and Kimchi, 2007 ; Maiuri et al., 2007; Mathew et al., 2007a). L'intérêt immédiat de l'autophagie est alors de séquestrer et dégrader les mitochondries altérées, prévenant le relargage des molécules pro-apoptotiques (cytochrome C, ROS). Pour preuve, la suppression pharmacologique (agents « lysomotropiques » comme l'Hydroxichloroquine, la Bafilomycine A1 et la Monensine) ou génétique (invalidation par shRNA/miRNA d'*ATG5*, *BECN1*, *ATG10*, *ATG12*) de la voie autophagique, inhibe la survie restaurant l'effet cytotoxique des chimiothérapies. Dans cette optique, inhiber l'autophagie peut constituer une stratégie thérapeutique prometteuse contre les cancers agressifs, actuellement en essais cliniques avec la chloroquine (Amaravadi et al., 2011; White and DiPaola, 2009).

5.3.3 Maintenir le métabolisme

a) En réponse au stress

En tant que promoteur tumoral, il est supposé que l'autophagie est massivement induite pour produire les nutriments absolument requis à la survie des cellules tumorales. Un des inducteurs les plus étudiés de l'autophagie est la déplétion en nutriment. En réponse à ce stress, la cellule arrête de proliférer et dégrade massivement *via* l'autophagie les protéines, les organelles, et les gouttelettes lipidiques non essentiels (Liang et al., 2007 ; Singh et al., 2009). Ceci dans le but de générer les nutriments (acides aminés et acides gras) indispensables à la synthèse de macromolécules ou à la β -oxydation mitochondriale, régulant l'homéostasie de l'ATP. Par invalidation, il a été démontré que l'autophagie (plus spécifiquement la mitophagie) est nécessaire dans des cellules tumorales pour maintenir un pool de mitochondries dont la respiration est fonctionnelle (Guo et al., 2011; Rabinowitz and White, 2010; Takamura et al., 2011; Wei et al., 2011; Yang et al., 2011)

b) Reprogrammation métabolique

Bien au-delà du stress, des données récentes soulignent l'importance d'une autophagie fonctionnelle dans la reprogrammation métabolique tumorale. La croissance tumorale nécessite en effet une biosynthèse massive de protéines, d'ADN, d'ARN, et de membranes. A cette fin, une étape clé du développement tumoral est la reprogrammation du métabolisme (Hanahan and Weinberg, 2011) : faisant intervenir une glycolyse aérobie (« effet Warburg »), une glutaminolyse ainsi qu'une augmentation de la lipogénèse *de novo* (Mashima et al., 2009; Vander Heiden et al., 2009).

Par rapport aux cellules saines qui utilisent la phosphorylation oxydative mitochondriale (Oxphos) pour produire l'ATP, les cellules cancéreuses tirent principalement leur énergie de la fermentation du glucose, indépendamment de la disponibilité d'oxygène {Warburg, 1928 #451}. Quand bien même la glycolyse aérobie est peu efficace pour produire de l'ATP (4 molécules d'ATP) par rapport à la phosphorylation oxydative (36 molécules/molécule de glucose), les cellules tumorales produisent ainsi d'avantages d'intermédiaires métaboliques (AA, nucléosides, lipides ...) indispensables à une prolifération rapide. La glycolyse aérobie est engagée par l'expression des oncogènes RAS, MYC, AKT, ou l'induction de HIF1A (Zhang et al., 2007).

Par deux travaux (lignées et souris transgéniques), l'équipe d'E White a défini le métabolome des cellules tumorales exprimant l'oncogène Ras muté : Il en ressort que l'oncogène KRASG12D (Ras*) induit une glycolyse aérobie massive, et de ce fait diminue la production d'acétyl-CoA à partir du glucose et des acides gras, en affectant les étapes clés : la stimulation de la lactate déshydrogénase (LDH) qui déplete le stock de pyruvate, l'activation de la pyruvate déshydrogénase kinase1 qui inhibe la pyruvate déshydrogénase (Chun et al., 2010; Semenza, 2010), et l'inhibition de LKB1 qui bloque l'activation de l'AMPK et ainsi la mobilisation des lipides (Chen et al., 2001a; Zheng et al., 2009).

Fait marquant, la même équipe montre que l'oncogène Ras* augmente l'activité basale de l'autophagie (Guo et al., 2011; Lock et al., 2011; Yang et al., 2011) qui est indispensable à la survie et la tumorigénèse des cellules tumorales (*Atg7*^{-/-} (Mashima et al., 2009)). Cette activation de l'autophagie induite par l'oncogène KRAS fait intervenir la voie PI3K/AKT, qui active le facteur de transcription GLI3 et ainsi l'expression de VMP1, une molécule nécessaire à la formation des autophagosomes (Lo Re et al., 2012). Grâce à des expériences de complémentation (Glutamine) et d'inhibiteurs (etomoxir, β -oxydation), les auteurs démontrent que ces cellules Ras* sont dépendantes en glutamine et en β -oxydation des acides gras (FAO) pour alimenter le cycle de Krebs et assurer leur survie lors d'un stress métabolique (HBSS).


Oncogène	Activation de l'autophagie	Modèles	Ref
H-ras V12 K-ras V12 K-ras G12D	Pro-tumoral ↑ prolifération, croissance tumorale ↑ Respiration Mitochondriale (FAO) ↑ glutamine-dépendent	Modèle murin cancer du poumon NSCLC Atg7 ⁻	E White (Guo et al., 2011) (Guo et al., 2013)
Braf V600E	Suppresseur de tumeur – Stade précoce ↓ oxydative stress (NRF2) Pro-tumoral – Stade tardif ↑ prolifération, croissance tumorale ↑ Respiration Mitochondriale ↑ glutamine-dépendent	Modèle murin cancer du poumon Atg7 ⁻ 	(Strohecker et al., 2013)
H-Ras V12 K-Ras	Pro-tumoral ↑ glycolyse ↑ Transformation (soft agar).	cellule	(Lock et al., 2011)
K-Ras V12	Pro-tumoral ↑ ATG5 ATG7 ↑ Transformation (soft agar, xénogreffe). ↑ mitophagie (<i>via</i> JNK)	cellule rat2, HCC	{Kim, 2011 #449; Kim, 2011 #448}

Tableau 12. Etudes portant sur la relation entre l'oncogène Ras et l'autophagie

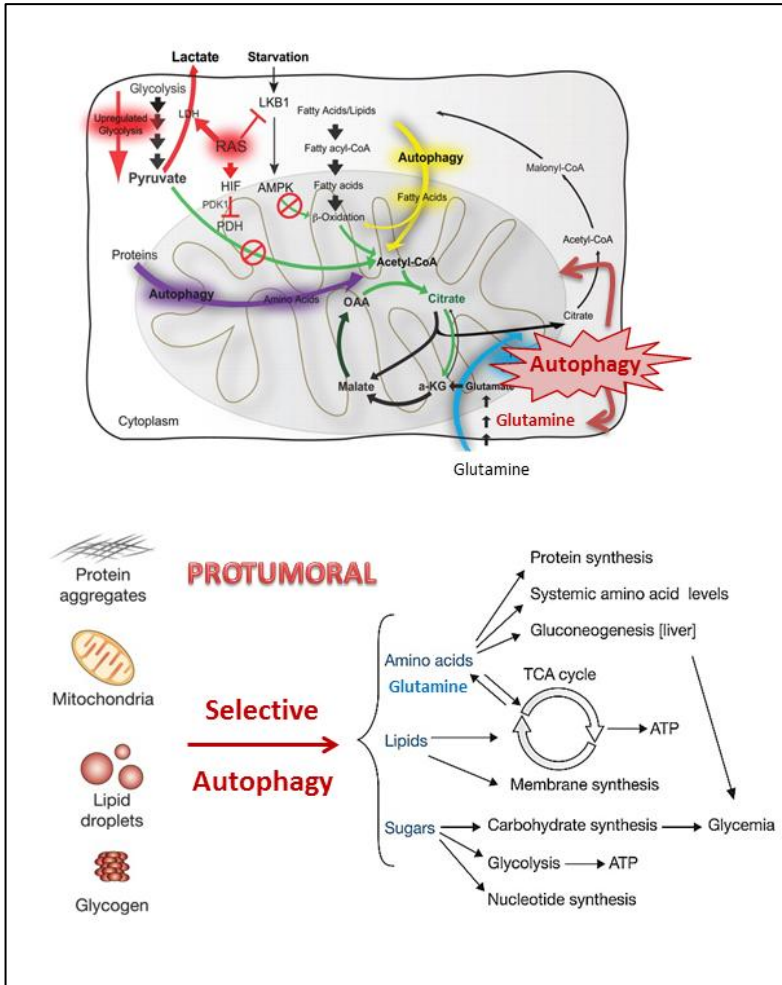


Figure 24. Autophagy et métabolisme tumoral

Ces observations ont conduits à la notion d'addiction des cellules tumorales à l'autophagy, mettant en lumières une vulnérabilité métabolique inattendue qui pourrait être mise à profit pour traiter des tumeurs exprimant l'oncogène Ras (cancers colorectaux, pancréatiques et du poumon, ~ 30% de tous les cancers) pour lesquels il n'y a pas de traitement efficace. Cette stratégie d'inhibition de l'autophagy couplée à un blocage de la β oxydation serait d'autant plus intéressante dans le cadre de tumeurs de mauvais pronostic déficientes en p53 (évènement fréquent impliqué dans la reprogrammation métabolique).

La thèse du groupe d'Eileen White est que contrairement à l'idée reçue, les cellules tumorales ont toujours besoin d'un pool de mitochondries fonctionnelles pour compléter leur métabolisme glycolytique par la glutaminolyse et la β -oxydation des acides gras et c'est l'autophagy qui assure ces trois fonctions essentielles : mitophagy, production d'acides gras et de glutamine (Guo et al., 2013).

Deux autres groupes ont rapportés la même dépendance à l'autophagy pour les cellules transformées Ras {Lock, 2011 #427 ;Kim, 2011 #449;Kim, 2011 #448} et Braf V600E (Strohecker et al., 2013).

En conclusion, malgré l'étendue et la qualité des travaux depuis 2003, date à laquelle l'autophagie a été décrite pour la première fois comme suppresseur de tumeur (Qu et al., 2003; Yue et al., 2003), le paradoxe reste entier. L'autophagie aurait des propriétés pro et anti-tumorale selon le stade ou le type de cancers. Le consensus émergent serait que l'autophagie assurerait une fonction suppresseur tumorale dans stades précoces, alors que dans les stades avancés, l'autophagie semble conférer un avantage à la survie des cellules tumorales (Strohecker et al., 2013; White, 2012).

Plusieurs questions restent en suspens :

Le terme unique « d'autophagie » est sujet à controverse qu'elle soit constitutive, sélective ou induite, car nous l'avons évoqués selon les modèles, les activités sont pro- et anti-tumorale.

Dans le même ordre d'idée, est-ce que cette dépendance des cellules tumorales en autophagie est spécifique à l'oncogène Ras et du cancer du poumon non à petites cellules, et serait généralisable à d'autres oncogènes et à d'autres cancers (ce qui a été contredit récemment par l'oncogène PI3K-H1047R (Chen et al., 2013)) ?

Enfin, comment expliquer que les cellules de cancers de poumon KRAS* soient addictives à SQSTM1 qui est un substrat de l'autophagie et qui devrait selon leur modèle être dégradé ?

Objectifs des travaux

Nous avons axé notre recherche sur la macro-autophagie, un processus catabolique lysosomal essentiel à l'homéostasie cellulaire et sur un de ses substrats SQSTM1 (séquestosome ou p62). Au moment où j'ai initié ma thèse, une relation étroite entre l'autophagie, SQSTM1 et la progression tumorale venait d'être mise en lumière.

- Plusieurs membres de la machinerie autophagique (*Atg4c*, *Atg5*, *Uvrag*, *Ambra1*, and *Bif-1/Sh3glb1*) et au premier chef *BECN1*, sont fréquemment mutés/déletés dans les cancers (40% à 75% des cancers du sein, de l'ovaire, du colon et de la prostate).
- Par transgénèse, l'autophagie ou du moins *BECN1* avait été démontré comme suppresseur de tumeur dans les lymphomes, les hépatocarcinomes et les cancers du poumon.
- Plusieurs fonctions de l'autophagie avaient été évoquées pour lutter contre le développement tumoral en assurant le contrôle qualité protéique, prévenant le stress génotoxique, en limitant l'inflammation, en favorisant la sénescence ou en dégradant les protéines de signalisation.
- Fait marquant, juste avant de démarrer mes travaux, l'équipe d'Eileen White venait de mettre en évidence qu'un défaut d'ATG5 et de *BCN1* induit une amplification génique ainsi qu'une aneuploïdie.

De façon paradoxale, l'autophagie peut également permettre la survie des cellules tumorales face à l'hypoxie, la carence nutritionnelle ou les chimiothérapies. Comment comprendre ces fonctions opposées avec les seuls substrats de l'autophagie connus alors, limités aux protéines à demi-vie longue, aux organelles endommagées et à une plateforme de signalisation SQSTM1, aux fonctions encore peu connues ?

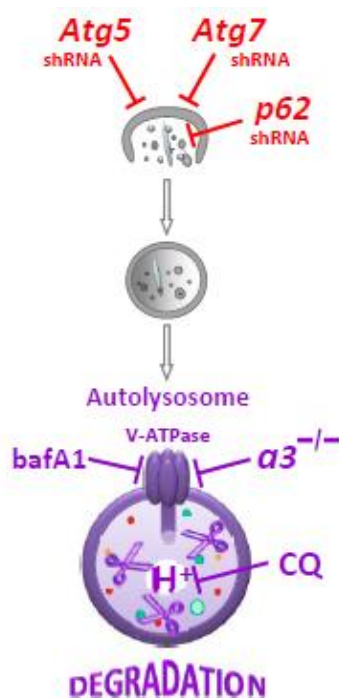
Fait marquant, en l'absence de SQSTM1 l'expression de l'oncogène *RasV12* n'est plus capable de transformer des fibroblastes *in vitro* ou d'induire des cancers du poumon dans des souris transgénique (*KrasG12D*), alors que 90 % des animaux exprimant *KrasG12D* et SQSTM1 présentent des tumeurs à différents stades de progression (Duran et al., 2008). Ainsi SQSTM1 serait un nouvel acteur pro-oncogénique et l'autophagie préviendrait le développement tumoral en le dégradant (Mathew et al., 2009).

Cependant à ce jour, cibler l'autophagie ou SQSTM1 comme stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses n'a pas encore rencontré le succès espéré, certainement car nous ne disposons pas d'informations claires quant à leur fonction dans le cancer.

Ainsi les questions abordées lors de ma thèse ont été :

1. Comment expliquer que l'autophagie exerce une fonction suppresseur de tumeur ?
2. Compte tenu des différents types d'autophagies, laquelle entre l'autophagie constitutive et induite est responsable de cet effet suppresseur de tumeur ?
3. Etant donné que l'autophagie est un processus catabolique, la seule manière d'aborder cette question est d'identifier la nature de ses substrats
4. Parmi ces substrats, pourquoi est-il si nécessaire de maintenir SQSTM1 à niveau bas grâce à l'autophagie ?
5. Préciser à quel stade intervient le défaut autophagique et déterminer si ce défaut favorise le développement tumoral en augmentant l'agressivité ?

Stratégies



Pour aborder ces questions, notre stratégie a été de combiner des approches cellulaires, moléculaires, *in silico* et *ex vivo* complémentaires.

➤ Nous avons bloqué le processus autophagique à l'étape de dégradation afin d'accumuler et d'identifier ses substrats en agissant sur la v-ATPase, une pompe à proton indispensable au maintien du pH acide des autolysosomes, en utilisant des cellules invalidées pour la sous unité $\alpha 3$ de la V-ATPase, ou un traitement avec un inhibiteur spécifique, la Bafilomycine A1 (BafA1), et une base faible la chloroquine (**Articles I-IV**).

➤ Cette stratégie a été réalisée à la fois dans le cadre de l'autophagie constitutive et induite. A l'époque, en effet il avait été extrapolé que ces deux types d'autophagie dégradent le même type de protéines. Pourtant selon des études, l'autophagie assure des fonctions pro et anti tumorales sans que cela soit expliqué. Dans ce contexte nous

avons supposé qu'il existe deux types d'autophagie : une autophagie constitutive et sélective à opposer à une autophagie induite et massive, qui dégraderaient différents types de substrats et ainsi assureraient des fonctions opposées au cours du développement tumoral (**Article I**).

- Parmi ces deux types d'autophagie, nous avons testé l'hypothèse que seule l'autophagie qui assure une fonction suppresseur de tumeur pourrait être inhibée par un carcinogène (**Article I**).
- Nous avons ensuite voulu déterminer quelles étaient les réponses cellulaires perturbées par un défaut autophagique et impliquées dans le développement tumoral (**Articles II-III et V**). En parallèle, pour cela nous avons généré des lignées tumorales (cancer du poumon, mélanomes et gliomes) déplétées en ATG5, ATG7 et SQSTM1 afin de définir leur protéome.
- Tous les résultats obtenus ont été validés sur des cohortes des patients atteints du cancer du poumon, des mélanomes, et des gliomes qui sont les cancers les plus agressifs et pour lesquels il n'y a aucun traitement efficace (tumorothèque, biopuces, et analyse *in silico*).

RESULTATS

Article I: Vers une meilleure définition de la fonction anti-tumorale de l'autophagie



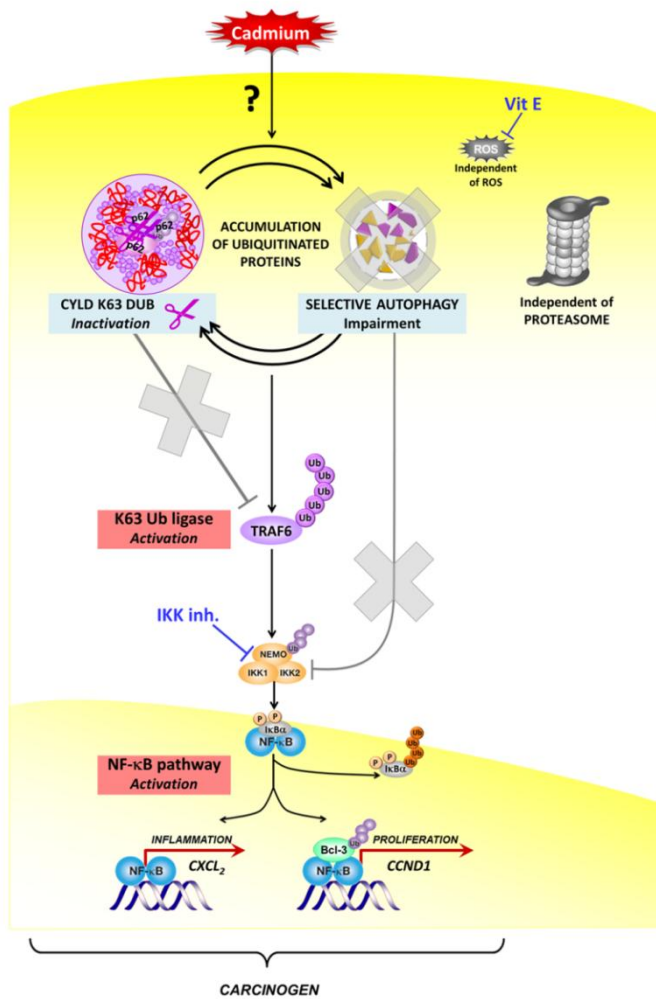
1. [The carcinogen Cadmium promotes activation of lysine 63 \(K63\)-linked ubiquitin-dependent signaling and inhibits selective autophagy and CYLD K63 deubiquitination.](#) Chargui A*, Belaid A*, Imbert-Rezzonico V, Samson M, Guigonis JM, L'hoste S, Tauc M, Peyron JF, Poujeol P, Hofman P, Mograbi B. *Autophagy*. **2013**; révision. * Co-premier auteur.

Ainsi nous sommes les premiers à mettre en évidence que

- 1) L'autophagie constitutive ne dégrade pas les protéines à demi-vie longue mais prend en charge des protéines polyubiquitinées sur la lysine 63 (K63) à demi-vie courte; son inhibition par la Bafilomycine A1 (BafA1) entraînant l'accumulation de ces protéines qui colocalisent avec les autolysosomes.
- 2) A l'opposé, le blocage par la BafA1 de l'autophagie induite par la déprivation, n'est associé ni à l'augmentation de protéines ubiquitinées, ni à leur colocalisation dans les autolysosomes.
- 3) Ces résultats remettent en cause que les autophagies constitutive et induite dégradent le même type de protéines. Ils soulignent l'importance de l'autophagie constitutive dans la répression de la polyubiquitination K63, un signal d'activation de la voie pro-oncogénique NFκB, qui assure la survie, la prolifération cellulaire, et l'inflammation, en relation avec la fonction suppresseur de tumeur.
- 4) De façon intéressante, seule l'autophagie constitutive est inactivée sous l'influence du carcinogène environnemental Cadmium (Cd), confortant la fonction suppresseur de tumeur de l'autophagie constitutive.

A notre connaissance, le Cd est le premier carcinogène à induire une ubiquitination massive sur K63, la formation d'agrégats ubiquitinés concomitante à des défauts de CYLD, et de l'autophagie sélective. De manière intéressante, à la fois la dé-ubiquitinase CYLD comme l'autophagie sont des suppresseurs de tumeur qui dégradent constitutivement les chaînes de polyubiquitine K63 (Belaid, A et al, *Autophagy* 2013).

Jusqu'à nos travaux, nous ignorions comment ces deux suppresseurs de tumeur pouvaient être inactivés par des carcinogènes. En effet, CYLD et beaucoup d'acteurs de la machinerie autophagique ont été rapportés pour être sous exprimés ou mutés dans une large liste de cancers (mélanomes, myélomes, gliomes, cancers du côlon, et cancer du poumon) et de maladies inflammatoires (Brest et al., 2010; Massoumi, 2010).



Faits marquant, le Cd induit la formation d'agrégats poly-Ub qui séquestrent et inactivent respectivement CYLD ainsi que l'autophagie sélective. Nous proposons que ceci créerait un cercle vicieux qui amplifierait l'ubiquitination sur K63 et l'activation en aval de la voie de signalisation NFκB ; processus qui a un impact direct sur la progression et l'agressivité tumorale.

Notre étude est ainsi le deuxième exemple à rapporter que la formation d'agrégats protéiques jouerait un rôle important dans le cancer par la séquestration et l'inactivation de suppresseur de tumeur, ici l'autophagie et CYLD, comme cela vient d'être mis en évidence avec p53 (Xu et al., 2011a).

En perspective

Dans la révision de l'article, nous testerons par invalidation si une des fonctions pro-tumorales de SQSTM1 en tant que partenaire de CYLD et LC3, serait de former des agrégats qui séquestreraient ces deux suppresseurs tumoraux.

Nous vérifierons également si la séquestration de protéines régulatrices de l'autophagiques dans les agrégats perturbe ou bloque l'autophagique sélective (flux autophagique).

Dans le but de prouver que les protéines à demi-vie courte sont dégradées par l'autophagie sélective *via* SQSTM1, nous réaliserons une chasse des protéines à demi-vie courte chargées en valine C¹⁴ et vérifierons par immunoprécipitation la présence de SQSTM1 dans cette population protéique en conditions avec ou sans Cd ainsi qu'avec ou sans 3-MA.

Dans le même ordre d'idée, il serait intéressant de savoir si la régulation de ces autophagies "sélectives" et "non sélectives" sont mutuellement exclusives.

Enfin, nous déterminerons si la perte de l'autophagie basale est une étape clé de l'activation de la voie NFκB (approche ARN interférence des Atg).

The carcinogen Cadmium promotes activation of lysine 63 (K63)-linked ubiquitin-dependent signaling and inhibits selective autophagy and CYLD K63 deubiquitination

Abderrahman Chargui^{1,2,3,4*}, Amine Belaid^{1,2,3,4*}, Véronique Imbert^{2,5}, Michel Samson^{2,4,6}, Jean-Marie Guigonis^{2,4,6}, Michel Tauc^{2,7}, Sebastien L'hoste^{2,8}, Jean François Peyron^{2,5,9}, Philippe Poujeol^{2,10}, Paul Hofman^{1,2,3,4,11}, Baharia Mograbi^{1,2,3,4}

¹Institute of Research on Cancer and Ageing of Nice (IRCAN); INSERM U1081; CNRS UMR7284; Nice, France. ²Université de Nice-Sophia Antipolis; Faculté de Médecine. ³Equipe Labellisée par l'ARC 9 rue Guy Môquet, Villejuif, France. ⁴Centre Antoine Lacassagne, Nice, France. ⁵INSERM U1065; Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M); Team 4 "Inflammation, Cancer, Cellules Souches Cancéreuses". ⁶Laboratoire TIRO-MATOs UMR E4320; Commissariat à l'Energie Atomique. ⁷LP2M; CNRS FRE3472. ⁸TIANP; UMR 6097. ⁹Centre Hospitalier Universitaire de Nice; Service de Pédiatrie; Service d'Hématologie Clinique; Hôpital de l'Archet. ¹⁰CNRS FRE 3093. ¹¹Centre Hospitalier Universitaire de Nice; Pasteur Hospital; Laboratory of Clinical and Experimental Pathology and Biobank; Nice, France. A Chargui and A Belaid contributed equally to this work.

K63-linked ubiquitination —conjugation of a chain of ubiquitins linked through lysine 63— has emerged as a key mechanism regulating signaling pathways, proliferation, and inflammation. Although critical, very little information is currently available about how K63-linked ubiquitination is subverted in cancer. The present study provides the first evidence that Cadmium (Cd), a widespread environmental carcinogen, is a powerful activator of K63-linked ubiquitination, independently of oxidative damage, direct activation of ubiquitin ligase or proteasome impairment. Rather, we show that Cd induces the formation of protein aggregates that sequester and inactivate CYLD and selective autophagy, two tumor suppressors that deubiquitinate and degrade K63-linked ubiquitinated proteins, respectively. Indeed, four markers of selective autophagy -- SQSTM1/p62, K63-linked ubiquitinated proteins, LC3-II and mitochondria-- accumulate into insoluble aggregates. Failure to eliminate these selective cargos is not due to alterations in the general autophagy process, as degradation of long-lived proteins occurs normally. Importantly, these protein aggregates cluster at their periphery membrane remnants and empty double-membrane autophagosomes, highly suggesting impaired autophagosome maturation. We therefore propose that the simultaneous disruption of CYLD and selective autophagy by Cd may fuel a vicious cycle which further amplifies K63-linked ubiquitination and downstream activation of NF-κB pathway, processes that directly have an impact upon cancer progression. Altogether, these findings provide new links between selective autophagy, tumor suppression and carcinogenesis.

Acknowledgments. The authors would like to thank Hélène Desqueyroux, for helpful discussions This work was supported by grants from "Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale", "Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie" (AB and AC: ADEME n° 0862C0044), Agence régionale santé Provence Alpes Côte d'Azur and Direction régionale de l'Environnement, de l'aménagement et du logement Provence Alpes Côte d'Azur (AB: plan régional santé environnement PRSE PACA n°6.3.3.3 et 6.3.3.4), and "Association pour la Recherche contre le Cancer" (ARC Grants no SL220110603478).

✉ **Correspondence to:** Baharia Mograbi; Institute of Research on Cancer and Ageing of Nice (IRCAN); Centre Antoine Lacassagne, Avenue de Valombrese; 06107 Nice Cedex 02, France; Tel: +33.4.92.03.12.45. Fax: +33.4.92.03.12.41; E. mail: mograbi@unice.fr

Introduction

Ubiquitination —conjugation of a single or multiple ubiquitins (Ub) to a protein— is a key mechanism regulating cell proliferation, differentiation, transformation, and death.^{1, 2} Such wide range of functions likely stems on the ability of the seven lysines of ubiquitin (K6, K11, K27, K29, K33, K48, and K63) to be conjugated to one another, forming a myriad of polyubiquitin chains.³ These different linkages have unique functions: the best-understood is a chain of four or more Ub linked through lys48 (K48-polyUb) that targets proteins for proteasome degradation, and thereby to signal termination.⁴ By contrast, K63-polyUb serves signaling functions that are beginning to be explored. Similarly to phosphorylation, it turns out that K63-linked ubiquitination can activate protein kinases,^{5, 6} dictate their localization and serve as a docking site for protein-protein interactions during DNA repair,⁷ activation of nuclear factor κ B (NF- κ B) pathway,^{5, 6} and selective autophagy.⁸

A key issue is therefore how the abundance of K63-linked Ub chain is limited at very low levels. Otherwise, a high K63-linked ubiquitination can lead to neurodegeneration, inflammation, and cancer.^{5, 9} Macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) emerges as one mechanism that surveys cytosol to degrade K63-linked ubiquitinated proteins and organelles.⁸ During autophagy, cytosolic constituents are surrounded by the phagophore. The phagophore then expands to form a double-membrane vesicle, termed autophagosome. The completed autophagosome fuses with a lysosome allowing degradation of cargo. As the field of autophagy developed, a growing list of autophagy substrates has been identified, changing the prevailing view of autophagy. For decades, macroautophagy was first thought to be a bulk, nonselective self-eating process that degrades long-lived proteins to cope with starvation and other environmental challenges. In addition to this fundamental role, basal autophagy was recently involved for the turnover of unneeded or damaged proteins/organelles that would otherwise accumulate.⁸ The triage decision is dictated by K63-linked ubiquitination, which helps recruit the autophagy adaptor SQSTM1/p62 that binds simultaneously to LC3/GABARAP on the nascent autophagosome, thereby ensuring selective sequestration and degradation of the targeted

substrates. The picture now emerging is that constitutive autophagy selectively degrades K63-linked ubiquitinated substrates and is often called selective autophagy. However, whether or not starvation-induced autophagy is able to clear ubiquitinated proteins is still debatable.¹⁰

The notion that autophagy suppresses tumor development was first suggested by the deletion of *BECN1* in 40 to 75% of breast, ovarian, colon and prostate cancers. Consistently, allelic loss of *Becn1* was demonstrated to predispose mice to lymphomas, hepatocellular carcinomas, and lung carcinomas.^{11, 12} Likewise, defects in other autophagy genes (*Atg4c*, *Atg5*, *Atg7*, *Uvrag*, *Ambra1*, and *Sh3glb1*) render cells or mice tumor prone.¹³ As a tumor suppression mechanism, autophagy may maintain genome stability, induce senescence, degrade signaling proteins, and limit inflammation in normal cells and early carcinomas. However, as tumors develop, autophagy then drives cancer progression, by supplying metabolic substrates, buffering oxidative damage, promoting chemoresistance, tumor metastasis and maintaining cancer stem cell pool. To reconcile these opposing observations, it has been proposed that the differential roles of autophagy in cancer may be related to tissue and stage specificities. Instead, we assumed that there are two types of autophagy, selective or bulk autophagies, which degrade different substrates and thereby ensure different functions in cancer. Although it is critical that we understand which type of autophagy, between selective or bulk autophagy, ensures tumor suppression/promotion for eventual therapeutic applications, it currently remains unknown. This is likely because all genetic or pharmacological strategies used so far similarly inhibit both catabolic pathways. Likewise, all types of autophagy rely on the same autophagy machinery, the same pathway and by inference they are suggested to degrade the same cargo: long-lived proteins, but this hypothesis remains elusive. To address this issue, we therefore explore the possibility that the type of autophagy involved in tumor suppression might be specifically disrupted by a carcinogen. Of, we chose Cadmium (Cd), a major environmental carcinogen,^{14, 15} as ones of the earliest and most documented events following Cd exposure are the accumulations of ubiquitinated proteins and autophagic vesicles¹⁶⁻²⁰.

Materials and Methods

Cell culture and treatments

To explore the effects of Cd on ubiquitination, we used mouse PCT (Proximal Convolved tubules), monkey kidney COS7, and human lung A549 epithelial cell lines (ATCC) which correspond to the common routes of human Cd exposure (oral, inhalational). The following Cd doses that produced the maximum ubiquitination were chosen: PCT (Cd 5 μ M), COS7 (Cd 10 μ M), and A549 (Cd 10 - 20 μ M). For all the experiments, cells were serum starved for 30 min in fresh serum-free DMEM/F12 supplemented with ITS-A (Invitrogen) and treated with Cd (CdCl₂; Sigma) alone or in combination with ROS scavengers [NAC (N-acetyl cysteine; 10 mM), Vitamin E (100 μ M)], proteasome (MG132; 10 μ M, Sigma) or IKK-2 (sc-514; 100 μ M, Calbiochem) inhibitors. As controls, cells were untreated or stimulated with LPS (Lipopolysaccharide; 5 μ g/ml, Sigma), FCS (fetal calf serum; 2 %), HgCl₂ (5 μ M), Pb(NO₃)₂ (5 μ M), CoCl₂ (100 μ M), FeCl₂ (100 μ M), or Zn(NO₃)₂ (100 μ M). To inhibit the last step in the autophagic degradation process, cells were treated with a specific inhibitor of v-ATPase activity, bafilomycin A₁ (bafA1; 100 nM, Sigma); or a weak base that raises intralysosomal pH, chloroquine (CQ; 100 μ M, Sigma).

Detection of oxidative stress

Intracellular levels of Glutathione (GSH) and reactive oxygen species (ROS)

Intracellular GSH contents were quantified using the glutathione assay kit (Sigma) as described.²¹ In parallel, intracellular ROS levels were measured using carboxy-H₂DCFDA (10 μ M; carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; Molecular Probes); a probe that fluoresces when oxidized by ROS, most notably hydrogen peroxide. Briefly, PCT cell lines were loaded for 30 min with these probes and incubated in the presence of either Cd (5 μ M), NAC (10 mM), Vitamin E (100 μ M) alone or in combination. Hydrogen peroxide (H₂O₂, 1 μ M) was used as a positive control. Fluorescence variations of cell suspension were measured every 2 min using a Genius spectrofluorimeter (SAFAS, Monaco).

Detection of oxidized proteins. Accumulation of carbonylated (*i.e.* oxidized) proteins was detected by reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine followed by western blotting with anti-DNP antibody (OxyBlot™ kit, Chemicon). No signal was obtained when all

reagents except DNP-hydrazine were added to cell lysates.

Detection of ubiquitinated proteins

Preparation of soluble and insoluble fractions

Cells (ϕ 100) were treated with Cd, washed in PBS and solubilized with ice cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5% Triton-100 [Tx-100], phosphatase inhibitors [1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 10 mM β -glycerophosphate, 25 mM NaPPi], 1 mM EDTA, and protease inhibitors [Complete™; Roche]) for 30 min at 4°C. Soluble and insoluble fractions were recovered following centrifugation (15,000 \times g, 15 min, 4°C), and insoluble pellet was then resuspended in Laemmli buffer by sonication. Soluble and insoluble fractions were subjected to Western blotting. All buffers (lysis, Laemmli and wash) were supplemented with fresh 1 mM *N*-ethyl-maleimide (NEM, DUB inhibitor).

Western blotting

Whole cell lysates (WCL), immunoprecipitates, soluble, and insoluble fractions (40-75 μ g) were analyzed by Western blotting as previously described²² with antibodies that specifically recognize, total ubiquitinated (DAKO; 1/6000), pan polyubiquitinated (Chemicon; clone FK2, 1/7500), K63-linked polyubiquitinated [BIOMOL; clone HWA4C4, 1/7500] proteins. After washing, the presence of primary antibodies was revealed with horseradish peroxidase conjugated-anti-mouse (1:6,000; sc-2005; Santa Cruz) or -anti-rabbit (1:10,000; sc-45040; Santa Cruz), and visualized with the Enhanced Chemiluminescence detection system (Perkin Elmer). After stripping, equal loading of proteins was verified by reprobing the same blots with anti-ACTIN or anti-TUBULIN (Santa Cruz).

Identification of ubiquitin linkage by mass spectrometry (MS)

PCT cells (from 20 ϕ 100-mm culture dishes) were stimulated with Cd (5 μ M, 6 h), washed twice and collected by scraping into ice-cold PBS. The cells were pelleted by centrifugation at 800 \times g for 5 min, resuspended in 5 ml of homogenization buffer (3 mM imidazole pH 7.4, and 250 mM sucrose supplemented with phosphatase inhibitors) and broken by 30 strokes of a tight fitting pestle of a Dounce homogenizer. The post-nuclear supernatant fraction was prepared by spinning the lysates at 1000 \times g for 10 min. After centrifugation at 24,000 \times g for 10 min,

the pellet containing insoluble ubiquitinated material was resuspended in 50 mM ammonium bicarbonate by sonication and digested overnight at 37°C with Trypsin (sequencing grade modified trypsin; Promega; ref V5111) at a ratio protein/enzyme of 20. To prepare the internal standard Ub peptides, K48-linked and K63-linked tetraubiquitins (K48Ub₄ and K63Ub₄; Boston Biochem) were subjected to the same protocol of digestion with Trypsin. Analyses were performed on a cap-LC system (Ultimate 3000, Dionex) with pre-concentration coupled to an Orbitrap Classic mass spectrometer (ThermoFisher Scientific). MS and MS/MS data were acquired and processed automatically with Xcalibur 2.0.7 (ThermoFisher Scientific) and Mascot Server 2.3 (Matrix Science, Boston, MA) softwares.

Chymotrypsin-like activity of proteasome

Cd-treated PCT cells (6h), were lysed using proteasome lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Tx-100, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM PMSF, 1 µg/ml Pepstatin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Aprotinin) followed by centrifugation at 12,000 × g for 10 min. The proteasomal activity in cell extracts (25 µg) was assessed by measuring the hydrolysis of a fluorogenic substrate Suc-LLVY-Amc (80 µM; λ_{excitation}: 380 nm, λ_{emission}: 460 nm; Sigma) in 200 µl of assay buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 2 mM ATP) for 1 h at 37°C. The specificity of the reaction was confirmed by preincubating cell lysates with an excess of the proteasomal inhibitor, MG132 (10 µM). Columns mean of duplicates from three experiments.

In vitro ubiquitination and deubiquitination assays

Sample preparation – PCT cells (4 ø 100 mm) were lysed by sonication in 1 ml of ice-cold PBS. After centrifugation at 20,000 × g for 10 min, the supernatant (containing E1, E2, E3 ubiquitin ligases and deubiquitinating enzymes) was divided into aliquots and stored at –80°C.

In vitro ubiquitination assay – Cell extracts (30 µg) were incubated with 5 µg of ubiquitin (Boston Biochem), 2 mM MgCl₂, 5 mM ATP, and energy regeneration system (ERS; 5 mM phosphocreatine, and 1 U of creatine kinase) in reaction buffer (20 mM HEPES pH 7.5; 2 mM DTT). Moreover, as lysates also contain DUB enzymes and proteasomes that would degrade Ub-proteins generated during the reactions,

lysates were preincubated with ubiquitin aldehyde (20 µg/mL; DUB inhibitor; Boston Biochem) and MG132 (10 µM; proteasome inhibitor) to facilitate accumulation of ubiquitinated proteins. Where indicated, the reactions were performed in the absence of ATP and ERS (–ATP). After incubation at 37°C for 16 h in the presence of Cd (5 µM), the reaction was terminated by addition of Laemmli buffer, boiled at 95°C for 5 min and resolved in 15% SDS-PAGE, and analyzed by FK2 or K63 polyUb western blotting.

In vitro deubiquitination assay – Cell extract (30 µg) was preincubated for 20 min at room temperature with or without Cd (5 µM) or NEM (DUB inhibitor, 10 mM). 0.25 µg of K48Ub₄ or K63Ub₄ were then added and incubated in 20 µl DUB assay buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTT) at 30°C for 16 h. The reaction was terminated by the addition of Laemmli buffer, resolved on 15% SDS-PAGE and analyzed by anti-ubiquitin immunoblotting.

Detection of autophagy

The effects of Cd on the autophagy pathway were monitored by four hallmarks: i) the formation of autophagic vesicles (mRFP-EGFP-LC3 and transmission electron microscopy); and the degradation of four well-established autophagy substrates: ii) membrane-associated LC3-II; iii) SQSTM1/p62; iv) mitochondria and v) long-lived proteins.

Electron microscopy

The ultrastructural changes caused by Cd in PCT cells (2 and 6 h) were analyzed by transmission electron microscopy, as previously described.²³ 20-25 micrographs, primary magnification ×10,000, were taken randomly from each sample.

Immunofluorescence staining

Because PCT cells are too small to clearly see the punctate LC3 staining by immunofluorescence, we used the kidney COS7, and the lung A549 epithelial cells as models in which we have recapitulated the Cd-induced high K63-linked ubiquitination, SQSTM1 accumulation and impaired autophagy flux. Cells seeded on glass coverslips, were treated with Cd or bafA1, fixed with methanol and subjected to indirect immunofluorescence using antibodies against ubiquitinated proteins (FK2 1/200 or Ub 1/320), SQSTM1 (BD Transduction Laboratories™; #610833, 1:500), autophagy (LC3-II; clone 5F10; Nanotools,

1/500) and lysosome markers (LAMP1, BD Pharmingen, 1 µg/ml, Clontech) to detect the autophagosomes (LC3-II+) and the autolysosomes (LC3-II+ and LAMP1+). To label mitochondria, 100 nM MitoTracker Red (molecular probes) was added to the medium for 25 min at 37 °C, followed by a quick wash in PBS and fixation. Pictures were taken with a 63x magnification lens using a confocal laser-scanning microscope (Zeiss LSM510 Meta) fitted with a 405, 488, 543 and 633 nm krypton/argon laser allowing simultaneous analysis of the dapi, fluorescein, rhodamine and cyan5 chromophores. Alternatively, COS7 cells were transfected by a pH-sensitive mRFP-EGFP-LC3 reporter, to distinguish autophagosomes that have both mRFP and EGFP signals from acidic autolysosomes that emit only mRFP signal because of quenching of the EGFP into the acidic lysosomal environment.

Degradation of long-lived and short-lived proteins

Protein degradation was determined according to the method previously reported.^{23, 24} Briefly, cells were incubated for 72 h at 37°C in fresh DMEM/F12 medium containing 2% dialyzed FCS and 0.15 µCi of L-[¹⁴C] Valine (GE Healthcare). Unincorporated radioisotopes were removed by rinsing with DMEM three times. Cells were then chased with the culture medium containing 10 mM cold Valine. After overnight incubation, at which time short-lived proteins were being degraded, the chase medium was replaced with fresh medium containing Cd. When required, NH₄Cl (20 mM) or 3-methyladenine (3MA; 10 mM) were added to inhibit lysosomal and autophagic degradations, respectively. Protein degradation was then analyzed for a period of 5 h to ensure optimal inhibition and to avoid toxic effects. Cells and medium was harvested and precipitated in trichloroacetic acid (TCA) at a final concentration of 10% (v/v) at 4 °C. The samples were centrifuged at 15000 × g for 10 min and the acid-soluble radioactivity (released amino acid) was measured by liquid scintillation counter. Acid-insoluble radioactivity (radiolabelled proteins) was dissolved in 0.2 N NaOH and counted. The percentage of protein degradation was calculated by dividing the acid-soluble radioactivity recovered from both cells and medium by the sum of acid-soluble and acid-precipitable radioactivities. Nonlysosomal-dependent degradation (which is largely mediated by proteasome) was the percent of protein degradation resistant to NH₄Cl. The contribution of autophagy was

calculated by subtracting the radioactivity remaining after inhibition with 3MA from the total radioactivity. Alternatively, the cells were quickly chased 2 min to have both long-lived and short-lived proteins labeled. The short-lived protein degradation was then estimated by subtracting the radioactivity after a short chase (long-lived and short-lived proteins) from the radioactivity after a long chase (long lived proteins). All experiments were performed at least six times with duplicate samples.

Analysis of LC3-II and SQSTM1 degradation by western blotting

The lipid-conjugated LC3-II form was detected by immunoblotting as previously described with anti-LC3 (1:1,000, clone 5F10; Nanotools).²² In addition to LC3, we analyzed the levels of SQSTM1, a specific autophagy substrate, by western blotting using anti-SQSTM1 antibodies (BD Transduction Laboratories™; #610833, 1:1000 or Santa Cruz Biotechnology; SC25575; 1:500).

Analysis of NF-κB pathway Activation

Western blotting

Western blots were generated as described above but developed with antibodies that specifically recognizes TRAF6 (Santa Cruz Biotechnology), and the Ser³²/Ser³⁶-phosphorylated IκBα (P-IκBα, Cell Signaling Technology). As we were unable to detect CYLD in Cd-treated PCT cells with available antibodies; we analysed the effects of Cd on CYLD subcellular distribution by transfection of COS7 cells with CYLD-FLAG (Gilles Courtois, INSERM U781, France).

NF-κB-dependent gene transcription

PCT cells (0.8 10⁶/six-well dish) were transiently transfected using Fugene HD (Roche) with 1 µg of a *firefly* Luciferase reporter gene controlled by a minimal thymidine kinase promoter and 6 reiterated κB sites (pκBx6 TK-luc). The *Renilla* luciferase gene (0.01 µg) was cotransfected and was used as an internal control plasmid. Following transfection, cells were allowed to recover 24 h at 37°C, depleted and subsequently exposed for 8 h to Cd (5 µM), or LPS (5 µg/ml, used as positive control) alone or in combination with IKK2 inhibitor (sc-514, 100 µM). Luciferase activities (*firefly* and *Renilla*) were measured 8 h later in the same sample using a dual luciferase reporter assay system (Promega) on a LB

Centro luminometer (Berthold, Germany). The *firefly* luciferase activity was adjusted by dividing with the corresponding *Renilla* luciferase activity. Each experiment was repeated four times. Data are expressed as means \pm standard deviations of four replicates.

Electrophoretic mobility shift assays

Total cellular extracts were prepared in totex lysis buffer (20 mM HEPES pH 7.9, 350 mM NaCl, 20% glycerol, 1% NP-40, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, and protease inhibitors). Supernatants from a 15,000 \times *g* centrifugation (15 min, 4°C) were collected. For mobility shift assay, a NF- κ B double-stranded probe (5'-GAT CCA AGG GAC TTT CCA TG-3' of the Ig κ promoter) was end-labeled with [γ -³²P] ATP using T4 polynucleotide kinase and incubated with samples (10 μ g) for 20 min at 30°C. For supershift assays, totex cell extracts were preincubated with antibodies (2 μ g) that are specific for p50/NF κ B1, p52, p65/RelA, RelB, cRel or Bcl3 (Santa Cruz Biotechnology) for 30 min on ice before the addition of the labeled probe. DNA/protein and DNA-protein-antibody complexes were resolved on a 5% polyacrylamide gel in 0.5X TBE and detected by autoradiography.

RNA extraction and Real-time RT-PCR

Total RNA was isolated from cells by TRIzol Reagent (Invitrogen) and one microgram was reversed transcribed using the SuperScript III First Strand kit (Invitrogen). Quantitative RT-PCR analysis was performed on a 7500 Real-Time PCR system and SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems). Each sample was denatured at 95°C for 10 min and subsequently subjected to 40 cycles of 15 s at 95°C for denaturation and 1 min at 60°C for annealing and elongation. The expression of *CXCL2* transcripts was quantified using the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method and normalized to the levels of the housekeeping gene (Rplp0 or *TUBULIN*, Applied Biosystems). Relative gene expression changes are reported as number-fold changes compared to the untreated cell samples (were then set to 100).

Results

Cadmium (Cd) induces protein ubiquitination independently of oxidative damage and proteasome impairment

We first tested the prevailing models of Cd action that evoke a massive oxidative damage (carbonylation) and the subsequent proteasome impairment as the exclusive mechanisms by which Cd induces ubiquitination.²⁵⁻²⁷ As shown in Figure 1A, treatment of renal epithelial cells with 5 μ M CdCl₂ dramatically increased the levels of ubiquitin-conjugated proteins. This ubiquitination was preceded by the depletion of cytosolic GSH (Fig. 1B, left) and the generation of reactive oxygen species, as indicated by the oxidation of the fluorescent probe H₂DCFDA (Fig. 1B, right) and the carbonylation of proteins (Fig. 1C).

However, we provide here several lines of evidence that Cd-induced ubiquitination and carbonylation were two independent responses. *i)* Indeed, an antioxidant vitamin E prevented the production of ROS and the subsequent protein oxidation in Cd-treated cells (Fig. 1B-C). Surprisingly, Cd was still able to induce ubiquitination in the presence of vitamin E (Fig. 1C); confirming previous observations obtained with another antioxidant (ascorbic acid²⁸). *ii)* In reciprocal experiments,

addition of H₂O₂, a positive control for oxidative stress, was able to oxidize proteins, but failed to induce protein ubiquitination per se (Fig. 1C).

We next examined the contribution of proteasome impairment in Cd-induced ubiquitination. Indeed, Cd is thought to stabilize ubiquitinated proteins by inhibiting the proteasome, as suggested by the increased levels of cyclooxygenase-2, ATF5, NRF2, and p53;^{25, 28-30} four proteasome substrates. Nevertheless, several puzzling observations have documented that Cd increases the proteasomal degradation of eIF4E and Na/K ATPase.^{31, 32} By three different assays (Fig. 1D-E), proteasome appeared to be functional in response to Cd. Whereas the 20S proteasome activity of cell extracts was completely inhibited by MG132, we did not observe any proteasomal impairment associated with Cd treatment (Fig 1D, left). Consistently, in living cells, the proteasomal (*i.e.* non-lysosomal) degradation of radiolabelled proteins was not affected upon Cd stimulation, in agreement with³³ (Fig. 1D and Fig. S1). Consistently, the level of ubiquitinated proteins was further increased in Cd- and MG132-treated cells, indicating that ubiquitinated proteins were still degraded by the proteasome in Cd-treated cells. Together, these observations argue against an essential role for oxidative damage and proteasomal shortage in Cd-induced ubiquitination.

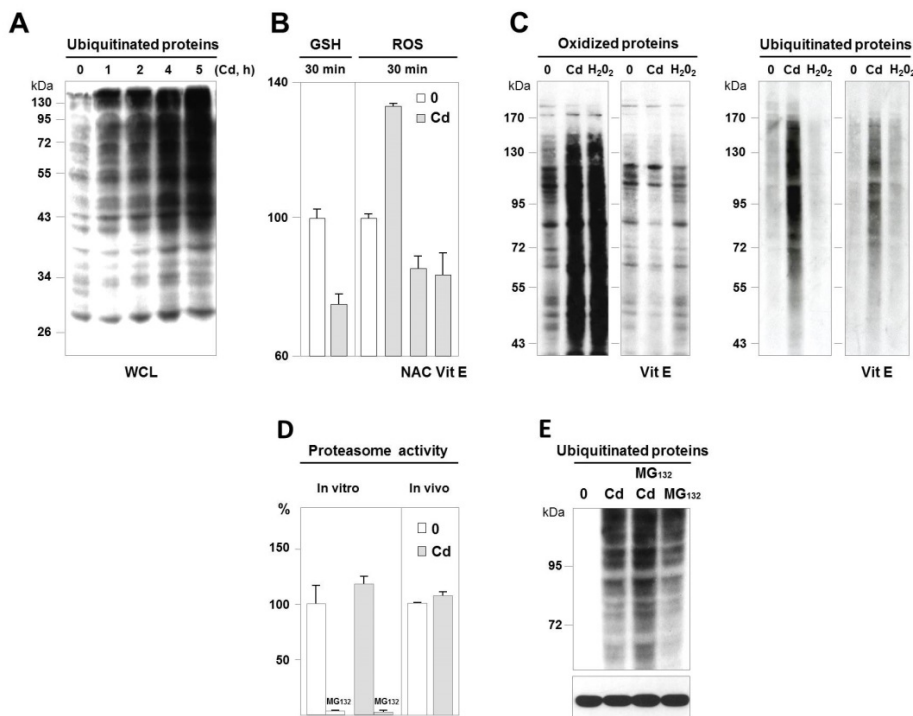


Figure 1. Cd induces protein ubiquitination independently of oxidative damage and proteasome impairment. **A.** Accumulation of ubiquitinated proteins. PCT cells were incubated in the absence (0) or the presence of Cd (5 μ M). At indicated times, ubiquitinated proteins were detected by western blotting of whole cell lysates (WCL) with anti-ubiquitin antibodies. **B.** ROS production. The intracellular levels of GSH (left) and ROS (carboxy-H₂DCFDA, right) were measured upon Cd treatment (5 μ M, 30 min). Where indicated, cells were treated with Cd in combination with two antioxidants; NAC (10 mM, also scavenger of Cd), or Vitamin E (100 μ M, Vit E). The results are expressed relative to the level of untreated cells, which was given an arbitrary value of 100. **C.** Detection of oxidized proteins in WCL was assayed using OxyBlot kit. As positive controls, cells that were stimulated by H₂O₂ (1 μ M) showed high protein carbonylation that was completely inhibited by Vit E. **D.** Proteasome activity. Cells were treated with Cd (5 μ M, 5 h), lysed and proteasome activity was measured either *in vitro* by the degradation of specific Suc-LLVY-AMC peptide (right) or in living cells by the degradation of labeled proteins (left) and the accumulation of ubiquitinated proteins (Western blotting, **E**). The positions of the molecular weight markers are indicated on the left in thousands. (See Fig. S1).

Cd is a previously unsuspected activator of K63-linked ubiquitination

No information is available about the nature of the polyUb chains that accumulate in response to Cd. We therefore used mass spectrometry to identify the specific Ub linkages. Cd-treated cells displayed accumulation of K48-linked Ub (K48-polyUb) chains and K63-polyUb chains, compared to the selective accumulation of K48-polyUb chains in MG132-treated cells (Fig. 2A). Western blotting with an antibody that specifically recognizes K63-polyUb chains confirmed a dose-dependent K63-linked ubiquitination in Cd-treated cells, with a maximal effect at 5 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 2B-C). By contrast, little, if any, K63-linked ubiquitination was detected upon MG132 treatment, supporting that K63-polyUb proteins are not degraded through a proteasomal route (Fig 2B).

Likewise, such massive K63-linked ubiquitination was observed without enrichment in lung (A549) and renal (PCT) cells, which are the primary routes for human exposure (Fig. 2 and 4), indicating that Cd-induced K63 ubiquitination is a major phenomenon.

One critical issue was then to address how Cd increased ubiquitination. As Cd and Zn are in the same group of chemical periodic table, Cd may share with Zn the ability to bind to Zn finger domain and the SH group within the active sites of ubiquitin ligases and deubiquitinases and regulate their activity. Along this line, K63-linked ubiquitination was also slightly enhanced by the addition of ZnCl_2 but not of other heavy metals (Pb, Hg, Co, Fe, Fig. 2D). However, *in vitro* assays demonstrated that addition of Cd (5 μM) to cell lysates had little if any direct effects on the activity of the ubiquitin ligases and deubiquitinases (Fig. 2E-F).

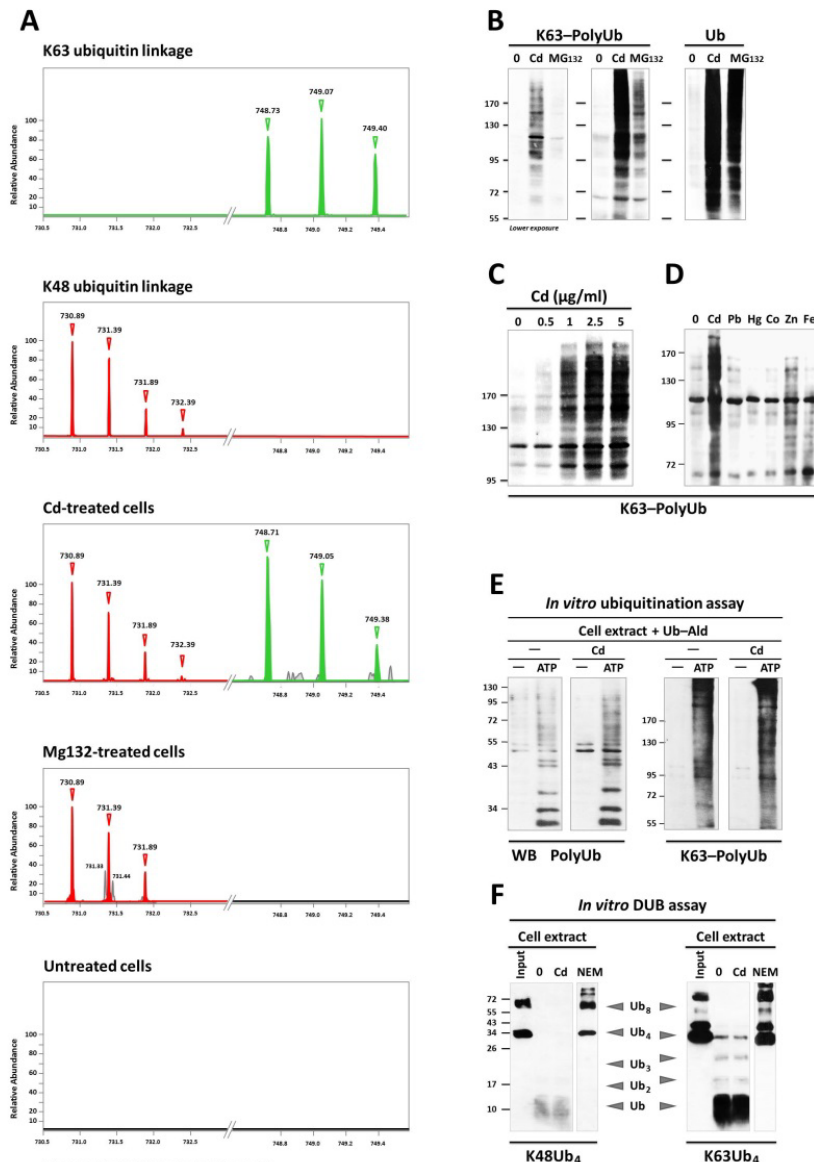


Figure 2. K63-linked ubiquitination is dramatically enhanced by Cd treatment. **A.** Identification of ubiquitin linkage by mass spectrometry. Insoluble fractions of Cd-treated cells, and MG132-treated cells (as control of proteasomal inhibition) were subjected to digestion with trypsin. The resulting peptides were analyzed by mass spectrometry. The peaks corresponding to K63- and K48-Ub linkages are indicated in green and red with their ideal masses (m/z), respectively. **B-D.** Dose-dependent accumulation of K63-linked ubiquitination in response to Cd, but not MG132 treatment. PCT cells were incubated for 5 h in the absence (0) or the presence of Cd (0.5-5 μM), MG132 (10 μM , B), $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (5 μM , D), HgCl_2 (5 μM , D), CoCl_2 (100 μM , D), $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ (100 μM , D) or FeCl_2 (100 μM , D). Ubiquitinated proteins were then detected by western blotting of WCL using pan ubiquitin (as positive control of proteasome inhibition) or K63-polyUb specific antibodies. Note that little, if any, K63-linked ubiquitination was detected under MG132 treatment (only after overexposure, B). **E.** Cd does not increase protein ubiquitination *in vitro*. Lysates from untreated PCT cells (that contain E1, E2, and E3 ubiquitin ligases) were incubated with ubiquitin and ATP, in the absence or presence of Cd (5 μM). The reaction buffer also contained the DUB inhibitor Ub-Ald to allow ubiquitinated proteins to accumulate for detection. After incubation at 37°C for 16 h, the products were subjected to western blotting using pan polyUb (FK2) or K63-polyUb antibodies. No ubiquitination was observed in the absence of ATP. **F.** Cd does not directly inhibit K48 DUB and K63 DUB activities *in vitro*. Cell extracts (as a source of DUB) were preincubated with Cd (5 μM) or NEM (DUB inhibitor, 10 mM) before the addition of 0.25 μg tetraubiquitin K48Ub₄ or K63Ub₄ as substrates. After incubation at 30°C for 16 h, the reaction was analyzed by anti-ubiquitin western blot. Input tetraubiquitins are shown.

Cd selectively impairs the autophagy degradation of short-lived proteins, without interfering with autophagy flux of long-lived proteins

Instead of proteasome, an alternative explanation for the accumulation of K63-linked ubiquitinated proteins may be related to defects in autophagy that degrades K63-linked ubiquitinated cargos. We therefore used biochemical, ultrastructural, and functional assays to analyze the activity of the autophagy pathway in Cd-treated kidney and lung epithelial cells (Fig. 3-5). We found that the previously reported autophagic response of Cd-treated cells did not result from enhanced proteolysis but rather from impaired autophagic degradation.²⁰ As shown in Fig. 3A, Cd (5 μ M) induced in PCT cells a marked and sustained conversion of LC3-I to LC3-II form that lasted 8 h. At 2 h of Cd treatment, LC3-II levels were further increased by the addition of lysosomal protease inhibitors (E64d and pepstatin A, Fig. 3B, left); highly suggesting that the autophagy flux was functional. At this early time point (2 h) of treatment, transfection of a pH-sensitive, mRFP-EGFP-LC3 reporter allowed us to confirm the efficient formation of autophagosomes (yellow; mRFP-EGFP; and LAMP1 negative; arrowhead) and acidic autolysosomes (only

red, and LAMP1 positive; arrow; Fig. 3C), arguing against a Cd-induced defect on v-ATPase activity³⁴ and in agreement with³⁵. However at 6 h of Cd treatment, the autophagy flux was severely impaired as no difference in the amount of LC3-II was observed in the presence of E64d and pepstatin A (Fig. 3B, right), and consistently autophagosome maturation was defective, as evidenced by marked accumulation of yellow LC3 (yellow; mRFP-EGFP; and LAMP1 negative; Fig. 3C).

Intriguingly, under these conditions Cd did not compromise the autophagy degradation of long-lived proteins (Fig. 3D), in agreement with³⁶. To explore this apparent conflict, we assumed that Cd-induced defect was not a global disruption of autophagy flux, but rather a specific defect in terms of substrate selectivity. Previous studies have demonstrated that long-lived proteins are primarily degraded by starvation-induced autophagy.^{24, 37, 38} By inference, it is generally thought that selective and constitutive autophagy similarly degrades long-lived proteins. Rather, when the cells were chased two min to have both long-lived and short-lived proteins labeled, we provide here the evidence that Cd impaired the autophagy clearance of short-lived proteins, without interfering with autophagy flux of long-lived proteins (Fig. 3D and Fig. S1).

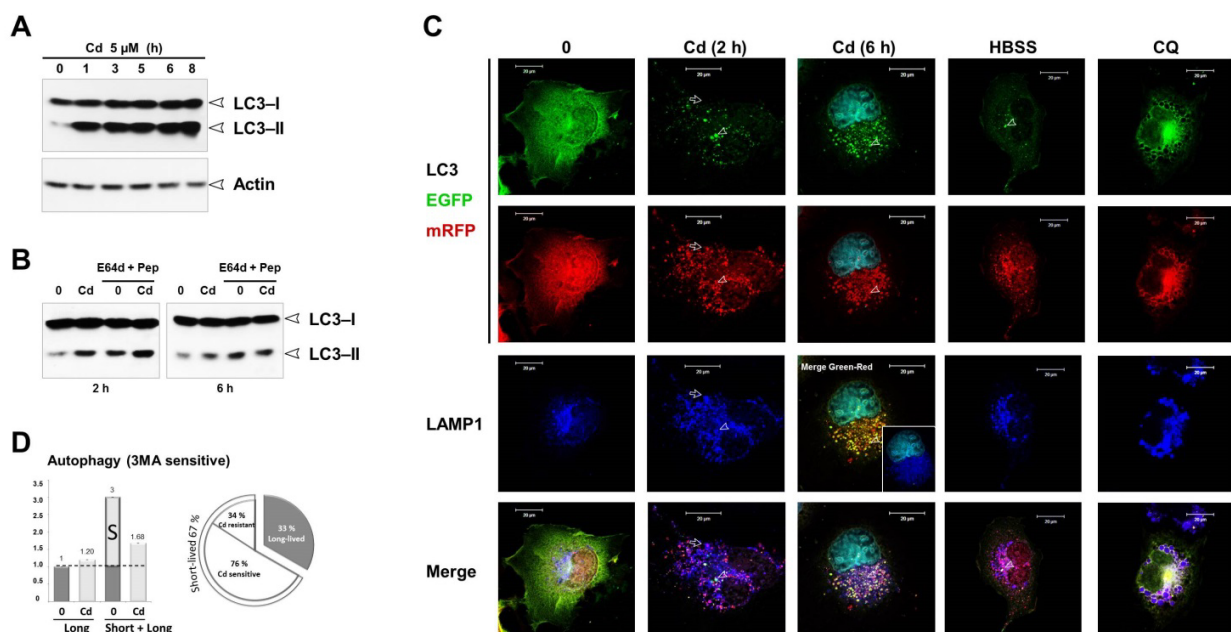


Figure 3. Cd-induced accumulation of autophagic vesicles does not reflect enhanced but rather defective autophagic degradation. The autophagy flux of Cd-treated cells was analyzed by conversion of LC3-I to LC3-II by western blotting analysis (A, B), in the absence or the presence of lysosomal protease inhibitors (B; E64d and pepstatin A; E64d + Pep; 10 μ g/ml), the transfection of pH-sensitive, tandem mRFP-EGFP-LC3 reporter (C) and the degradation of long-lived proteins (D). The positions of LC3-I and LC3-II are indicated. C. Cells were transfected with the mRFP-EGFP-LC3 plasmid, treated with Cd (5 μ M 2 and 6 h), HBSS (6 h) or chloroquine (CQ, 100 μ M, 6 h) and labeled with anti-LAMP1, a specific lysosomal marker. This strategy allows us to clearly

distinguish in Cd-treated cells (2 h) neutral autophagosomes displaying both green and red fluorescences (yellow; LAMP1 negative; arrowhead) from acidic autolysosomes with red and blue fluorescences (purple; LAMP1 positive; mRFP-LC3, because of quenching of EGFP in the acidic lysosomal environment; arrow). In CQ-treated cells, all green spots were also red and LAMP1 labeled; corresponding to neutral autolysosomes. **D.** Autophagic degradation of short-lived proteins is selectively impaired by Cd. Cells were metabolically labeled with [¹⁴C] valine and chased with 10 mM cold valine for either 2 min (to have both long-lived and short-lived proteins labeled; "Short + Long") or 16 h (only long-lived proteins were labeled; "Long"). Protein degradation during 5 h incubation in complete medium (DMEM/F12 ITS-A, constitutive) containing Cd was then measured by the release of trichloroacetic acid-soluble [¹⁴C] valine from cells, as described in Materials and Methods. Macroautophagy protein degradation was calculated by the difference between the [¹⁴C] valine release from cells treated without and with an inhibitor of macroautophagy, 3-methyladenine (3MA). Columns mean of duplicates from three representative experiments. (See Fig. S1).

The degradation of three selective autophagy markers –SQSTM1, ubiquitinated proteins, and mitochondria– is severely impaired by Cd

We therefore anticipated that the autophagy defect caused by Cd might result in the accumulation of three substrates degraded by selective autophagy that are SQSTM1, ubiquitinated proteins, and mitochondria. In agreement with impaired autophagy flux, we observed a massive accumulation of SQSTM1 in Cd-treated cells (Fig. 4A). Interestingly, SQSTM1

was detected both in the detergent-soluble and -insoluble fractions of control cells while the majority of this protein was detected in the insoluble fractions from Cd-treated cells (Fig. 4A, left panels), in parallel with accumulation of K63-linked ubiquitinated proteins and LC3-II within the aggregates (Fig. 4A, middle and right panels). Following Cd treatment, a remarkable SQSTM1 band ladder to higher molecular weights was observed only in the insoluble fraction, likely reflecting SQSTM1 ubiquitination and aggregation.³⁹

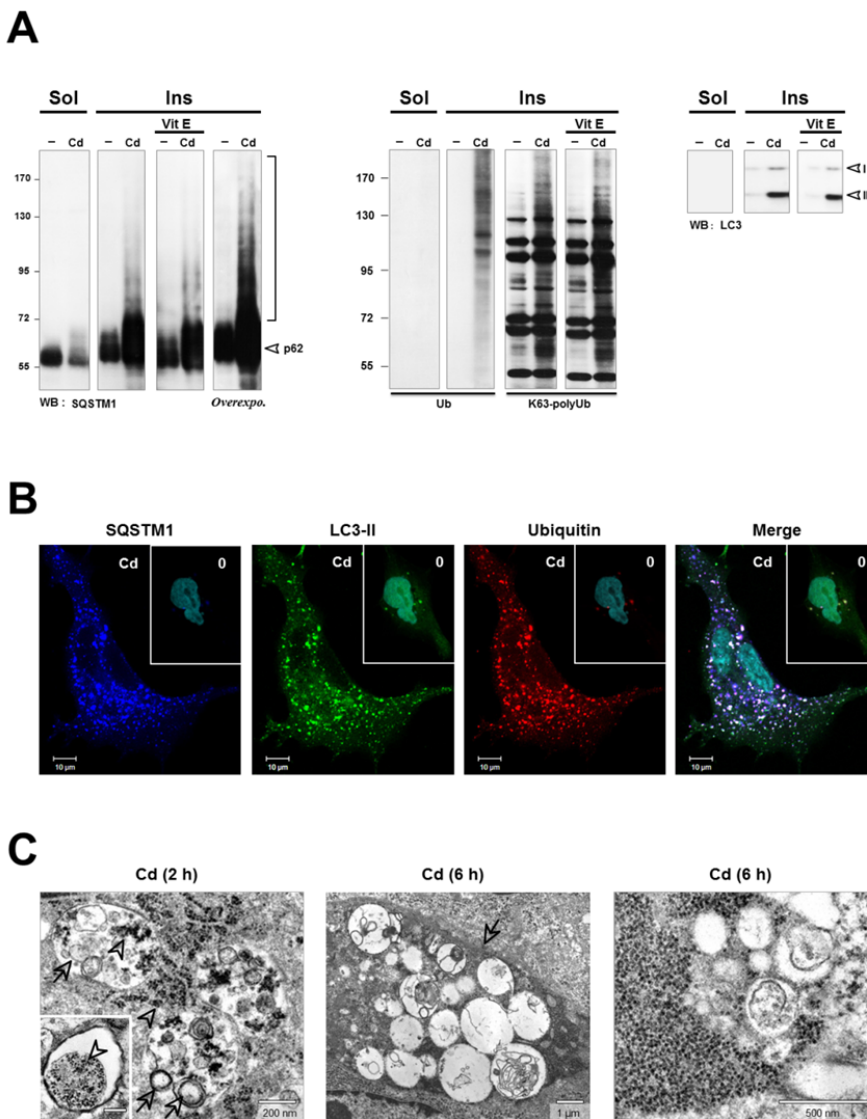


Figure 4. Accumulation of two selective autophagy markers – SQSTM1, and K63-linked ubiquitinated proteins– in response to Cd. **A.** Accumulation of SQSTM1 and ubiquitinated proteins in the insoluble fractions of Cd-treated cells. A549 lung cell lysates (0.5% Tx-100) were separated into detergent-soluble (Sol.) and insoluble (Ins.) fractions. Each fraction was subjected to SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with indicated antibodies. **B.** Cd induces the formation of Ubiquitin-, LC3-II, SQSTM1-positive inclusions. Confocal immunofluorescence analysis of Cd-treated A549 cells with anti-ubiquitin, SQSTM1, and LC3-II antibodies. Right panel shows merged image. **C.** Representative electron microscopy photographs showing the ultrastructure of Cd-treated cells (5 μM, 2 h and 6 h). At 2 h of treatment, most of the autophagic vesicles range from double membrane autophagosomes to single-membrane autolysosomes. Moreover, all autophagic vesicles contained small electron-dense aggregates; likely ubiquitinated aggregates (arrows). At 6 h, high magnifications show that electron lucent autophagic vesicles were clustered at the periphery of inclusion bodies. Little, if any, autophagosomes were found in the cytoplasm of untreated cells (n = 25, data not shown). Results are representative of three independent experiments.

To recover from injury, a long-standing hypothesis assumes that protein aggregates may sequester and protect cell from harmful misfolded and damaged proteins. Of stress, reactive oxygen species were demonstrate to drive aggregate formation through increased SQSTM1 transcription, protein ubiquitination and subsequent recruitment of LC3 to aggregates.⁴⁰ However, by the addition of Vitamin E, we have checked that the accumulation of SQSTM1, the K63-linked ubiquitination and the conversion of LC3-II in Cd-treated cells were independent of oxidative stress (Fig. 4A). Likewise, immunofluorescence analysis showed that the ubiquitinated proteins and SQSTM1 were faintly present in untreated cells (Fig. 4B, inset) but formed numerous ubiquitin- (Fig. 4B, red), and SQSTM1- (Fig. 4B, blue) positive puncta and inclusions dispersed throughout cytosol of Cd-treated cells, in contrast to juxtannuclear aggresomes reported for misfolded proteins.⁴⁰ Similarly, we observed that Cd treatment led to a severe disruption of the network of mitochondria (labeled with MitoTracker Red dye), which concentrated at site of SQSTM1 aggregates (Fig. 5, blue); consistent with the fact that SQSTM1 is an autophagy receptor for mitochondria.

Remarkably, SQSTM1, ubiquitinated proteins, and mitochondria clustered at locations that could not be distinguished from LC3 positive dots by confocal microscopy (Fig. 4B and Fig. 5, green). Likewise, by western blotting we could detect LC3-II only in the detergent-insoluble fraction of Cd-treated cells (Fig. 4A, right). These results collectively suggest that SQSTM1, LC3-II and autophagic vesicles were efficiently and selectively recruited to the inclusions bodies. To elucidate the step(s) in autophagy pathway that may be disrupted by Cd, we therefore used ultrastructural analysis (Fig. 4C and Fig. 5). High magnifications of Cd-treated cells show the formation of electron-dense inclusion bodies, likely aggregates of ubiquitinated proteins (arrowheads). At 2 h of Cd treatment, the association of ubiquitinated proteins with autophagic vesicles was clearly confirmed: small electron-dense aggregates (arrowheads) were efficiently trapped within autophagic vesicles; that also contained small electron lucent double-membrane, multivesicular and lamellar vesicles (Fig.

4C, arrows, left). However, at 6 h of treatment, when the ubiquitinated proteins accumulated, the size of the inclusion bodies increased (Fig. 4C and Fig. 5). Frequently, double-membrane vesicles, membrane remnants and mitochondria appeared to be trapped at the periphery of these large inclusions (Fig. 4C and Fig. 5). Strikingly, while the vesicles at early Cd treatment were all typical autophagic vesicles with recognizable content (Fig. 4C, right), all of vesicles clustering at the periphery of the inclusion bodies at later times were still double membraned, but appeared to be “empty” (Fig. 4C and Fig. 5, right), even if they were trapped close to proteins and mitochondria. Thus, the sequestration of autophagic vesicles within the aggregates likely hampered the maturation of autophagosome.

In line with these results, a comprehensive analysis of the pharmacological inhibition of autophagy confirmed that constitutive- and starvation induced- autophagies targeted different types of cargo. Inhibition of autophagy degradation by bafA1 or CQ treatment similarly drove robust accumulation of K63-linked ubiquitinated proteins, SQSTM1 and LC3-II within detergent insoluble aggregates in serum and nutrient-rich (constitutive) but not in starved conditions (HBSS; Fig. 6A-C). Likewise, bafA1 treatment led to the massive accumulation of ubiquitinated proteins into autolysosomes in rich conditions, while it had no effect when cells were starved (Fig. 6D). This supports the notion that ubiquitinated proteins are selective targets for constitutive autophagy. Yet bafA1 treatment was able to inhibit autophagy degradation in both conditions, as evidenced at ultrastructural level by the accumulation of single membrane autolysosomes with undigested electron-dense bodies (Fig. 6E-F, inset). We then confirmed that constitutive autophagy selectively handled primarily short-lived proteins, while starvation-induced autophagy degraded primarily long-lived proteins in agreement with²⁴ (Fig. 6G and Fig. S2). Of note, bafA1 inhibited degradation of both long-lived and short-lived proteins, in contrast to Cd. Our data therefore uncover the carcinogen Cd as a unique inhibitor of selective autophagy.

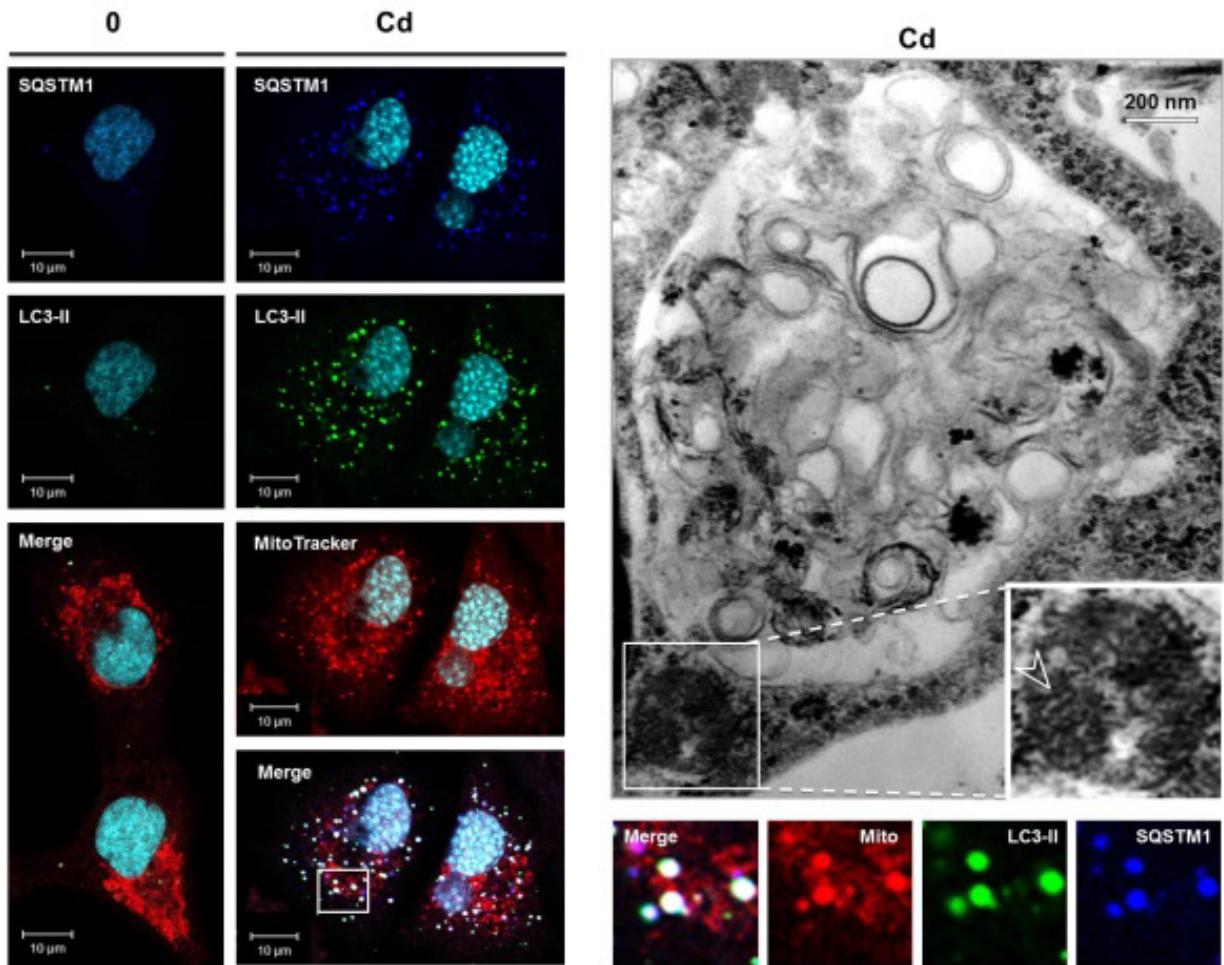


Figure 5. The Cd-induced autophagy defect is characterized by the formation of inclusion bodies that trap electron lucent vesicles and mitochondria. Left, shown are representative fluorescence micrographs of control (0) and Cd-treated A549 cells stained with MitoTracker (localizes to mitochondria, red), SQSTM1 (detects inclusion bodies, blue) and LC3-II (detects autophagic vesicles, green). Inset, mitochondria clusters colocalized with SQSTM1 and LC3-II in Cd-treated cells in contrast to the untreated cells. Right, representative electron microscopy photograph of Cd-treated cells showing the formation of a dense granular aggregate that trapped electron lucent autophagic vesicles and mitochondria (with disorganized cristae, arrowhead) at its periphery.

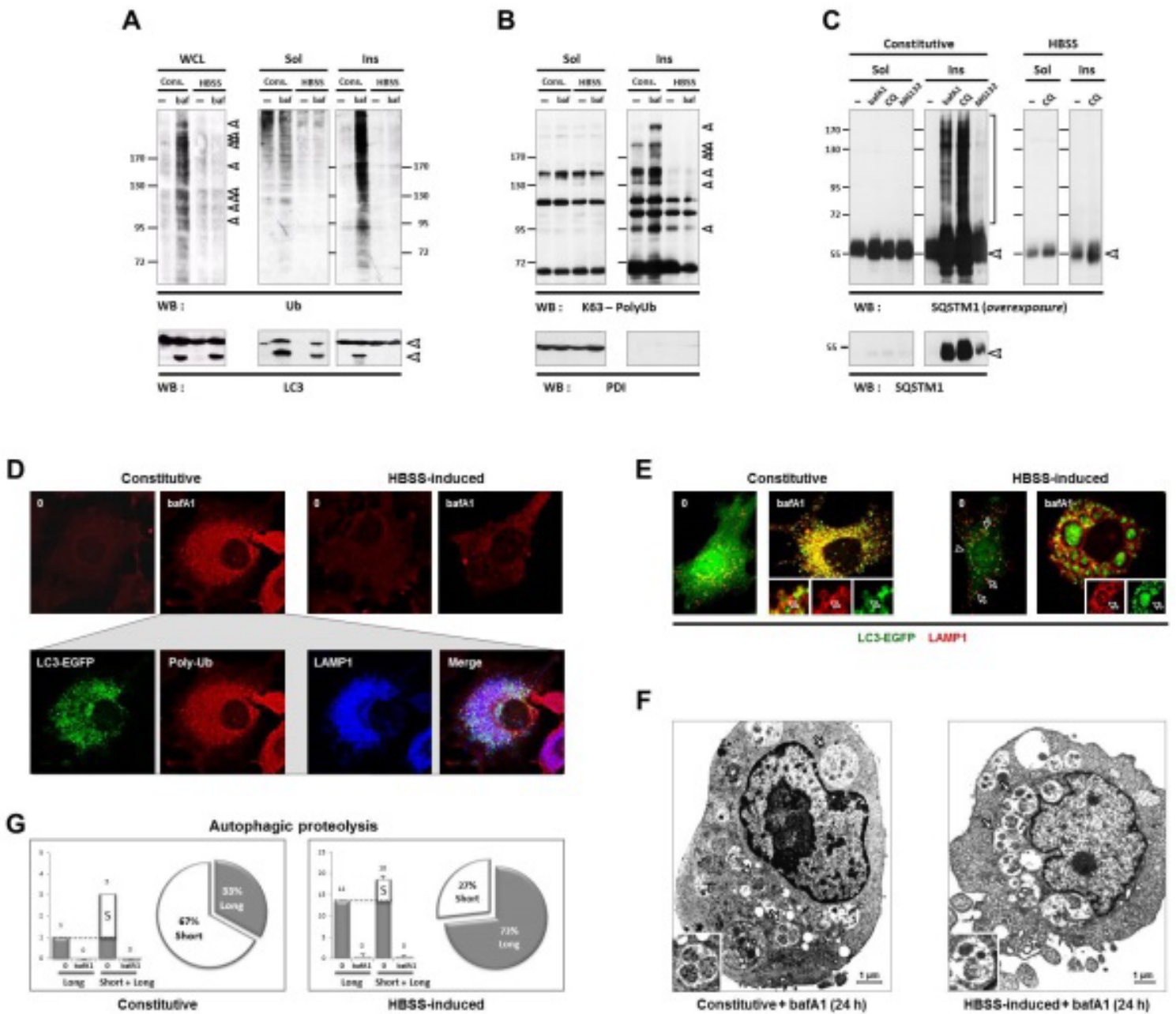


Figure 6. Specific degradation of ubiquitinated proteins by the constitutive autophagy. To achieve sequestration and accumulation of substrates within autolysosomal structures, autophagy was inhibited at the degradation step in Sertoli cells (A, D-G) and A549 cells (B-C) using bafilomycin A1 (bafA1, 100 nM) or chloroquine (CQ, 100 μ M) in rich- (constitutive or cons.) or starved conditions (HBSS). The effects were then determined on the accumulation of ubiquitinated protein aggregates (A, B, D, 24 h), their localization within autolysosomes (LC3-EGFP and LAMP1 positive; fluorescence images, D-E), and the defective degradation of SQSTM1 (C, 24 h), LC3-II (A, 24 h), long-lived and short lived proteins (G, 5 h). Note at ultrastructural level, the accumulation of single membrane autolysosomes with dense undigested bodies (arrows; inset; F, 24 h) in both conditions. (See Figure S2).

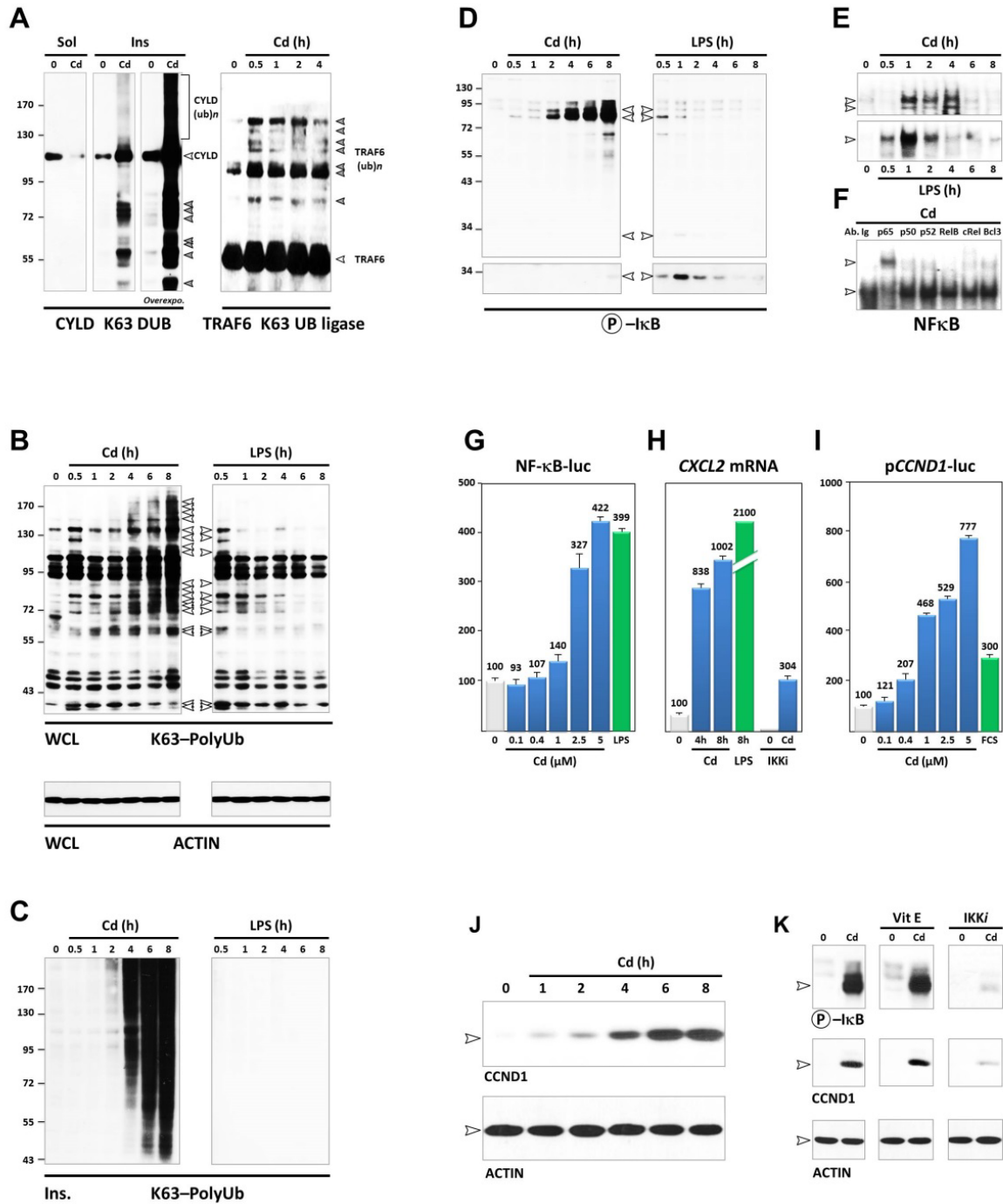


Figure 7. Cd induces sustained activation of NF-κB pathway. PCT cells were treated with Cd and LPS (5 μg/ml, used as a positive control) for the indicated times in the presence or absence of Vit E, IKK inhibitor (sc-514; 100 μM) or vehicle. WCL (B, D, J, K), immunoprecipitates (TRAF6, A), detergent (0.5% Tx-100)-soluble (Sol, A) and insoluble (Ins, A, C) fractions were subjected to immunoblotting with antibodies against CYLD (COS7 transfected cells, A), TRAF6 (A), K63-PolyUb (B-C), Phospho-IκB (P-IκB, D) and CCND1/Cyclin D1 (J-K). E. Top panel. Representative EMSA demonstrates time-course of Cd-induced NF-κB activity. Two Cd-inducible NF-κB DNA binding complexes were detected. F. Characterization of Cd-induced NF-κB DNA binding complexes by supershift assays with the indicated antibodies. The results are representative of two independent experiments. G-I. NF-κB transcriptional activity was determined in PCT cells transfected with a κB-dependent- (G) or Cyclin D1-promoter- (I) luciferase reporter plasmids, before being treated for 8 h with 5 μM Cd. The transcriptional activity was evaluated by a firefly luciferase activity, which was normalized to that of *Renilla*. Results are averages of three experiments ± standard deviation (SD). H. Right panel. Real-time RT-PCR was performed to measure the abundance of *CXCL2* mRNA.

Cd induces a sustained activation of NF- κ B pathway

A prediction of the above data is that Cd would aberrantly activate signaling pathways critically dependent on K63-linked ubiquitination such as the NF- κ B pathway.^{5, 6} Several studies have documented the activation of NF- κ B by Cd (for review²⁶), but the underlying mechanism remains unknown. Besides autophagy, the other tumor suppressor that constitutively takes in check the NF- κ B pathway is the K63 deubiquitinase CYLD, which removes K63-linked ubiquitin chains from TRAF6^{9, 41, 42}. As shown in Figure 7A, we found that Cd lowered the cytosolic levels of soluble CYLD protein and led to its accumulation within the detergent-insoluble fraction (left). In addition to aggregation, Cd induced CYLD inactivation; as evidenced by dramatic increases in high molecular-weight (likely ubiquitinated) forms of CYLD and the cleavage of CYLD into several inactive fragments of ~ 72, 50 and 40 kDa;⁴³ two events that were not recapitulated upon proteasomal inhibition (data not shown). These results indicate that Cd reduced CYLD availability and likely its K63 DUB function.

As a readout of CYLD inactivation, Cd induced the accumulation of high-molecular-weight (likely ubiquitinated) forms of K63 ubiquitin ligase TRAF6, a marker of activation⁴⁴ (Fig. 7A, right). Analysis of WCL by anti-K63 polyUb Western blotting revealed that Cd induced at 30 min K63 ubiquitination of several cellular proteins of 170, 120, 80, 57, and 40 kDa, a pattern similar to that we observed at 30 min in LPS-stimulated PCT cells (Fig. 7B). Moreover, ubiquitination of cellular substrates started at 30 min of Cd treatment, and lasted 8h. Most of the ubiquitinated proteins were aggregated into detergent-insoluble bodies in Cd treated cells (Fig. 7C). Such robust and sustained ubiquitination distinguished the carcinogen Cd from LPS and the other cytokines and growth factors studied so far.

Downstream, we first assessed NF- κ B activation by quantifying increases in phosphorylation of I κ B α . Cd stimulation induced a sustained and hyper-phosphorylation of I κ B α that started at 1 h and lasted 8 h (Fig. 7D). In contrast, LPS treatment resulted in transient I κ B α phosphorylation at 0.5 h that returned to baseline levels after 2 h.

Interestingly, in Cd-treated cells, we detected a high molecular weight of phosphorylated I κ B α , likely phosphorylated and ubiquitinated form (Fig. 7D, upper). These findings suggested that I κ B α might undergo phosphorylation, ubiquitination but not degradation in Cd-treated cells. In this regard, the recent observation that phosphorylated I κ B α may be a substrate of selective autophagy is of great interest.⁴⁵ The phosphorylation and ubiquitination of I κ B α appeared to be dependent on IKK β as both were blocked by a selective IKK2 inhibitor, sc-514 (Fig. 7K). Therefore, Cd resulted in the sustained activation of NF- κ B signaling pathway in PCT cells, in contrast to LPS.

The timing of IKK activation correlated with the time-course of NF- κ B activation observed in the gel shift assays (Fig. 7E). Cd-induced NF- κ B activation occurred within 1h and was sustained for at least 4h (Fig. 7E, top). Two Cd-stimulated NF- κ B-binding complexes were detected in nuclear extracts: a minor slower migrating band, and a major band, which migrated with higher mobility (Fig. 7E). Electrophoretic mobility supershift analyses revealed that p65 and at lesser levels p50, p52, cRel and Bcl3 antibodies did retard the migration of the complex band, indicating that p65 heterodimers were induced in response to Cd (Fig. 7F). These results were confirmed by transfection of an NF- κ B-driven reporter (Fig. 7G) and the downstream robust mRNA expression of the inflammatory chemokine CXCL2 (10-fold of control value; Fig. 7H).

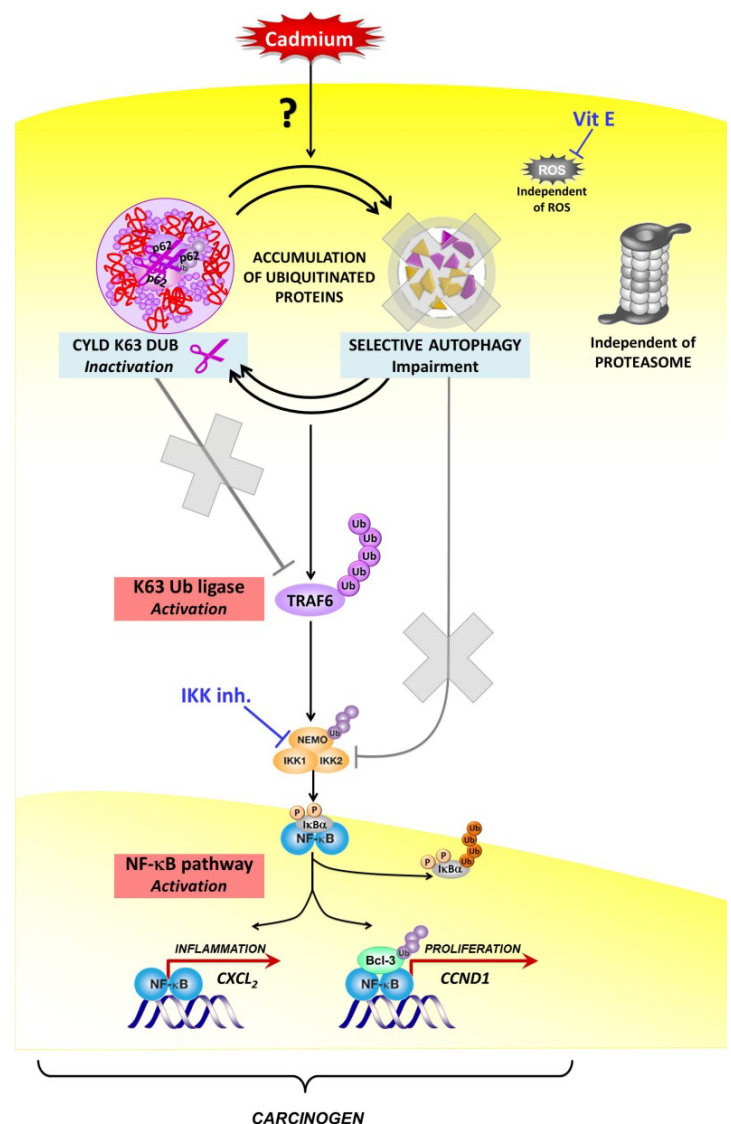
As a third marker of NF κ B activation, we measured the levels of CCND1 (Cyclin D1), another NF- κ B-responsive gene. In agreement, Cd induced a strong activation of CCND1 promoter (Fig. 7I) and the expression of CCND1 protein (Fig. 7J), with a time course that paralleled Cd-induced NF- κ B activation. Of interest, treatment with the IKK inhibitor completely blocked Cd-induced NF- κ B activation, – CXCL₂ and CCND1 expressions (Fig. 7H and 7K). Interestingly, ROS were again not involved in Cd-induced NF- κ B pathway from K63 ubiquitination, I κ B α phosphorylation, to the downstream CCND1 and CXCL2 expressions (Fig. 7K). This demonstrated that these low Cd doses were able to activate the K63-linked ubiquitin-dependent NF- κ B signaling leading to inflammation and cell proliferation.

Discussion

To our knowledge, Cd is the first example of a carcinogen that induces K63-linked ubiquitination, CYLD inactivation, and specific impairment of selective autophagy. Of interest, both CYLD and autophagy are tumor suppressors that constitutively keep in check spontaneous K63-linked ubiquitination, and thereby downstream inappropriate activation of NF- κ B signaling (for reviews ^{46, 47}). Up to now, CYLD and many components of autophagy machinery are known to be downregulated or mutated in a broad list of cancers (including melanoma, myeloma, glioma, colon, and lung cancers) and inflammatory diseases ^{46, 48}. However, little is known about how these two tumor suppressors are inactivated by carcinogens. Recently, the formation of protein aggregates; generally associated with neurodegenerative diseases, turns out to play a significant role in cancer by the sequestration and inactivation of p53 tumor suppressor family members.⁴⁹ Our data now suggest a model in which the carcinogen Cd induces the formation of ubiquitinated aggregates that sequester and inactivate simultaneously CYLD and the selective autophagy, creating a vicious cycle which could further amplify K63-linked ubiquitination and downstream activation of NF- κ B pathway, processes that directly have an impact upon cancer progression and aggressiveness (Fig. 8).

Although the priming event behind Cd-induced protein aggregation remains to be identified, we show here that Cd induced the accumulation of SQSTM1, an autophagy substrate that has the remarkable ability to self-assemble, to bind K63-linked ubiquitinated proteins and form aggregates, as frequently observed in human tumors. Indeed, growing lines of evidence indicate that SQSTM1 is essential for the development of K-RAS-induced lung and pancreatic ductal adenocarcinomas.^{50, 51} At molecular level, the accumulation of SQSTM1 can attenuate the activity of its partners through aggregate formation.^{52, 53} Of, it has been demonstrated that SQSTM1 sequesters and inhibits the E3 ubiquitin ligase responsible for degrading Nrf2, a transcription factor essential for tumor growth and interestingly stabilized by Cd.^{25, 53} Remarkably, we provide here the first evidence that the activity of CYLD deubiquitinase, another constitutive partner of SQSTM1,⁵⁴ is repressed by Cd via ubiquitination,

processing, and aggregation. Previous studies have indicated that human papilloma virus a well-established carcinogen promotes oncogenic NF- κ B activation through ubiquitination and degradation of CYLD.⁵⁵ Reduction in CYLD protein level has also observed in TNF- α -stimulated cells infected with Sendai viruses.⁵⁶ However, these studies did not determine whether viral infections or TNF- α -treatment, three modulators of autophagy, may affect CYLD activity by aggregation. Thus, it is conceivable that the autophagy impairment and the subsequent SQSTM1 aggregation could be key aspects of Cd carcinogenic power, leading to CYLD loss-of-function and activation of NF- κ B pathway.



Chargui & Belaid *et al.* Figure

Figure 8. Working model depicting how the carcinogen Cd subverts the selective autophagy and CYLD, leading to massive K63-linked ubiquitination, and downstream activation of NF- κ B pathway.

Even though the tumor suppressive function of autophagy was first described in 2003^{11, 12}, the roles of constitutive/selective and inducible autophagies in cancer remain poorly understood. The comprehensive analyses of Cd and bafA1 autophagy defects challenge the “quantitative” model in which the basal and inducible autophagies degrade the same cargo, which are long-lived proteins. Rather, we provide evidence of differences in the nature of cargo targeted by each of these types of autophagy. Cd and bafA1 similarly induced the accumulation of three substrates selectively degraded by autophagy –K63-linked ubiquitinated proteins, SQSTM1 and mitochondria–; this occurred however only in nutrient-rich conditions. Failure to eliminate these selective cargos was not due to alterations in the “general” autophagy process, as degradation of long-lived proteins occurred normally. Our data therefore support a “qualitative” model in which the basal autophagy ensures the selective clearance of ubiquitinated primarily short-lived cargo that switches to bulk degradation of non-ubiquitinated long-lived proteins upon nutrient starvation.

The specific disruption of constitutive/selective autophagy we highlight here with Cd may be a key event in carcinogenesis. In support of this hypothesis, malignant cells frequently display lower levels of basal autophagic activity than their normal counterparts.⁵⁷ As a safeguard mechanism against cancer, selective autophagy can dispose of old and damaged organelles, such as mitochondria, which would otherwise cause genotoxic stress resulting in DNA mutations. We recently provide the first evidence that selective autophagy negatively regulates signaling pathways by degrading active proteins.^{22, 58} Notably, autophagy switches off the NF- κ B pathway through degradation of multiple NF- κ B signaling intermediaries, including IKK α , IKK β , IKK γ , BCL10 and RELA/p65.⁴⁷ A new paradigm is therefore emerging in which there are two types of autophagy, that are, constitutive/selective and starvation-induced autophagy, which fulfill distinct functions in cancer: only constitutive autophagy may prevent tumor initiation, and later once the cancer is established, the inducible pro-tumoral autophagy is dramatically upregulated to meet the needs of cancer cells.

Nowadays, it is difficult to predict whether blocking autophagy, with the current strategies, will offer specific blockage of the pro-tumor arm of

autophagy without affecting the tumor suppressive arm, thereby giving rise to new tumors elsewhere in the body. In that respect, our study highlights that Cd-induced K63-linked ubiquitination and subsequent protein aggregates disrupted specifically the availability and the activity of constitutive/selective autophagy, offering new links with tumor suppression. Importantly, K63-linked ubiquitination emerges as a master regulator of autophagy. At the heart, the TRAF6 ubiquitin ligase, one Cd target, was reported to promote the activation of mTORC1,⁵⁹ of ULK1,⁶⁰ of BECN1⁶¹ and also the formation of ubiquitinated aggregates.⁶² Given that the bulk degradation of long-lived proteins was not affected, we assume that Cd-induced ubiquitination may disturb the recruitment of yet-to-be-identified selective autophagic machinery. Elucidation of the mechanisms governing Cd-induced autophagy defect will offer new insights into aggregation diseases and therapeutic avenues aimed at specifically restoring constitutive autophagy.

References

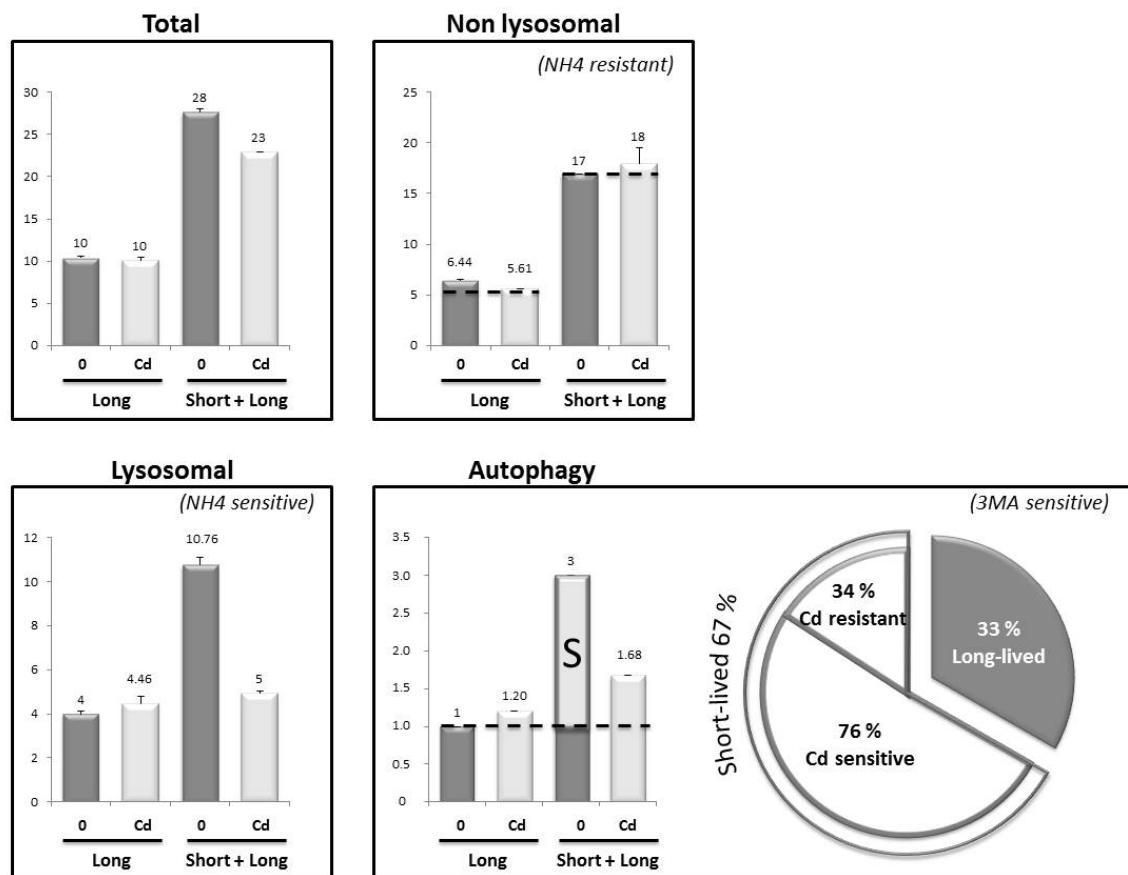
- Ciechanover A. Intracellular protein degradation: From a vague idea, through the lysosome and the ubiquitin–proteasome system, and onto human diseases and drug targeting (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 2005; 44:5944–67.
- Mukhopadhyay D, Riezman H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 2007; 315:201–5.
- Xu P, Duong DM, Seyfried NT, Cheng D, Xie Y, Robert J, et al. Quantitative Proteomics Reveals the Function of Unconventional Ubiquitin Chains in Proteasomal Degradation. *Cell* 2009; 137:133–45.
- Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin–proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 2002; 82:373–428.
- Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 2001; 412:346–51.
- Chen ZJ. Ubiquitination in signaling to and activation of IKK. *Immunol Rev* 2012; 246:95–106.
- Hofmann RM, Pickart CM. Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* 1999; 96:645–53.
- Kraft C, Peter M, Hofmann K. Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat Cell Biol* 2010; 12:836–41.
- Sun SC. CYLD: a tumor suppressor deubiquitinase regulating NF- κ B activation and diverse biological processes. *Cell Death Differ* 2010; 17:25–34.
- Wong E, Bejarano E, Rakshit M, Lee K, Hanson HH, Zaarur N, et al. Molecular determinants of selective clearance of protein inclusions by autophagy. *Nat Commun* 2012; 3:1240.
- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 2003; 112:1809–20.
- Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:15077–82.
- Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:961–7.

Specific disruption of selective autophagy by the carcinogen Cadmium

- IARC. Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Lyon, France, 1993:119-238.
- NTP. (National Toxicology Program). Tenth Report on Carcinogens, Department of Health and Human Services. III-42-III-44. Research Triangle Park, 2000.
- Dong Z, Wang L, Xu J, Li Y, Zhang Y, Zhang S, et al. Promotion of autophagy and inhibition of apoptosis by low concentrations of cadmium in vascular endothelial cells. *Toxicol In Vitro* 2009; 23:105-10.
- Di Gioacchino M, Petrarca C, Perrone A, Farina M, Sabbioni E, Hartung T, et al. Autophagy as an ultrastructural marker of heavy metal toxicity in human cord blood hematopoietic stem cells. *Sci Total Environ* 2008; 392:50-8.
- Romero D, Gómez-Zapata M, Luna A, García-Fernández AJ. Morphological characterisation of BGM (Buffalo Green Monkey) cell line exposed to low doses of cadmium chloride. *Toxicol In Vitro* 2003; 17:293-9.
- Wang SH, Shih YL, Ko WC, Wei YH, Shih C. Cadmium-induced autophagy and apoptosis are mediated by a calcium signaling pathway. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:3640-52.
- Chargui A, Zekri S, Jacquillet G, Rubera I, Ilie M, Belaid A, et al. Cadmium-induced autophagy in rat kidney: an early biomarker of subtoxic exposure. *Toxicol Sci* 2011; 121:31-42.
- L'hoste S, Chargui A, Belfodil R, Duranton C, Rubera I, Mograbi B, et al. CFTR mediates cadmium-induced apoptosis through modulation of ROS level in mouse proximal tubule cells. *Free Radic Biol Med* 2008; 46:1017-31.
- Belaid A, Cerezo M, Chargui A, Corcelle-Termeau E, Pedetour F, Giuliano S, et al. Autophagy plays a critical role in the degradation of active RHOA, the control of cell cytokinesis, and genomic stability. *Cancer Res* 2013; 73:4311-22.
- Corcelle E, Nebout M, Bekri S, Gauthier N, Hofman P, Poujeol P, et al. Disruption of autophagy at the maturation step by the carcinogen lindane is associated with the sustained mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activity. *Cancer Res* 2006; 66:6861-70.
- Fuertes G, Villarroya A, Knecht E. Role of proteasomes in the degradation of short-lived proteins in human fibroblasts under various growth conditions. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35:651-64.
- Stewart D, Killeen E, Naquin R, Alam S, Alam J. Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J Biol Chem* 2003; 278:2396-402.
- Thevenod F. Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be? *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 238:221-39.
- Figueiredo-Pereira ME, Cohen G. The ubiquitin/proteasome pathway: friend or foe in zinc-, cadmium-, and H₂O₂-induced neuronal oxidative stress. *Mol Biol Rep* 1999; 26:65-9.
- Figueiredo-Pereira ME, Li Z, Jansen M, Rockwell P. N-acetylcysteine and celecoxib lessen cadmium cytotoxicity which is associated with cyclooxygenase-2 up-regulation in mouse neuronal cells. *J Biol Chem* 2002; 277:25283-9.
- Uekusa H, Namimatsu M, Hiwatashi Y, Akimoto T, Nishida T, Takahashi S, et al. Cadmium interferes with the degradation of ATF5 via a post-ubiquitination step of the proteasome degradation pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 380:673-8.
- Yu X, Hong S, Faustman EM. Cadmium-induced activation of stress signaling pathways, disruption of ubiquitin-dependent protein degradation and apoptosis in primary rat Sertoli cell-gonocyte cocultures. *Toxicol Sci* 2008; 104:385-96.
- Othumpangat S, Kashon M, Joseph P. Eukaryotic translation initiation factor 4E is a cellular target for toxicity and death due to exposure to cadmium chloride. *J Biol Chem* 2005; 280:25162-9.
- Thévenod F, Friedmann JM. Cadmium-mediated oxidative stress in kidney proximal tubule cells induces degradation of Na⁺/K⁺-ATPase through proteasomal and endo-/lysosomal proteolytic pathways. *FASEB J* 1999; 13:1751-61.
- Li Z, Arnaud L, Rockwell P, Figueiredo-Pereira ME. A single amino acid substitution in a proteasome subunit triggers aggregation of ubiquitinated proteins in stressed neuronal cells. *J Neurochem* 2004; 90:19-28.
- Herak-Kramberger CM, Brown D, Sabolic I. Cadmium inhibits vacuolar H(+)-ATPase and endocytosis in rat kidney cortex. *Kidney Int* 1998; 53:1713-26.
- Messner B, Ploner C, Laufer G, Bernhard D. Cadmium activates a programmed, lysosomal membrane permeabilization-dependent necrosis pathway. *Toxicol Lett* 2012; 212:268-75.
- Medicherla B, Goldberg AL. Heat shock and oxygen radicals stimulate ubiquitin-dependent degradation mainly of newly synthesized proteins. *J Cell Biol* 2008; 182:663-73.
- Mortimore GE, Poso AR. Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply. *Annu Rev Nutr* 1987; 7:539-64.
- Fuertes G, Martin De Llano JJ, Villarroya A, Rivett AJ, Knecht E. Changes in the proteolytic activities of proteasomes and lysosomes in human fibroblasts produced by serum withdrawal, amino-acid deprivation and confluent conditions. *Biochem J* 2003; 375:75-86.
- Leu JI, Pimkina J, Frank A, Murphy ME, George DL. A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70. *Mol Cell* 2009; 36:15-27.
- Fujita K, Maeda D, Xiao Q, Srinivasula SM. Nrf2-mediated induction of p62 controls Toll-like receptor-4-driven aggresome-like induced structure formation and autophagic degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:1427-32.
- Trompouki E, Hatzivassiliou E, Tschirtz T, Farmer H, Ashworth A, Mosialos G. CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature* 2003; 424:793-6.
- Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, Israel A, Wallach D, Courtois G. The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature* 2003; 424:801-5.
- Staal J, Driege Y, Bekaert T, Demeyer A, Muyliaert D, Van Damme P, et al. T-cell receptor-induced JNK activation requires proteolytic inactivation of CYLD by MALT1. *Embo J* 2011; 30:1742-52.
- Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, et al. Activation of the IkkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 2000; 103:351-61.
- Jia L, Gopinathan G, Sukumar JT, Gribben JG. Blocking autophagy prevents bortezomib-induced NF-kappaB activation by reducing I-kappaBalpha degradation in lymphoma cells. *PLoS One* 2012; 7:e32584.
- Massoumi R. Ubiquitin chain cleavage: CYLD at work. *Trends Biochem Sci* 2010; 35:392-9.
- Belaid A, Ndiaye PD, Cerezo M, Cailleteau L, Brest P, Klionsky DJ, et al. Autophagy and SQSTM1 on the RHOA(d) again: emerging roles of autophagy in the degradation of signaling proteins. *Autophagy* 2013; [Epub ahead of print].
- Brest P, Corcelle EA, Cesaro A, Chargui A, Belaid A, Klionsky DJ, et al. Autophagy and Crohn's disease: at the crossroads of infection, inflammation, immunity, and cancer. *Curr Mol Med* 2010; 10:486-502.
- Xu J, Reumers J, Couceiro JR, De Smet F, Gallardo R, Rudyak S, et al. Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nat Chem Biol* 2011; 7:285-95.
- Duran A, Linares JF, Galvez AS, Wikenheiser K, Flores JM, Diaz-Meco MT, et al. The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell* 2008; 13:343-54.
- Ling J, Kang Y, Zhao R, Xia Q, Lee DF, Chang Z, et al. KrasG12D-induced IKK2/beta/NF-kappaB activation by IL-1alpha and p62 feedforward loops is required for development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2012; 21:105-20.
- Rantanen K, Pursiheimo JP, Hogel H, Miikkulainen P, Sundstrom J, Jaakkola PM. p62/SQSTM1 regulates cellular oxygen sensing by attenuating PHD3 activity through aggregate sequestration and enhanced degradation. *J Cell Sci* 2013; 126:1144-54.
- Lau A, Wang XJ, Zhao F, Villeneuve NF, Wu T, Jiang T, et al. A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62. *Mol Cell Biol* 2010; 30:3275-85.

Specific disruption of selective autophagy by the carcinogen Cadmium

54. Jin W, Chang M, Paul EM, Babu G, Lee AJ, Reiley WW, et al. Deubiquitinating enzyme CYLD regulates RANK signaling and osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 2008; 118:1858-66.
55. An J, Mo D, Liu H, Veena MS, Srivatsan ES, Massoumi R, et al. Inactivation of the CYLD deubiquitinase by HPV E6 mediates hypoxia-induced NF-kappaB activation. *Cancer Cell* 2008; 14:394-407.
56. Friedman CS, O'Donnell MA, Legarda-Addison D, Ng A, Cardenas WB, Yount JS, et al. The tumour suppressor CYLD is a negative regulator of RIG-I-mediated antiviral response. *EMBO Rep* 2008; 9:930-6.
57. Gunn JM, Clark MG, Knowles SE, Hopgood MF, Ballard FJ. Reduced rates of proteolysis in transformed cells. *Nature* 1977; 266:58-60.
58. Belaid A, Ndiaye PD, Klionsky DJ, Hofman P, Mograbi B. Signalphagy: scheduled signal termination by macroautophagy. *Autophagy* 2013; [Epub ahead of print].
59. Linares JF, Duran A, Yajima T, Pasparakis M, Moscat J, Diaz-Meco MT. K63 Polyubiquitination and Activation of mTOR by the p62-TRAF6 Complex in Nutrient-Activated Cells. *Mol Cell* 2013; 51:283-96.
60. Nazio F, Strappazon F, Antonioli M, Bielli P, Cianfanelli V, Bordi M, et al. mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nat Cell Biol* 2013; 15:406-16.
61. Shi CS, Kehrl JH. TRAF6 and A20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of Beclin-1 to control TLR4-induced autophagy. *Sci Signal* 2010; 3:ra42.
62. Zucchelli S, Codrich M, Marcuzzi F, Pinto M, Vilotti S, Biagioli M, et al. TRAF6 promotes atypical ubiquitination of mutant DJ-1 and alpha-synuclein and is localized to Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease brains. *Hum Mol Genet* 2010; 19:3759-70.



Supplemental figures

Figure S1. Cd selectively impairs autophagy but not proteasomal degradation. (Related to Fig. 1D and Fig. 3D) PCT cells were metabolically labeled with [¹⁴C] valine and chased with 10 mM cold valine for either 2 min (to have both long-lived and short-lived proteins labeled; "Short + Long") or 16 h (only long-lived proteins were labeled; "Long"). After labeling and chase, cells were treated with Cd (5 μM) in complete serum- and amino acid-supplemented media during 5 h. Where indicated, cells were either untreated (total) or treated with the specific autophagy inhibitor 3MA (10 mM) to measure the contribution of autophagy (difference between total- and 3MA-resistant-proteolysis). In parallel, cells were cultured with 20 mM NH₄Cl to obtain the lysosomal (difference between total- and the NH₄Cl-resistant-proteolysis) and nonlysosomal proteolysis (proteasomal, NH₄Cl-resistant). Error bars represent the mean ± standard deviation of three independent repeats.

CONSTITUTIVE DEGRADATION

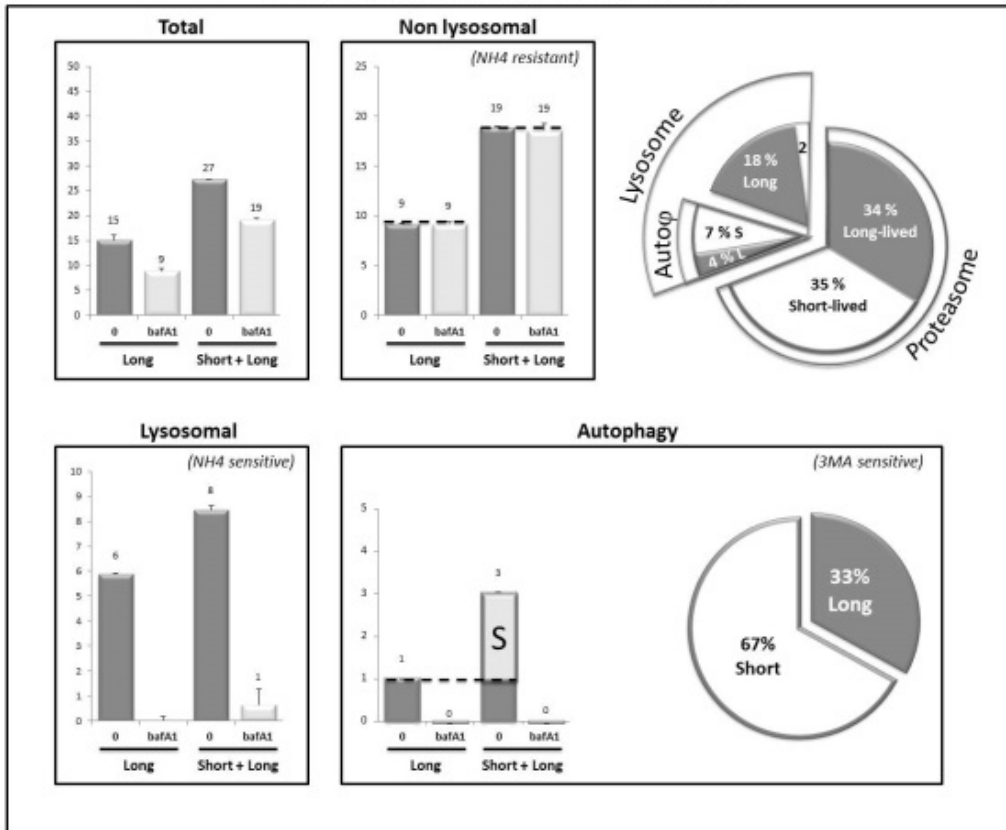


Figure S2. Role of autophagy in the degradation of short-lived proteins. (Related to Fig. 6G) PCT cells were metabolically labeled with [¹⁴C] valine and chased with 10 mM cold valine for either 2 min (to have both long-lived and short-lived proteins labeled; “Short + Long”) or 16 h (only long-lived proteins were labeled; “Long”). After labeling and chase, cells were treated with bafA1 (100 nM) in serum- and amino acid-supplemented (constitutive) or -deprived (starvation) media during 5 h. Shown are the contribution of autophagy, of other lysosomal and non-lysosomal (proteasome) pathways to the degradation of short-lived and long-lived proteins. Error bars represent the mean ± standard deviation of three independent repeats.

Articles II à IV: Signalphagie : Arrêt de la signalisation par dégradation autophagique sélective des molécules actives : mise en évidence avec RhoA-GTP



2. [Autophagy Plays a Critical Role in the Degradation of Active RHOA, the Control of Cell Cytokinesis, and Genomic Stability](#). Belaid A, Cerezo M, Chargui A, Corcelle-Termeau E, Pedeutour F, Giuliano S, Ilie M, Rubera I, Tauc M, Barale S, Bertolotto C, Brest P, Vouret-Craviari V, Klionsky DJ, Carle GF, Hofman P, Mograbi B. *Cancer Res.* 73:4311-22. **2013**.

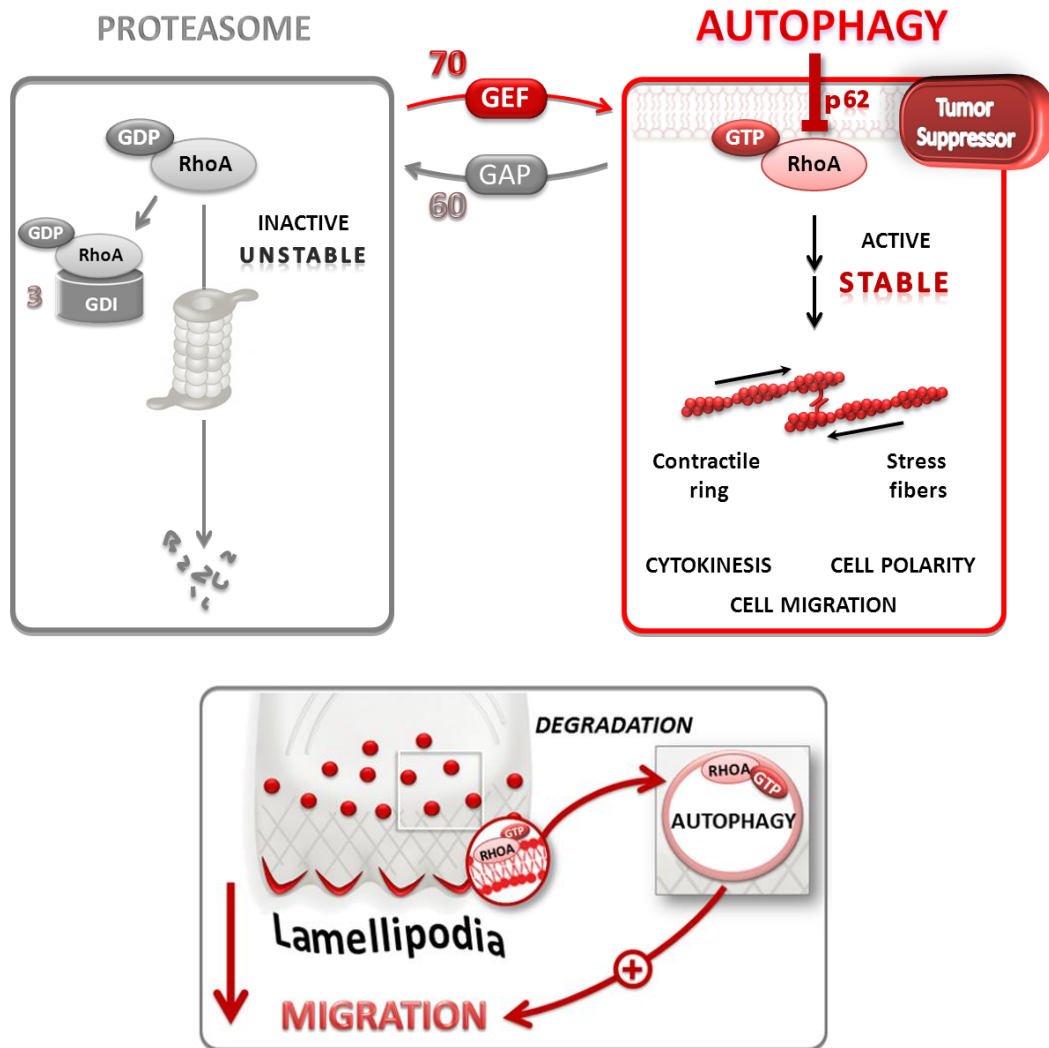
Autophagy

3. [Autophagy and SQSTM1 on the RHOA\(d\) again: emerging roles of autophagy in the degradation of signaling proteins](#). Belaid A, Ndiaye PD, Cerezo M, Cailleteau L, Brest P, Klionsky DJ, Carle GF, Hofman P, Mograbi B. *Autophagy* **2013**. [Epub ahead of print].

Autophagy

4. [Signalphagy: Scheduled signal termination by macroautophagy](#). Belaid A, Ndiaye PD, Klionsky DJ, Hofman P, Mograbi B. *Autophagy* **2013**. [Epub ahead of print].

- Parmi ces substrats, nous avons mis en évidence que l'autophagie constitutive est un «gardien du génome», qui limite dans le temps et l'espace l'activation de RHOA. RHOA une fois active est ubiquitinée, se lie à SQSTM1 et est ainsi adressée à l'autophagie. Un défaut d'autophagie sélective (quel que soit sa nature : au niveau de la formation, de la séquestration ou de la dégradation des autophagosomes) dérégule toutes les réponses cellulaires en aval de RHOA conduisant à un défaut de cytokinèse et à une instabilité génomique [article 2].
- Sur le plan moléculaire, nos résultats montrent l'importance de l'autophagie constitutive dans le contrôle de la forme active de RHOA. La régulation de RHOA est unique dans le sens qu'elle implique ~70 GEF, 60 GAP, 3 RhoGDI, ainsi que le protéasome et l'autophagie. Nous fournissons les premiers arguments, qu'en fonction de son état d'activation, RHOA utilise différentes voies pour sa dégradation: alors que le protéasome dégrade la forme cytosolique inactive, le processus autophagique dégrade spécifiquement la forme de RHOA active associée à la membrane [article 2].



- En accord avec ce scénario, nous avons démontré que l'autophagie-dépendante de SQSTM1 est essentielle aux autres fonctions de RhoA, notamment au maintien du bon niveau de RHOA au niveau du lamellipode, permettant ainsi la migration cellulaire [article 3].
- Faits marquants, l'activité de l'autophagie est inhibée dans 80 % des stades III des cancers du poumon (NSCLC, tumorothèque). Les défauts observés sont là encore des défauts de dégradation et de localisation de RHOA [article 2].

Ainsi, étant donné que l'autophagie est communément dérégulée dans les cancers (mutations, délétions et modifications épigénétiques), ce nouveau paradigme pourrait être un mécanisme général quant à la dérégulation de la signalisation de RHOA, l'acquisition d'une plus grande instabilité, et d'un caractère plus invasif propices à la progression tumorale.

Nous proposons de ce fait que l'autophagie est un suppresseur de tumeur en partie car elle maintient constitutivement à un niveau bas l'activation de RHOA. A l'appui de ce modèle, nous avons rapporté l'adressage des autolysosomes au niveau de l'anneau contractile pendant la cytokinèse, et du lamellipode pendant la migration. Ainsi, le caractère hautement dynamique de l'autophagie ainsi que sa sensibilité aux stimuli environnementaux limitera précisément dans le temps et l'espace l'activité de RHOA permettant une sortie irréversible de la mitose et une migration orientée.

Au-delà de RhoA, des données récentes suggèrent que l'autophagie régule négativement plusieurs voies de signalisation en dégradant des kinases, des acteurs clés en aval et des facteurs de transcription. Néanmoins, ceci se déroule en réponse à des stress tel que la déprivation en nutriment, l'inhibition des HSP90, l'inhibition du protéasome, la transition épithéliale mésenchymateuse, des infections et des traitements aux chimiothérapies. Notre étude est la première à rapporter la dégradation d'une molécule de signalisation en condition basale et donc à fournir des arguments en faveur de son rôle suppresseur de tumeur.

Quel que soit la molécule de signalisation à dégrader, nous avons souligné que cette dégradation autophagique met systématiquement en jeu le recrutement de SQSTM1 et la polyubiquitination K63. Nous proposons de ce fait le terme "signalphagie" à ce type particulier de macro-autophagie qui dégrade et donc maintient le bon niveau de molécules de signalisation actives [article 4].

Pathways	Substrate	Nature of Substrates	Degradation stimulated by	Degraded by	Mediated by	Consequences
GTPase	RHOA	Active	constitutive		SQSTM1, Ub	↓ Cancer – Migration – Genomic stability
Tyrosine kinases	SRC	Active	cell detachment		CBL	↑ Cancer cell viability
	RET		cell detachment		not SQSTM1 not CBL	↑ Cancer cell viability
	KIT	Inactive & Active	Hsp90 inhibition		Coloc. SQSTM1	↓ Cancer – Chemotherapy
NFκB pathway	CHUK, IKKB, IKBKG		Hsp90 inhibition			↓ Cancer – Chemotherapy
	IKKB	Active	HTLV TAX oncoprotein		Ub	
	IKKB	Active	TNF		KEAP1, Not Ub	↓ NFκB pathway
	IKBKG		Infection		Aggresome	↓ NFκB pathway
	BCL10		TCR activation		SQSTM1, Ub	↓ TCR signaling
	RELA/p65		Hepatoma CM		SQSTM1, Ub	↑ Cancer (M2 macrophage)
	NFKBIA/IκBα		Bortezomib		SQSTM1, Ub	↑ NFκB pathway
Wnt pathway	DVL2		starvation		SQSTM1, Ub	– Aggresome
	CTNNB1	Total &	rapamycin		Aggresome	
Onco proteins	PRAM1/PML-RARα	Active	all-trans retinoic acid		SQSTM1	↓ Cancer – Chemotherapy
	BCR-ABL	Active	Arsenic trioxide		SQSTM1	↓ Cancer – Chemotherapy
EMT regulators	SNAI1		Overexpression of DEDD		Coloc. SQSTM1	↓ Cancer – EMT
	TWIST		Overexpression of DEDD		Coloc. SQSTM1	↓ Cancer – EMT

: Phosphorylated Coloc. : Colocalisation : Autophagy : Proteasome : Ubiquitinated

En perspective

L'ubiquitination des protéines est une étiquette largement répandue pour réguler finement leur fonction, leur localisation et leur dégradation. Nous avons montré que RHOA est ubiquitinée et dégradée par l'autophagie *via* SQSTM1 au lieu du protéasome. Il serait donc important d'identifier l'ubiquitine ligase qui cible RHOA en vue d'être dégradée par l'autophagie sélective.

Parmi les candidats, l'ubiquitine ligase E3 et partenaire de SQSTM1, TRAF6 a été identifiée pour promouvoir l'invasion des cellules cancéreuses (carcinome de l'œsophage et gliomes), et médier l'ubiquitination des protéines de l'anneau contractile. Ainsi TRAF6 contrôlerait leur dégradation autophagique par l'intermédiaire de SQSTM1, une fois la cytokinèse accomplie (Isakson et al., 2013). Jusqu'ici, deux autres ubiquitines ligases E3, Smurf1 et le complexe Culin3/BACURD ont été rapportés pour ubiquitiner le forme inactive de RHOA, et l'adresser au protéasome pour permettre la migration cancéreuse.

Cependant, l'équipe de Beth Levine a démontré que SMURF1 n'est pas sollicitée pour réguler l'autophagie, mais est absolument requise pour la mitophagie (approche ARN interférence chez la souris) (Orvedahl et al., 2011). Ainsi, la question quant à l'identification de l'ubiquitine ligase de RHOA reste en suspens.



Cancer Research

Autophagy Plays a Critical Role in the Degradation of Active RHOA, the Control of Cell Cytokinesis, and Genomic Stability

Amine Belaid, Michaël Cerezo, Abderrahman Chargui, et al.

Cancer Res 2013;73:4311-4322. Published OnlineFirst May 23, 2013.

Updated version Access the most recent version of this article at:
doi:[10.1158/0008-5472.CAN-12-4142](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4142)

Supplementary Material Access the most recent supplemental material at:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2013/05/23/0008-5472.CAN-12-4142.DC1.html>

Cited Articles This article cites by 50 articles, 16 of which you can access for free at:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/73/14/4311.full.html#ref-list-1>

E-mail alerts [Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

Reprints and Subscriptions To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org.

Permissions To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at permissions@aacr.org.

Autophagy Plays a Critical Role in the Degradation of Active RHOA, the Control of Cell Cytokinesis, and Genomic Stability

Amine Belaid^{1,3,10}, Michaël Cerezo^{1,3,4}, Abderrahman Chargui^{1,3,10}, Elisabeth Corcelle-Termeau¹¹, Florence Pedeutour^{1,3,5,6}, Sandy Giuliano^{3,4}, Marius Ilie^{1,3,5,7,10}, Isabelle Rubera^{3,8}, Michel Tauc^{3,8}, Sophie Barale^{2,3}, Corinne Bertolotto^{3,4}, Patrick Brest^{1,3,10}, Valérie Vouret-Craviari^{1,3,10}, Daniel J. Klionsky¹², Georges F. Carle^{2,3}, Paul Hofman^{1,3,5,7,9,10}, and Baharia Mograbi^{1,3,10}

Abstract

Degradation of signaling proteins is one of the most powerful tumor-suppressive mechanisms by which a cell can control its own growth. Here, we identify RHOA as the molecular target by which autophagy maintains genomic stability. Specifically, inhibition of autophagosome degradation by the loss of the v-ATPase *a3* (*TCIRG1*) subunit is sufficient to induce aneuploidy. Underlying this phenotype, active RHOA is sequestered via p62 (SQSTM1) within autolysosomes and fails to localize to the plasma membrane or to the spindle midbody. Conversely, inhibition of autophagosome formation by *ATG5* shRNA dramatically increases localization of active RHOA at the midbody, followed by diffusion to the flanking zones. As a result, all of the approaches we examined that compromise autophagy (irrespective of the defect: autophagosome formation, sequestration, or degradation) drive cytokinesis failure, multinucleation, and aneuploidy, processes that directly have an impact upon cancer progression. Consistently, we report a positive correlation between autophagy defects and the higher expression of RHOA in human lung carcinoma. We therefore propose that autophagy may act, in part, as a safeguard mechanism that degrades and thereby maintains the appropriate level of active RHOA at the midbody for faithful completion of cytokinesis and genome inheritance. *Cancer Res*; 73(14); 4311–22. ©2013 AACR.

Introduction

Cells are faced with the tasks of dividing, of keeping the genome intact, and even of dying when appropriate. At their heart, these cell fates are dictated by tumor suppressor mechanisms. One such mechanism is autophagy, which is commonly mutated or downregulated in human cancers (1). Indeed, the essential autophagy gene *BECN1* is deleted or mutated in 40% to 75% of breast, ovarian, colon, and prostate cancers. Consistently, the notion that autophagy suppresses tumor development came from the demonstration that allelic loss of *Becn1* predisposes mice to lymphomas, hepatocellular

carcinomas, and lung carcinomas (2, 3). Likewise, defects in other autophagy genes (*Atg4c*, *Atg5*, *Uvrag*, *Ambra1*, and *Bif-1/Sh3glb1*) render cells or mice tumor prone (4–8).

Physiologically, autophagy ensures in all cell types the turnover of all organelles and most long-lived proteins by a pathway, which begins with the formation of a double-membrane compartment, termed a "phagophore" that sequesters them. The phagophore expands into a completed vesicle, an "autophagosome," and subsequently, the autophagosome rapidly fuses with a lysosome to become an "autolysosome" where the content is finally degraded. Originally identified as a housekeeping process, emerging data suggest that constitutive autophagy (i.e., under nutrient-rich conditions) might also fight cancer by limiting inflammation (9), facilitating senescence (10), or clearing signaling proteins (11). Likewise, recent studies reveal that both *BECN1* and *ATG5* function as "guardians" of cellular genome. Epithelial cells with loss of *Becn1* or *Atg5* display gene amplification and aneuploidy (7, 8). In support, activation of autophagy was shown to reduce genomic instability within hepatocarcinoma cells (12). However, despite the importance of aneuploidy in cancer development (13, 14), the mechanisms underlying how autophagy deficiency compromises genomic stability are still unknown.

To address this issue, we explored the possibility that signaling proteins essential for cell growth might be degraded by autophagy. Whereas significant advances have been made in the discovery of autophagy machinery, less is known about the nature of the autophagy substrates. Therefore, a key feature of our strategy was to inhibit the autophagy pathway at the

Authors' Affiliations: ¹Institute of Research on Cancer and Ageing of Nice (IRCAN), INSERM U1081, CNRS UMR7284, ²Laboratoire TIRO-MATOs UMR E4320, Commissariat à l'Energie Atomique, Centre Antoine Lacassagne; ³Université de Nice-Sophia Antipolis, Faculté de Médecine; ⁴INSERM U895/C3M; ⁵Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Pasteur Hospital; ⁶Laboratory of Solid Tumors Genetics; ⁷Laboratory of Clinical and Experimental Pathology; ⁸TIANP, UMR 6097; ⁹Human Biobank, Nice; ¹⁰Equipe Labellisée par l'ARC, Villejuif, France; ¹¹Cell Death and Metabolism Unit, Danish Cancer Society Research Center, Copenhagen, Denmark; and ¹²University of Michigan, Life Sciences Institute, Ann Arbor, Michigan

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Baharia Mograbi, Institute of Research on Cancer and Ageing of Nice (IRCAN); Centre Antoine Lacassagne, Avenue de Valombrose; 06107 Nice Cedex 02, France. Phone: 334-92031245; Fax: 334-92031241; E-mail: mograbi@unice.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4142

©2013 American Association for Cancer Research.

degradation step, to achieve sequestration and accumulation of substrates within autolysosomal structures (Supplementary Fig. S1A).

Materials and Methods

Cell culture and treatments

To inhibit the maturation of autophagosomes into degradative autolysosomes, renal cells derived from proximal convoluted tubules of wild-type (WT, $a3^{+/+}$) or the lysosomal v-ATPase $a3/TCIRG1$ -null mice ($a3^{-/-}$) were isolated and immortalized with the pSV3 neo vector. The renal epithelial cell lines that do or do not express $a3$ were referred to as WT and $a3^{-/-}$ cells, respectively. As controls, cells were stimulated with an inhibitor of v-ATPase activity, bafilomycin A1 (100 nmol/L, bafA1; Sigma); or a weak base that raises intralysosomal pH, chloroquine (100 μ mol/L, CQ; Sigma). Alternatively, the formation of autophagosomes was inhibited at the initiation step by *Atg5* or *Atg7* short hairpin RNA (shRNA). As a further control, we analyzed the phenotype of *Atg5* KO MEFs (provided by N. Mizushima; ref. 15) and *ATG5*-depleted A549 lung epithelial cells. We also prevented the sequestration of autophagy substrates within the autophagic vesicles by *p62* shRNA. For details on cell culture and shRNA sequences, see Supplementary Information.

Clinical samples

Primary non-small cell lung cancer (NSCLC; pairs of pathologic and control tissues from the same patient) were obtained from patients in Nice (France) and collected by the Tumor Biobank of Nice Hospital (Nice CHU, agreement 2010–06).

Analysis of autophagy

The activity of the autophagy pathway was monitored by 4 hallmarks: (i) the formation of autophagic vesicles; and the degradation of 3 well-established autophagy substrates: (ii) membrane-associated LC3-II, (iii) p62/SQSTM1, and (iv) long-lived proteins.

Ploidy determination and chromosomal abnormalities by metaphase spread

At 70% confluency, cells were arrested with colchicine (Invitrogen) in metaphase. Chromosomes were stained with Giemsa, and about 150 mitotic figures per cell line were photographed and the number of chromosomes was counted by Metafer M-Search Metaphase Finder and Ikaros softwares (Metasystems).

Time lapse video microscopy

For monitoring cell progression through mitosis, exponentially growing cells cultured in complete growth medium were imaged every 5 minutes during 18 hours on an inverted microscope (Carl Zeiss) equipped with a CO₂-equilibrated chamber.

Analysis of the RHOA pathway

The activity of RHOA pathway was monitored by (i) the levels of active GTP-bound RHO (RHOTEKIN RHO-binding domain pull-down and ELISA-based G-LISA assays, Cytoskel-

eton Inc.), (ii) the recruitment of RHOA to membranes, and (iii) the downstream phosphorylation of myosin regulatory light chain (P-MLC) and reticulation of actin cytoskeleton.

RHOA immunoprecipitation

Cells were lysed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) and RHOA was immunoprecipitated with anti-RHOA antibody (clone 26C4; Santa-Cruz Biotechnology) followed by Western blotting with anti-ubiquitin, anti-p62, anti-LC3, and anti-RHOA antibodies.

RHOA stability

HEK 293 cells and A549 cells (control, *ATG5*, or *p62* shRNA-transduced cells) were transfected with FuGene^{HD} (Promega) and plasmids encoding the active (RHOA Q63) or inactive (RHOA N19) RHOA mutants. Twenty hours after transfection, cells were treated with cycloheximide (CHX; Sigma; C-4859; 10–20 μ g/mL) to stop *de novo* protein synthesis for 7 to 57 hours, alone or in combination with proteasomal (MG132, Sigma; 10 μ mol/L) and lysosomal (CQ; 100 μ mol/L) inhibitors, and the drop in the levels of RHOA mutants was assayed by anti-myc Western blotting (Millipore; P01106; 1:1,000).

Complete and detailed description of all methods used is available as Supplementary Data.

Statistical analysis

When adequate, results are presented as means \pm SD from the indicated number *n* of separate experiments. Statistical comparisons were done using χ^2 or Student *t* tests as appropriate. *P* < 0.05 was considered significant.

Results

The V-ATPase $a3$ -dependent autophagy defect is characterized by the formation of giant multinucleate cells

To gain a deeper insight into the role of autophagy, we established cell lines from v-ATPase $a3/TCIRG1$ -null mice (16). PCT (proximal convoluted tubule) cells were chosen as they express the highest level of v-ATPase (17); the $a3$ subunit is localized in the lysosomal limiting membrane (18). In agreement with the other reported defect of v-ATPase (19, 20), we show that the $a3$ loss increased autophagy sequestration and simultaneously impaired autophagic degradation, as evidenced by the accumulation of ATG12-ATG5 conjugate, of autolysosomes and of autophagic substrates (long-lived proteins, LC3-II, and p62; Fig. 1A and Supplementary Fig. S1B). In contrast, $a3$ -null cells seemed to have functionally intact proteasomes (Supplementary Fig. S1C). Remarkably, this $a3$ -dependent autophagy defect was characterized by an increase in cell size and a flattened morphology with the accumulation of vesicles and nuclei (Fig. 1B and C), supporting the importance of autophagy in maintaining cell size (21, 22).

By using different approaches, we excluded a role for senescence as a cause of enlarged morphology (Supplementary Fig. S2). Consistently, fluorescence-activated cell-sorting (FACS) analysis revealed that $a3^{-/-}$ cells were dividing and displayed

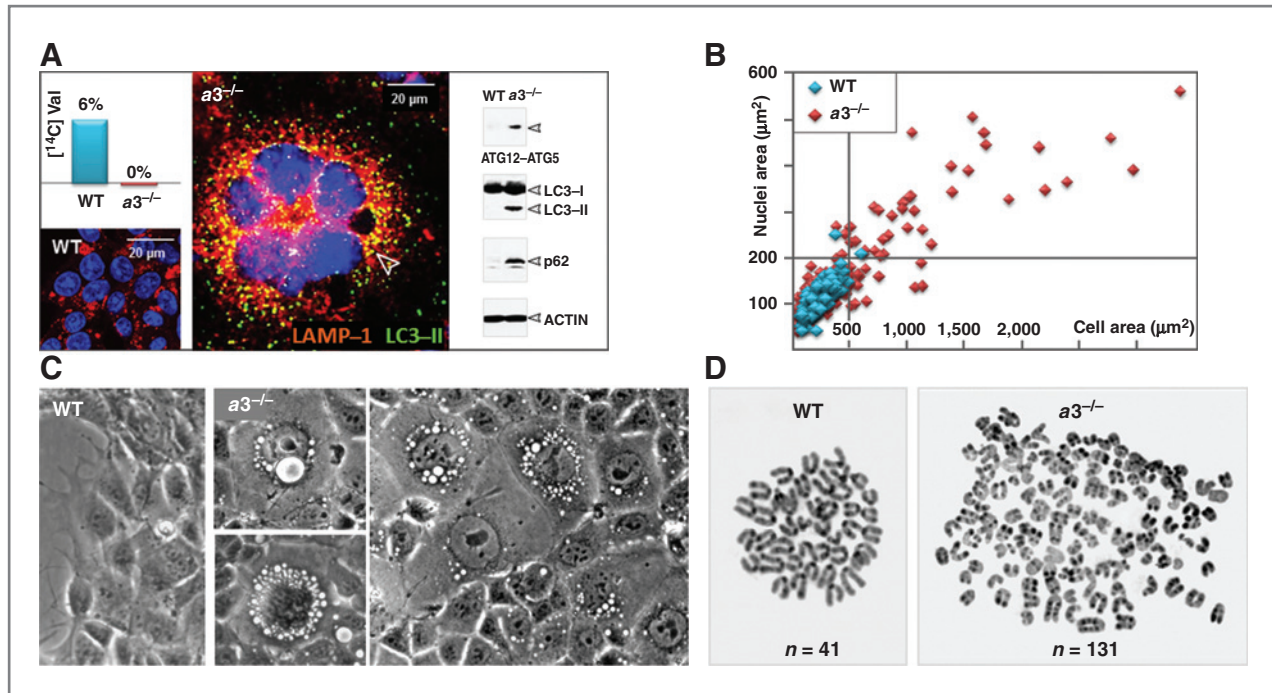


Figure 1. The $a3$ -dependent autophagy defect is characterized by the formation of giant multinucleate cells. **A**, accumulation of autolysosomes (LC3-II and LAMP1 positive; fluorescence images) that were defective in the degradation of long-lived proteins (top left inset), LC3-II and p62 (right insets). Right, note the accumulation of the ATG12-ATG5 conjugate (a marker of autophagosome formation) in response to the $a3$ loss (see Supplementary Fig. S1). **B**, cell and nuclei area of WT and $a3^{-/-}$ cells ($n = 400$). **C**, representative photomicrographs showing that the WT cells were all small ($200 \pm 47 \mu\text{m}^2$) with one nucleus, whereas the $a3^{-/-}$ cells were heterogeneous in size. About 30% to 40% of $a3^{-/-}$ cells showed a gigantic size ($200\text{--}7,300 \mu\text{m}^2$) and a flattened shape with the accumulation of vesicles and nuclei. **D**, representative karyotype figures showing aneuploidy and structural abnormalities in $a3^{-/-}$ cells.

increased DNA content (3–4 N; Supplementary Fig. S2C). Of interest, no subdiploid or subtetraploid cells were detected, indicating that the $a3$ loss did not induce cell death. Subsequent karyotypes of $a3^{-/-}$ cells confirmed a near-triploid karyotype (group average, 131; Fig. 1D). Therefore, despite aneuploidy, the $a3^{-/-}$ cells continued to proliferate and escaped apoptosis or senescence. All these abnormalities, which are hallmarks of cancer cells, were reminiscent of that reported for $Atg5^{-/-}$ or $Becn1^{-/+}$ cells (8). Collectively, these data support the notion that defects of the entire autophagy pathway [i.e., either at the step of formation ($Atg5^{-/-}$ or $Becn1^{-/+}$) or degradation (herein, $V\text{-ATPase } a3^{-/-}$) of autophagosomes] could result in aneuploidy.

The multinucleate phenotype of $a3^{-/-}$ cells arises from cytokinesis failure

We hypothesized that the aneuploidy of $a3^{-/-}$ cells might arise through cytokinesis failure. Multiple mitotic defects leading to aneuploidy were indeed identified in $a3^{-/-}$ cells, as these cells often showed multipolar spindles and several chromosome segregation defects: improper attachment of chromosomes to spindle microtubules, lagging chromosomes, chromosome bridges connecting daughter cells, and micronuclei. Strikingly, a large proportion of $a3^{-/-}$ cells were connected via an asymmetric bridge, in contrast to the short intracellular bridge observed in the middle of the two WT daughter cells (Supplementary Fig. S3).

Using real-time imaging, we showed that the WT cells completed cytokinesis in only 15 min (Fig. 2A, Supplementary Movie S1). In contrast, the cytokinesis was incomplete upon $v\text{-ATPase}$ inhibition by bafilomycin A1 treatment (Fig. 2B) or $a3$ loss (Fig. 2C–G, Supplementary Movies S2–S5). About 72% of $a3^{-/-}$ cells that entered mitosis normally failed abscission (Fig. 2C) and instead remained connected by an intracellular bridge for up to 8 hours before separating (Fig. 2D, Supplementary Movie S2), re-entering mitosis synchronously (still bound to the sister cell, Fig. 2E, Supplementary Movie S3) or collapsing back, forming a single binucleate cell (Fig. 2F and G, Supplementary Movies S4 and S5). Moreover, we did not observe cell–cell fusion, cell engulfment, and endoreplication during live cell imaging ($n = 200$). Thus, impairment of cytokinesis at the membrane abscission step was the key event responsible for the formation of multinucleate $a3^{-/-}$ cells.

The inhibition of autophagy degradation by $v\text{-ATPase } a3$ loss stabilizes RHOA-GTP within autolysosomes

We then explored which signaling proteins might be degraded by autophagy and could underlie this phenotype. One candidate was the small GTPase RHOA that dictates cell shape and completion of cytokinesis via F-actin reticulation (23). In this regard, a striking hallmark of $a3^{-/-}$ cells was a dramatic remodeling of actin cytoskeleton with the loss of stress fibers and the formation of actin patches (Fig. 3A and Supplementary Fig. S4A and S4B). The current consensus is that fine-tuning of

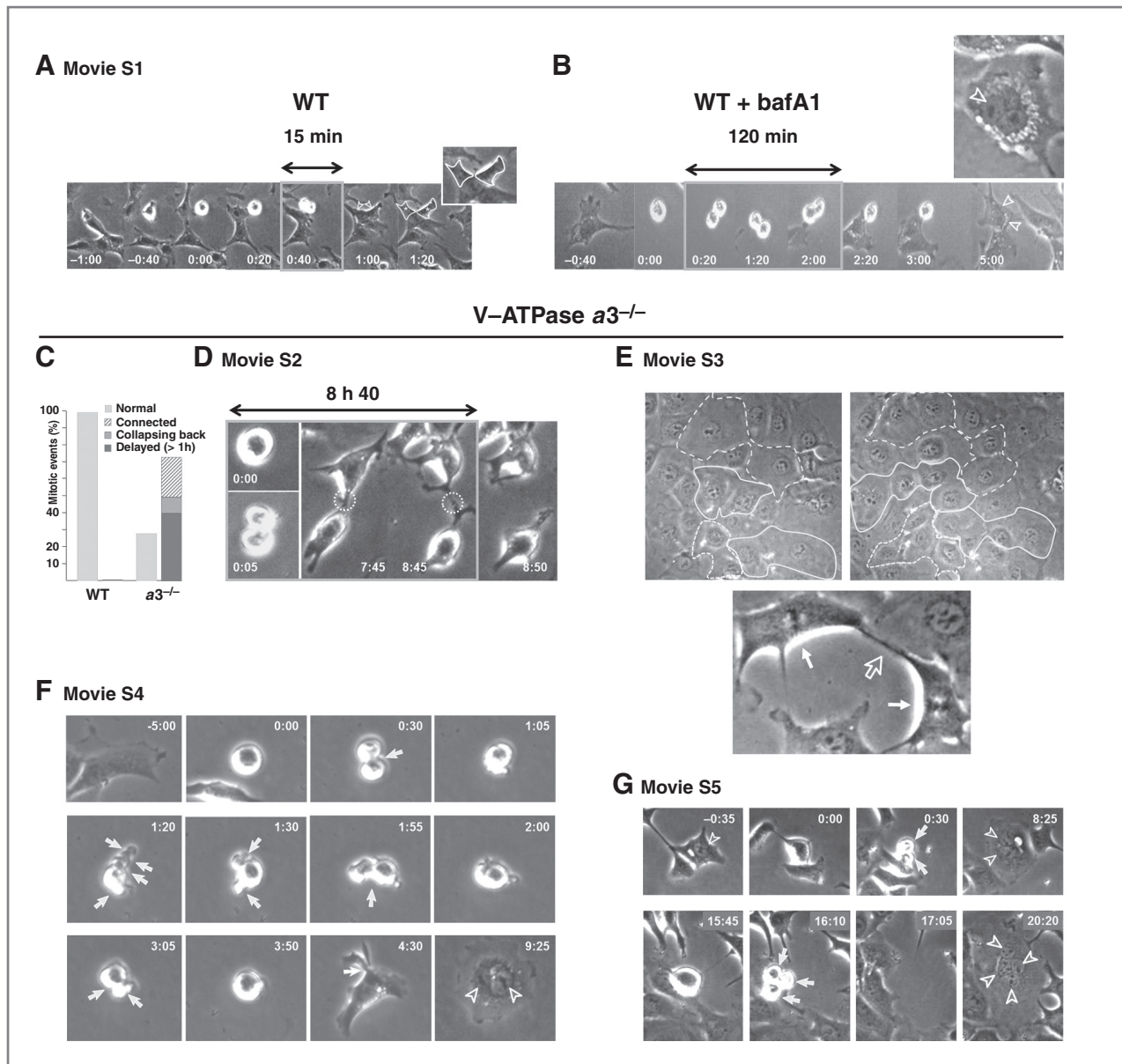


Figure 2. Cytokinesis is specifically impeded by v-ATPase inactivation. Control (A, treated with dimethyl sulfoxide, Supplementary Movie S1; inset, high magnification of the last frame where the daughter WT cells are outlined in white to help visualize their successful division), bafA1-treated WT cells (B, 100 nmol/L, 8 hours after the addition of bafA1), or *a3*^{-/-} cells (C–G, Supplementary Movies S2–S5), all under complete medium, were followed for 18 hours using phase-contrast time lapse microscopy. C, frequency of cytokinesis failure in *a3*^{-/-} cells (*n* = 125). D, still images of a mitotic *a3*^{-/-} cell that remained connected by an intracellular bridge for up to 8 hours before abscission (Supplementary Movie S2). E, pairs of *a3*^{-/-} cells that entered mitosis synchronously are outlined in white (Supplementary Movie S3). Bottom, 2 mitotic cells (white arrows) remained connected by an intracellular bridge (empty arrow). F, still images of an *a3*^{-/-} cell that exited mitosis as a binucleated cell after 18 attempts of cleavage furrow formation. Note that this cell developed ectopic furrows, which led to the formation of anuclear fragments (white filled arrows) that fused back to the cell (Supplementary Movie S4). G, still images of a mononucleate *a3*^{-/-} cell that formed a tetranucleate cell after 2 rounds of abortive mitoses (Supplementary Movie S5). Both giant and small *a3*^{-/-} cells failed cytokinesis, resulting in multinucleation and differentially sized daughter cells. All daughter cells were viable throughout imaging (up to 18 hours). White empty arrows indicate cleavage furrow formation, arrowheads indicate nuclei, and time points are in hours:minutes from the initiation of metaphase (zero time point).

RHO activity involves the guanine nucleotide exchange factors (GEF) that activate them, the GTPase-activating proteins (GAP) that inactivate them, and the guanine nucleotide dissociation inhibitors (GDIs) that maintain RHO inactive within the cyto-

plasm (23). Exciting findings have revealed that RHO GTPases, their upstream regulators and downstream targets might also be subjected to irreversible proteasome-dependent degradation (24–32).

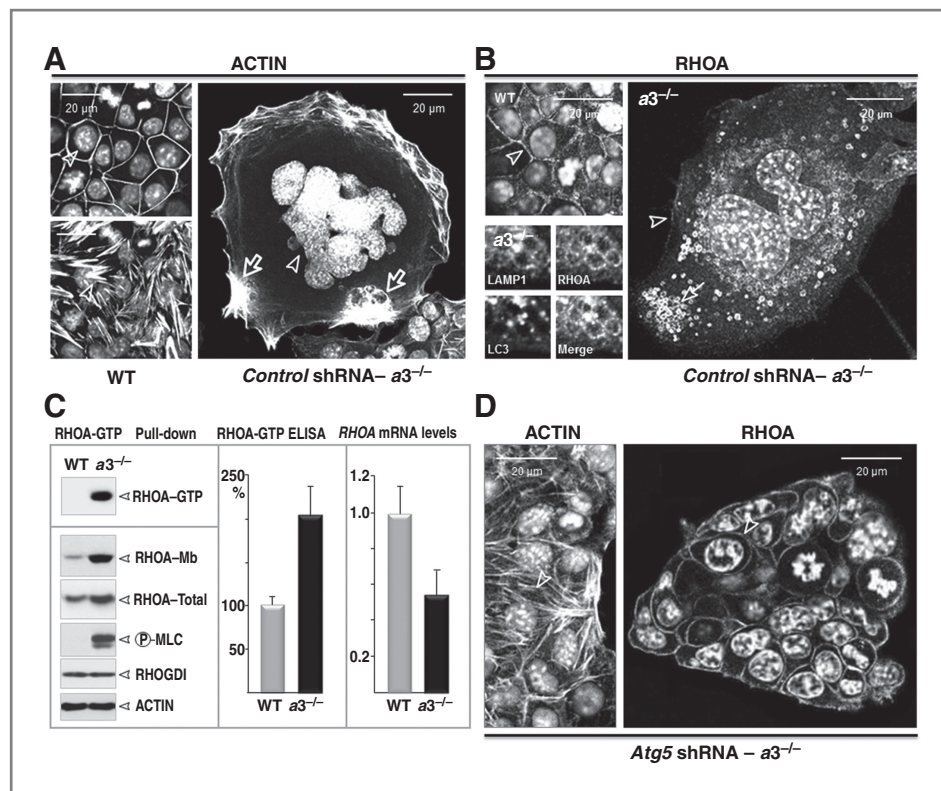


Figure 3. The inhibition of autophagy degradation by v-ATPase $\alpha 3$ loss stabilizes RHOA-GTP within autolysosomes. **A**, phalloidin labeling showed the loss of stress fibers in $\alpha 3^{-/-}$ cells that instead developed actin patches (empty arrows). **B**, intracellular ring of RHOA (arrows) that colocalized with LC3-II and LAMP1 (insets; see also the color images in Supplementary Fig. S4B, left) in $\alpha 3^{-/-}$ cells in contrast to the WT cells that displayed RHOA at their plasma membrane (arrowhead). **C**, accumulation of RHOA-GTP in $\alpha 3^{-/-}$ cells was evidenced by RHOTEKIN binding (pull-down assay and G-ELISA kit; left and middle, respectively); the recruitment of active RHOA proteins to Triton X-100 insoluble cell membranes; and the downstream phosphorylation of myosin regulatory light chain (P-MLC; bottom). Bound proteins (top) and total cell lysates (bottom) were analyzed by Western blotting. Note that $\alpha 3$ loss increased the ratio of activated (membrane-associated): total RHOA from 2% (WT) to 4% ($\alpha 3^{-/-}$ cells). Western blot analyses are representative of 3 independent experiments. Reverse transcriptase PCR analysis showing that RHOA-GTP accumulation was not due to an increased *RHOA* transcription (right). **D**, *Atg5* shRNA rescues RHOA localization at the plasma membrane (arrowhead) of $\alpha 3^{-/-}$ cells. Cells were infected with *Atg5* shRNA lentivirus and selected with media containing puromycin for 72 hours. Shown are representative images where 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) marks nucleus and F-actin denotes the filamentous actin stained by phalloidin.

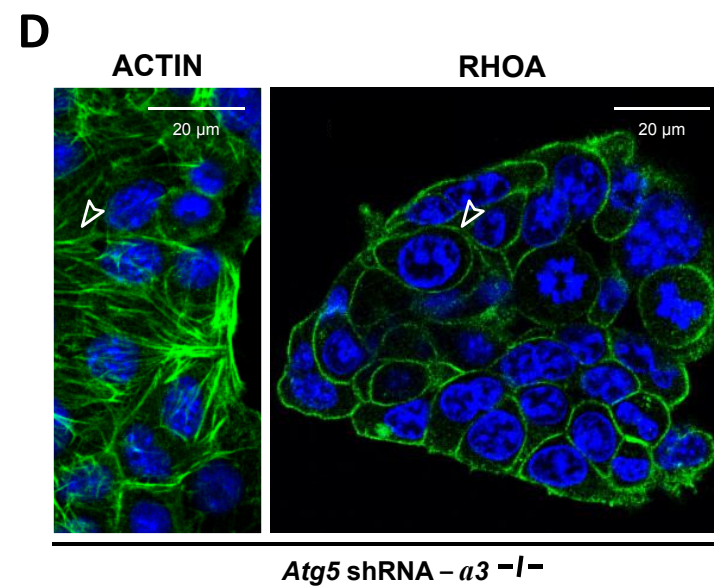
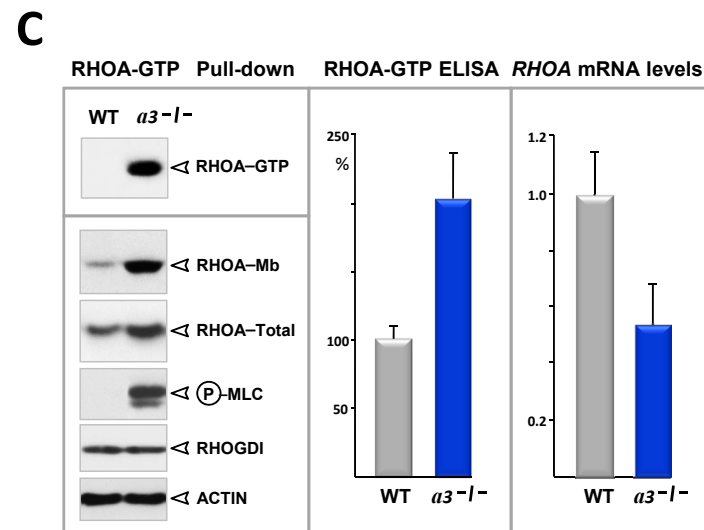
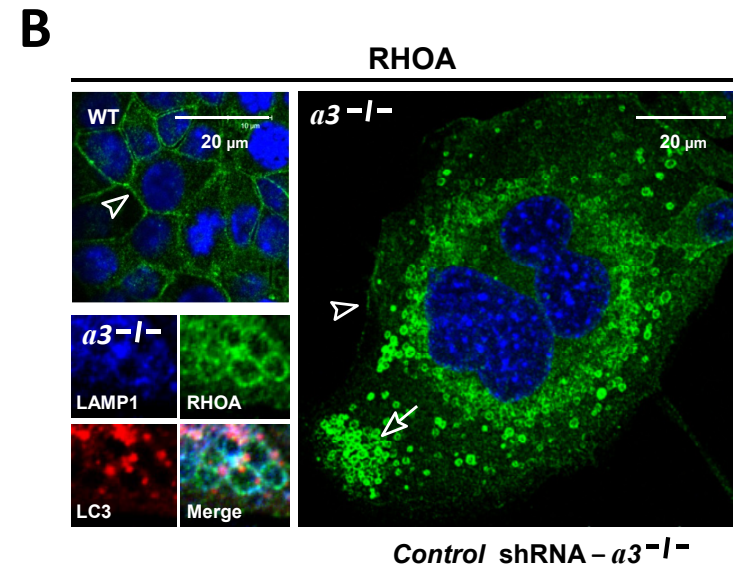
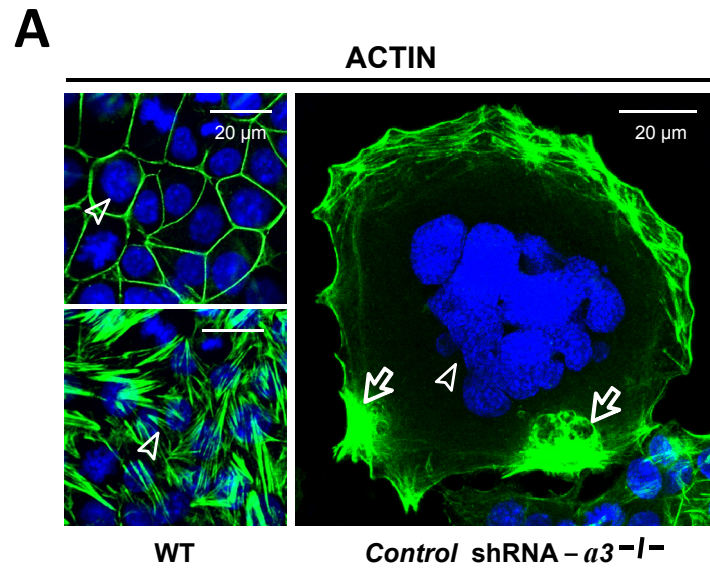
Instead of proteasome, however, we determined that active RHOA was constitutively maintained at low levels by autophagy. Indeed, the active RHOA was barely detected at the plasma membrane of $\alpha 3^{-/-}$ cells but instead accumulated intracellularly within autolysosomes positive both for the autophagy marker LC3 and lysosomal marker LAMP1 (Fig. 3B, Supplementary Fig. S4B, inset). Notably, the level of RHOA-GTP was elevated in resting $\alpha 3^{-/-}$ cells, as evidenced by the RHOTEKIN-binding pull-down assay, the recruitment of RHOA to cellular membranes and the downstream phosphorylation of myosin regulatory light chain (P-MLC; Fig. 3C, Supplementary Fig. S4B).

A role for autophagy in controlling RHOA-GTP level was then suggested by the shRNA-mediated inhibition of autophagosome formation: Expression of *Atg5* shRNA increased the localization of active RHOA at the plasma membrane of $\alpha 3^{-/-}$ cells, which allowed actin polymerization into filaments (Fig. 3D). Consistently, the *Atg5* shRNA-transduced $\alpha 3^{-/-}$ cells displayed a smaller size and tight cohesion within the colony (Fig. 3D). Importantly, the control of RHOA by autophagy was

remarkably specific, as the related GTPase RAC (Supplementary Fig. S4E), as well as the RHOA regulator, RHOGDI, were not affected (Fig. 3C). Together, these data highly suggest a working model in which autophagy might sequester and degrade active RHOA. Inhibition of v-ATPase by $\alpha 3$ loss would stabilize RHOA-GTP within autolysosomal structures, protecting it from autophagy degradation, and at the same time, this would preclude reticulation of actin cytoskeleton (Supplementary Fig. S1A).

p62-dependent autophagy specifically degrades active RHOA

As proof-of-concept, pharmacologic inhibition of autophagy degradation by bafA1 or CQ treatment similarly increased the levels of membrane-bound RHOA together with the autophagy substrates LC3-II and p62 (Supplementary Fig. S5). This occurred in multiple cell types including fibroblast, kidney, and lung epithelial cells (Supplementary Fig. S5A). In contrast, impairment of proteasome by MG132 failed to alter the levels of the membrane-bound RHOA in every cell line



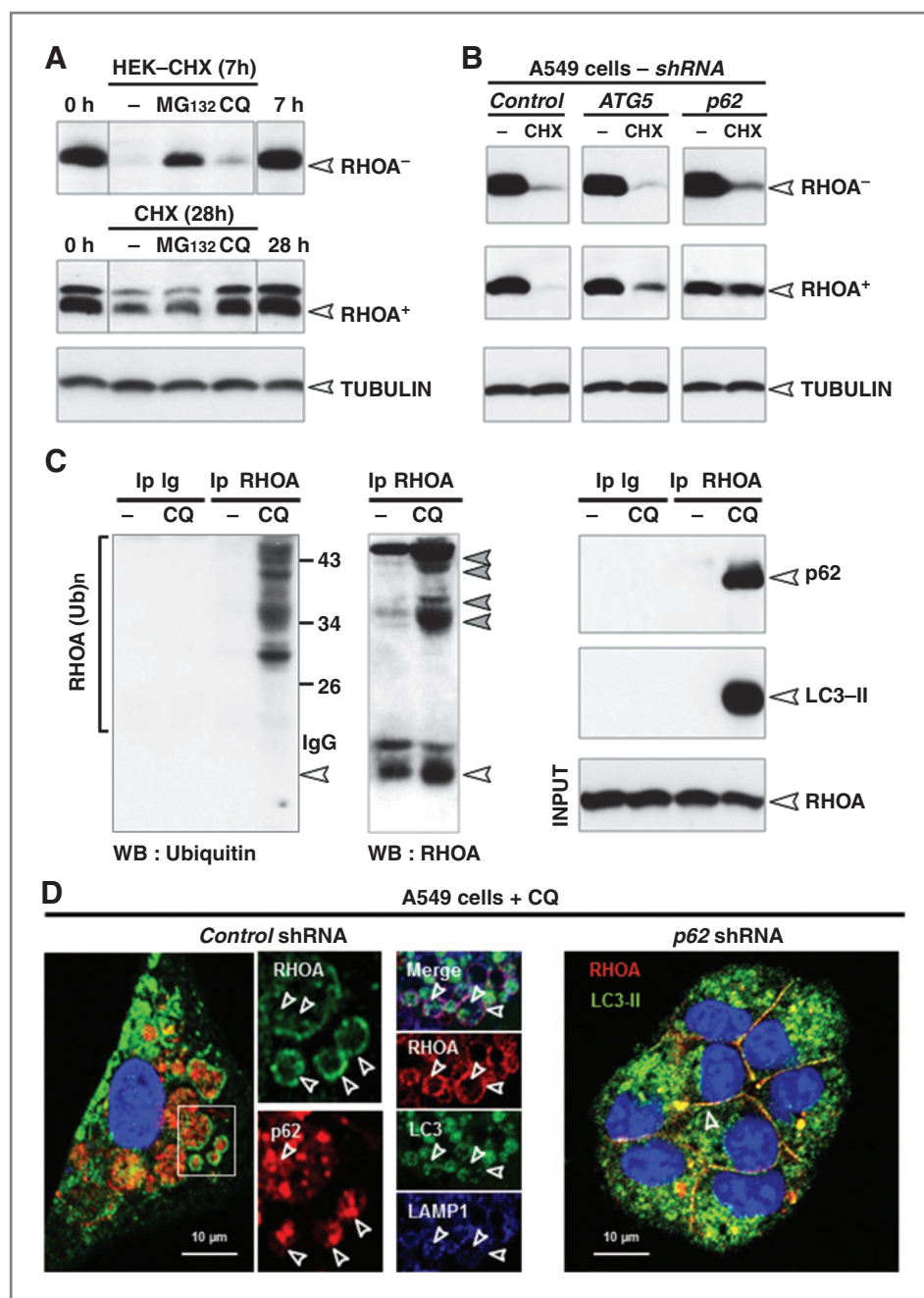


Figure 4. p62-dependent autophagy controls the levels of active RHOA. **A**, the active RHOA is specifically degraded by a lysosomal pathway. HEK cells were transfected with plasmids encoding the active (Q63, RHOA⁺) or inactive RHOA (N19, RHOA⁻) mutants and incubated with CHX (10 μg/mL) for the indicated time in the presence or absence of CQ (100 μmol/L) or MG132 (10 μmol/L) to inhibit the lysosomal or proteasomal functions, respectively. Expression of RHOA mutants was analyzed by anti-myc Western blotting (see Supplementary Fig. S5). **B**, inhibiting autophagy sequestration in A549 cells by *ATG5* or *p62* depletion stabilized the active but not the inactive RHOA mutant. Control, *ATG5*, or *p62* shRNA-transduced A549 cells were transfected with the RHOA mutants and treated with CHX (20 μg/mL) for 57 hours. Equal protein loading was verified by anti-tubulin immunoblotting. The data are representative of at least 3 independent experiments (see Supplementary Fig. S6A and S6B). **C**, the ubiquitin-binding protein p62/SQSTM1 acts as a receptor that targets the active RHOA to autophagy. Ubiquitinated RHOA species (gray arrowheads) formed a complex with p62 and LC3-II in CQ-treated A549 cells. **D**, p62 affects RHOA localization. Left, RHOA colocalized with p62, LC3-II, and LAMP1 upon autophagy inhibition by CQ; right, decreasing p62 levels by shRNA reduced colocalization of RHOA with LC3-II and rescued RHOA localization at the plasma membrane of CQ-treated cells.

tested (Supplementary Fig. S5A). As expected, all features of *a3*^{-/-} cells (i.e., RHOA autolysosomal recruitment, F-actin depolymerization, and increased cell size) were mimicked by bafA1, but not MG132 treatment, further supporting the model that activity of the RHOA pathway can be controlled by the autophagy-lysosome pathway (Supplementary Fig. S5B and S5C). Consistently, the active, but not inactive, RHOA mutants were long-lived proteins selectively degraded by autophagy (Fig. 4). Indeed, upon inhibition of protein synthesis with cycloheximide, the active RHOA (RHOA⁺, Q63) was degraded within 28 hours and stabilized by inhibiting lysosomal degra-

tion (CQ, Fig. 4A), or autophagosome formation (*ATG5* shRNA, Fig. 4B and Supplementary Fig. S6A and S6B) but not proteasomal activity (MG132, Fig. 4A). Inversely, the inactive form of RHOA (RHOA⁻, N19) was unstable and as expected stabilized by inhibition of proteasome but not by inhibition of lysosomal activity or of autophagy (Fig. 4A and B), in agreement with previous reports (24–30).

At this stage, it was of interest to address how autophagy may specifically target the active RHOA. One adaptor by which autophagy acquires specificity is p62 (SQSTM1) that targets ubiquitinated substrates to the autophagy machinery

(33). Of interest, p62 appears as a prime candidate for regulating RHOA as it is the sole autophagy adaptor involved in cell mitosis (34), cell spreading (35), and tumor growth (36–38). We observed that p62 not only co-immunoprecipitated (Fig. 4C) and co-localized (Fig. 4D) with ubiquitinated RHOA and LC3-II in CQ-treated cells but was also essential in the selective clearance of active RHOA by autophagy (Fig. 4B and D). Upon p62 silencing and CQ treatment, autophagosomes formed normally (as evidenced by LC3-II conversion, Supplementary Fig. S6A), but the autophagic sequestration (Fig. 4D) and degradation (Fig. 4B) of active RHOA were defective. Collectively, these results strongly suggest a new signaling role for p62-dependent autophagy in the control of RHOA pathway.

Regulation of the amount of active RHOA at the midbody during cytokinesis by autophagy

The multinucleate phenotype of $a3^{-/-}$ cells raised the question of whether autophagy may control cytokinesis through regulation of RHOA. Autophagy was suggested to clear the midbody ring after cytokinesis completion (39, 40). Likewise, the depletion of several autophagy genes (*Atg5*, *Becn1*, *Uvrag*, *Bif-1*, and *Vps34*) was shown to lead to polynucleation, but the role of autophagy in controlling RHOA activation during cytokinesis was not documented (8, 41).

Although several key RHOA activators have been identified (42), little is known about the mechanisms that confine active RHOA at the midbody. Using the $a3^{-/-}$ cells, we observe that little, if any, active RHOA was at the equatorial furrow and was instead sequestered within autolysosomes, close to the midbody (Fig. 5A), likely as a result of increased sequestration. Inversely, when we blocked autophagosome formation by *ATG5* shRNA (Supplementary Fig. S6A), RHOA was highly enriched at the equatorial furrow of cytokinetic A549 lung cancer cells (Fig. 5B, Supplementary Fig. S7A). Notably, the RHO activity zone in *ATG5*-depleted cells was 3 times as wide and bright as in controls (control shRNA = $3.7 \pm 0.8 \mu\text{m}$; *ATG5* shRNA = $11.4 \pm 2.6 \mu\text{m}$; mean \pm SD; Fig. 5C and D). Outside the cell equator, RHOA activity was also abnormally high at the cell cortex (Fig. 5B, Supplementary Fig. S7). Accordingly, *Atg5* knockdown in mouse embryonic fibroblasts (Fig. 5E) and *ATG7* or *p62* depletion in A549 cells (Supplementary Fig. S6) faithfully recapitulated the same phenotype with regard to the RHOA pathway. Likewise, closer examination indicated that the upstream regulators required for narrowed activation of RHOA such as the kinesin MKLP1, the RHOA GEF ECT2, and spindle microtubules concentrated at the midbody of cytokinetic cells (Supplementary Fig. S8A and S8B; ref. 43). It is also highly likely that the loss of *ATG5* would create defects in the generation and the delivery of new membranes to the cleavage furrow, a process that is central to cytokinesis. As shown in Supplementary Fig. S8C, the delivery of endosomes to the midbody appeared not to be affected by *ATG5* depletion: the endosomes were delivered to the cleavage furrow and clustered on either side of midbody of *ATG5*-depleted cells, as observed in control cells. In contrast, *ATG5*-depleted cells exhibited in addition to RHOA a broader distribution of downstream F-actin that triggers the formation of actomyosin ring (Supplementary Fig. S7B). Our data therefore suggest that the degradation of RHOA

by autophagy may function as a key, but hitherto uncharacterized, mechanism concentrating active RHOA at midbody.

Autophagy defects fuel chromosomal instability in lung cancer cells

Considering the apparent connection between autophagy and RHOA, a key issue is how defects in autophagy might affect cell behavior in a way relevant for cancer progression. Maintaining the appropriate amount of active RHOA at midbody is critical for faithful cytokinesis as it dictates the position, the formation and the contraction of actomyosin ring (42, 44). If our model were correct, one would expect that the inhibition of autophagy sequestration in autophagy-competent A549 tumor cells would be sufficient to disturb cytokinesis and thereby drive the genomic instability required for tumor progression. As shown in Fig. 6, in control A549 cells, the clustering of RHOA in a narrow zone resulted in the formation of a unique and compact ring whose position and size remained constant throughout furrow ingression (Fig. 6A and B, top). As a result, control cells successfully completed cytokinesis (Supplementary Movie S6). Without functional autophagy, the subsequent hyperactivation of RHOA zone would jeopardize the assembly of an efficient contractile ring, as expected from the cytokinesis defects observed for active RHOA mutants (Supplementary Fig. S4C). Indeed, *ATG5*-depleted A549 cells progressed through mitosis until the furrow started to constrict, then 52% of the cells showed unstable and loose furrowing that suddenly fell apart, reformed, and constricted more slowly than control furrows, delaying cytokinesis completion (Fig. 6A and B, bottom, Supplementary Movie S6). As result of cytokinesis failure, these autophagy compromises (*ATG5* shRNA and *p62* shRNA) were sufficient to increase the percentage of cells with multiple nuclei (Fig. 6C), and the frequency of chromosomal gains and losses in nearly all of the chromosomes (Fig. 6D), one hallmark of aggressive cancers. Together, these findings highly suggested that autophagy may act, in part, as a master safeguard mechanism of active RHOA localization during cytokinesis for faithful genome inheritance.

Overexpression of RHOA is correlated with autophagy defects in lung carcinomas

The biochemical, cellular, and genomic changes (increased RHOA activity, increased cellular sizes, and aneuploidy) we consistently observed herein following autophagy inhibition (irrespective of particular autophagy defects) are noteworthy because they accompany the onset and progression of cancers. RHOA overexpression has been observed in many aggressive cancers, such as breast, colon, prostate, and lung cancers, but has been attributed largely to increased *RHOA* transcription (45). Consistent with a role of autophagy in RHOA degradation, we found that RHOA, together with p62 and LC3-II, were overexpressed in late stages of NSCLCs (T; pTNM stage IIIA), compared with normal epithelia (N) and stage I adenocarcinomas (Fig. 7A and B). An impaired autophagic degradation rather than an increased transcription was correlated with RHOA overexpression, as the levels of RHOA expression and activity increased progressively with the accumulation of the autophagy substrates p62 and LC3-II (Fig. 7A), and no

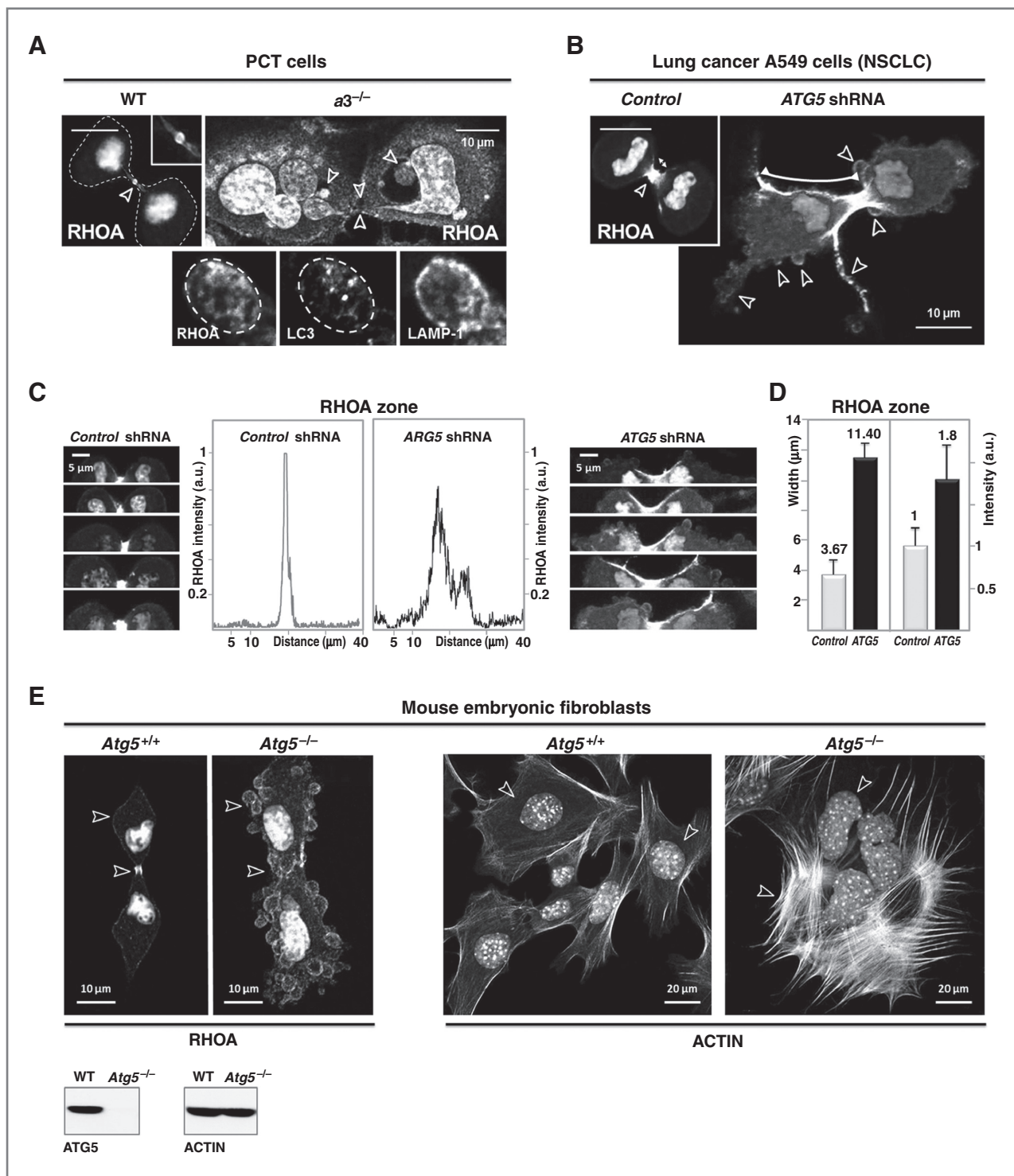


Figure 5. Autophagy defects disturb the clustering of active RHOA at the midbody during cytokinesis. **A**, confocal images of cytokinetic *a3^{-/-}* PCT cells showing that RHOA failed to localize to midbody (arrowhead) and instead accumulated within autolysosomes (LC3 and LAMP1 positive). Inset, RHOA-positive vesicles were not degraded and accumulated within the luminal space of autolysosomes. **B**, *ATG5* depletion in A549 tumor cells caused aberrant RHOA diffusion along the cell cortex during cytokinesis. RHOA, normally detected in a narrow zone at midbody of control cells, accumulated within a looser equatorial zone (arrows) and outside (arrowheads) of cleavage furrow of *ATG5*-depleted cells (see Supplementary Figs. S6A and S7). **C**, RHOA staining at similar stages of furrowing in control (left) and *ATG5*-depleted (right) A549 cells. Representative intensity profile that measures RHOA zone width along the cell edge (middle). **D**, the increases in the RHOA zone width ($P = 5.34 \times 10^{-5}$) and RHOA intensity (area under curve, $P = 0.000266995$) reflect a net increase in RHOA activation at equatorial region of *ATG5*-depleted cells. Results are mean \pm SD; $n = 15$. **E**, compared with WT cells, *Atg5^{-/-}* MEF cells showed severe RHOA diffusion over the entire cell surface, ectopic furrowing during cytokinesis, as well as enlarged nuclei and cell morphology, and enhanced F-actin polymerization.

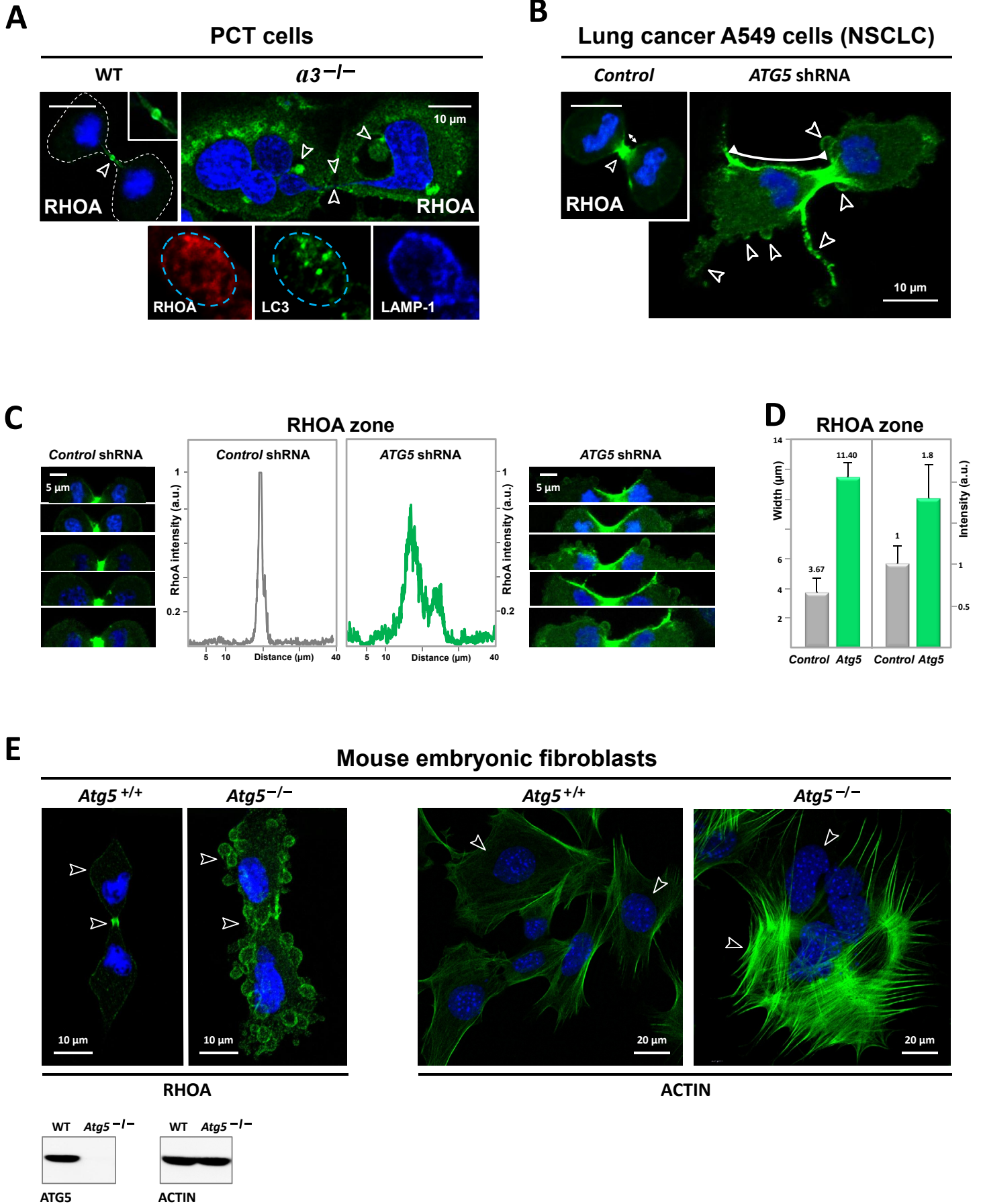


Figure 5 – Belaid *et al.* 2013

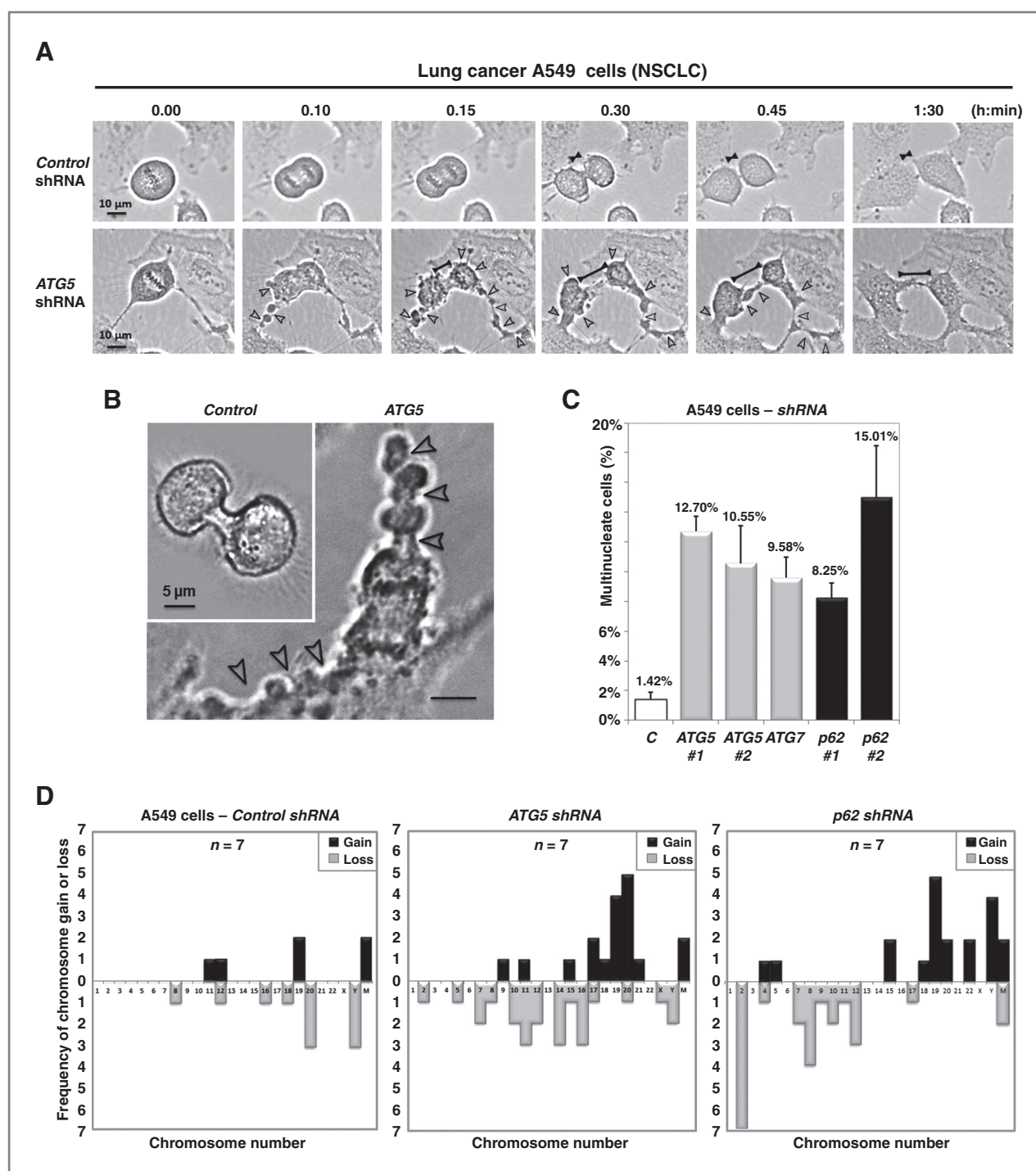


Figure 6. Autophagy defects cause genomic instability in lung cancer cells. **A**, persistent ectopic furrowing as *ATG5*-depleted A549 cells entered cytokinesis. Phase-contrast images of control and *ATG5*-depleted A549 cells were acquired at the indicated times (hours:minutes; Supplementary Movie S6). Virtually all control cells showed normal compact furrowing during cytokinesis (85%; $n = 100$, top inset), whereas the majority (52%; $P = 2.8 \times 10^{-19}$; $n = 50$) of telophase *ATG5*-depleted cells exhibited unstable and loose furrowing. The black arrowheads indicate ectopic furrows and the bar marks the width of the equatorial furrow. **B**, representative picture of a telophase *ATG5*-depleted cell that exhibited unstable furrowing, with numerous cortical constrictions and blebs (arrowheads), in contrast to the unique and compact furrow of a control cell (see Supplementary Fig. S7). **C**, defects at the stage of autophagosome formation (*ATG5* or *ATG7* shRNA) or the recruitment of autophagy substrates (*p62* shRNA) resulted in a 7- to 10-fold increase of multinucleate cells compared with control shRNA-transduced cells. The different autophagy defects are indicated on the x-axis ($n = 900$). The y-axis shows the percentage of multinucleate cells (see Supplementary Fig. S6C). **D**, frequency of whole chromosome gains (black) and losses (gray) in control, *ATG5*-depleted, and *p62*-depleted A549 cells ($n = 7$). Chromosome numbers are indicated on the x-axis. Note that the chromosomal gains or losses occurred with low frequency in the autophagy-competent A549 tumor cells and were limited to fewer chromosomes in comparison with *ATG5*-depleted cells and *p62*-depleted cells, which showed widespread chromosomal gains and losses in nearly all of the chromosomes. Chromosome 2 loss ($n = 7$) and chromosome 19 gain ($n = 5$) were recurrent in *p62*-depleted A549 cells.

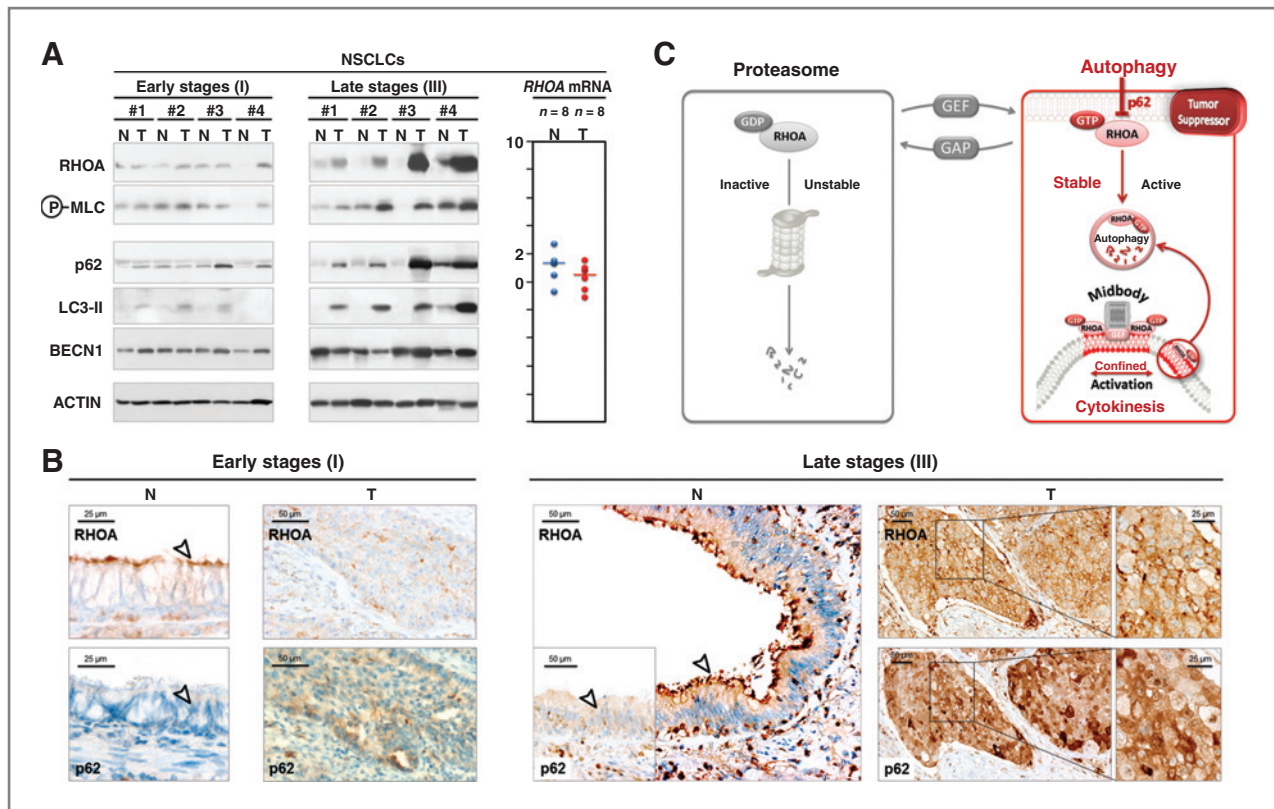


Figure 7. Correlation between RHOA protein levels and autophagy in human lung cancers. **A**, immunoblotting of NSCLC samples (T, tumor: early stage $n = 4$; late stage $n = 4$; see Supplementary Table S1) versus normal peritumoral tissues (N, normal) using the indicated antibodies. p62 served as a positive control for autophagy impairment (36) and actin as a loading control. Similar *RHOA* mRNA levels in tumor and normal tissues (right, not statistically significant). **B**, immunohistochemical staining revealed a high overexpression of RHOA and p62 in late stages of NSCLCs. In line with $a3^{-/-}$ cell results (Fig. 3), the defect in lung cancer samples was a defect in autophagosome degradation with the concomitant accumulation of the 3 autophagy substrates LC3, p62, and active RHOA (RHOA recruitment to intracellular cell membranes; and downstream β -MLC). **C**, proposed model by which autophagy sequesters and degrades the active RHOA that would otherwise diffuse from midbody to flanking zones. Together with RHO GEF, autophagy seems essential to confine RHOA activation at midbody, allowing the assembly of a unique and compact contractile ring, for successful cytokinesis and faithful genome inheritance.

significant changes in *RHOA* mRNA expression were measured (Fig. 7A, right). Of interest, the inactivation of autophagy and the subsequent RHOA upregulation were not early events but instead were late events in the progression of lung cancer, when these cancers acquire a more genomic instability. All tumor cells positive for p62 were also RHOA-positive (Fig. 7B). p62 overexpression, as a readout of an autophagy defect, was associated with a reduced or absent RHOA membrane localization, which instead displayed intracellular localization (T, right). In sharp contrast, normal bronchial epithelial cells that barely expressed p62 showed strong membrane expression of RHOA primarily at their apical ciliated cell surface (N, left).

Discussion

So far, most studies suggest that signal termination and irreversible progression through cell cycle depend largely on the proteasomal degradation of key regulatory proteins (46). Recently, Gao and colleagues provide the first evidence that autophagy negatively regulates Wnt signaling by degrading Dishevelled; however, this occurs under nutrient starvation (11). Therefore, the ability of autophagy to degrade signaling

proteins under basal conditions and thereby to ensure tumor-suppressive functions remains to be established.

We show here that autophagy promotes the degradation of active RHOA. In support of this, (i) RHOA-GTP was elevated in cells deficient in autophagosome clearance, (ii) importantly, RHOA failed to localize to midbody and instead accumulated within autolysosomes, (iii) a role for autophagy in regulating RHOA-GTP was then suggested by the shRNA-mediated inhibition of autophagosome formation: *ATG5* shRNA dramatically increased the localization of RHOA-GTP at the equatorial furrow of cytokinetic cells. One related RHO GTPase, RAC, was not targeted by autophagy. As a result, defects of the entire autophagy pathway [i.e., either at the formation (*ATG5* or *ATG7* shRNA), sequestration (*p62* shRNA), or degradation of autophagosomes (v-ATPase $a3^{-/-}$ cells)] similarly drive the formation of unstable and loose furrowing, disturbing cytokinesis completion and genome inheritance; processes that directly contribute to cancer development.

The regulation of RHOA is unique in that it involves GEF, GAP, and GDI proteins, along with the proteasome (47) and autophagy. Depending on its activation state, we provide the first lines of evidence that RHOA used distinct routes for

degradation: while the proteasome degraded the cytosolic and inactive forms, the autophagy pathway specifically degraded the membrane-associated and active pool of RHOA. This is consistent with the recently reported degradation of 2 constitutively active RHO, RHOH and RHOB, within lysosomes (48, 49) and the redistribution of active RHOA to undefined perinuclear localization after treatment of enterocytes with an autophagy inducer, lipopolysaccharide (LPS; ref. 50). We therefore propose that autophagy may act as a tumor suppressor pathway, in part, by turning off RHOA activation (Fig. 7C). In this model, the remarkable dynamics of autophagy together with its integration of extracellular cues might dictate the time and place where a RHOA is active and is able to interact with its downstream substrates. Accordingly, we reported the targeting of autolysosomes at midbody during cytokinesis, the same subcellular and temporal localizations where RHOA should be controlled. Therefore, autophagy might be critical for localized degradation of active RHOA at midbody and thereby proper actin dynamics during accurate completion of cytokinesis and faithful genome inheritance.

The development of a cancer depends on the ability of tumor cells to acquire growth advantages. Whatever the mutations, deletions, and epigenetic silencing of autophagy genes, our findings provide new information on how autophagy defects can drive tumor progression through deregulation of RHOA pathway. As autophagy is commonly downregulated in cancers (1) where RHOA is overexpressed (47), this new paradigm may be a general mechanism for the acquisition of aneuploidy and progression of human cancer cells.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

References

- Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7:961–7.
- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 2003;112:1809–20.
- Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:15077–82.
- Fimia GM, Stoykova A, Romagnoli A, Giunta L, Di Bartolomeo S, Nardacci R, et al. *Ambra1* regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* 2007;447:1121–5.
- Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cuaing HD, Sun M, Sato Y, et al. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 2007;9:1142–51.
- Mariño G, Salvador-Montoliu N, Fueyo A, Knecht E, Mizushima N, Lopez-Otin C. Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in *Atg4C/autophagin-3*. *J Biol Chem* 2007;282:18573–83.
- Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S, et al. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev* 2007;21:1621–35.
- Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K, et al. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev* 2007;21:1367–81.
- Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 2006;10:51–64.
- Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* 2009;23:798–803.
- Gao C, Cao W, Bao L, Zuo W, Xie G, Cai T, et al. Autophagy negatively regulates Wnt signalling by promoting Dishevelled degradation. *Nat Cell Biol* 2010;12:781–90.
- Xie R, Wang F, McKeenan WL, Liu L. Autophagy enhanced by microtubule- and mitochondrion-associated MAP1S suppresses genome instability and hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 2011;71:7537–46.
- Geigl JB, Obenaus AC, Schwarzbraun T, Speicher MR. Defining 'chromosomal instability'. *Trends Genet* 2008;24:64–9.
- Fujiwara T, Bandi M, Nitta M, Ivanova EV, Bronson RT, Pellman D. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* 2005;437:1043–7.
- Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 2004;432:1032–6.
- Scimeca JC, Franchi A, Trojani C, Parrinello H, Grosgeorge J, Robert C, et al. The gene encoding the mouse homologue of the human osteoclast-specific 116-kDa V-ATPase subunit bears a deletion in osteosclerotic (oc/oc) mutants. *Bone* 2000;26:207–13.
- Hurtado-Lorenzo A, Skinner M, El Annan J, Futai M, Sun-Wada GH, Bourgoin S, et al. V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway. *Nat Cell Biol* 2006;8:124–36.
- Toyomura T, Murata Y, Yamamoto A, Oka T, Sun-Wada GH, Wada Y, et al. From lysosomes to plasma membrane: localization of vacuolar

Authors' Contributions

Conception and design: A. Belaid, B. Mograbi
Development of methodology: A. Belaid, M. Cerezo, B. Mograbi
Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): A. Belaid, A. Chargui, F. Pedeutour, S. Giuliano, M. Ilie, I. Rubera, M. Tauc, S. Barale, C. Bertolotto, G.F. Carle, B. Mograbi
Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): A. Belaid, A. Chargui, B. Mograbi
Writing, review, and/or revision of the manuscript: M. Ilie, V. Vouret-Craviari, D.J. Klionsky, G.F. Carle, B. Mograbi
Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): E. Corcelle-Termeau, M. Ilie, P. Brest, P. Hofman, B. Mograbi
Study supervision: B. Mograbi

Acknowledgments

The authors thank Nathalie Rochet, Nathalie Singer, Etienne Boulter, Jean Albregues, and Emmanuel Lemichez for helpful discussions; Laurence Caille-teau, Thibault Fabas, Annie-Claude Peyron, Valérie Pierrefite-Carle, Isabelle Mothe, Adrien Botta, and Virginie Tanga-Gavric for their technical assistance; and Prof. Mouroux and Prof. Vénissac (Thoracic Surgery Department, Nice, France) and Dr. N. Mizushima (Tokyo, Japan) for providing us with surgical lung specimens and *Atg5* KO MEFs, respectively.

Grant Support

This work was supported by grants from "Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale", "Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie" (A. Belaid and A. Chargui: ADEME n° 0862C0044), Agence régionale santé Provence Alpes Côte d'Azur and Direction régionale de l'Environnement, de l'aménagement et du logement (A. Belaid: plan régional santé environnement PRSE PACA n° 6.3.3.3 et 6.3.3.4), "Association pour la Recherche contre le Cancer" (ARC Grants no SL220110603478), "Programme Hospitalier De Recherche Clinique" (P. Hofman: PHRC Nice CHU 2003), "Cancéropole PACA" (PROCAN 2007, axe II), "Institut National du Cancer" (P. Hofman: PNES POU MON INCa), and NIH (D.J. Klionsky: GM053396).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received November 9, 2012; revised April 1, 2013; accepted April 1, 2013; published OnlineFirst May 23, 2013.

- type H⁺-ATPase with the $\alpha 3$ isoform during osteoclast differentiation. *J Biol Chem* 2003;278:22023–30.
19. Lee JH, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, et al. Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* 2010;141:1146–58.
 20. Juhasz G. Interpretation of bafilomycin, pH neutralizing or protease inhibitor treatments in autophagic flux experiments: novel considerations. *Autophagy* 2012;8:1875–6.
 21. Hosokawa N, Harab Y, Mizushima N. Generation of cell lines with tetracycline-regulated autophagy and a role for autophagy in controlling cell size. *FEBS Lett* 2006;580:2623–9.
 22. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, et al. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 2005;120:237–48.
 23. Jaffe AB, Hall A. RHO GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21:247–69.
 24. Doye A, Mettouchi A, Bossis G, Clément R, Buisson-Touati C, Flatau G, et al. CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict RHO GTPase activation for bacterial host cell invasion. *Cell* 2002;111:553–64.
 25. Wang HR, Zhang Y, Ozdamar B, Ogunjimi AA, Alexandrova E, Thomson GH, et al. Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RHOA for degradation. *Science* 2003;302:1775–9.
 26. Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang HR, Zhang Y, Wrana JL. Regulation of the polarity protein Par6 by TGF β receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* 2005;307:1603–9.
 27. Chen Y, Yang Z, Meng M, Zhao Y, Dong N, Yan H, et al. Cullin mediates degradation of RHOA through evolutionarily conserved BTB adaptors to control actin cytoskeleton structure and cell movement. *Mol Cell* 2009;35:841–55.
 28. Bryan B, Cai Y, Wrighton K, Wu G, Feng XH, Liu M. Ubiquitination of RHOA by Smurf1 promotes neurite outgrowth. *FEBS Lett* 2005;579:1015–9.
 29. Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Faul C, Tomino Y, Kim K, Mundel P. Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RHOA signalling. *Nat Cell Biol* 2006;8:485–91.
 30. Boulter E, Garcia-Mata R, Guilluy C, Dubash A, Rossi G, Brenwald PJ, et al. Regulation of RHO GTPase crosstalk, degradation and activity by RHOGDI1. *Nat Cell Biol* 2010;12:477–83.
 31. Su L, Agati JM, Parsons SJ. p190RHOGAP is cell cycle regulated and affects cytokinesis. *J Cell Biol* 2003;163:571–82.
 32. Lynch EA, Stall J, Schmidt G, Chavrier P, D'Souza-Schorey C. Proteasome-mediated degradation of Rac1-GTP during epithelial cell scattering. *Mol Biol Cell* 2006;17:2236–42.
 33. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 2011;7:279–96.
 34. Linares JF, Amanchy R, Greis K, Diaz-Meco MT, Moscat J. Phosphorylation of p62 by cdk1 controls the timely transit of cells through mitosis and tumor cell proliferation. *Mol Cell Biol* 2011;31:105–17.
 35. Kadandale P, Stender JD, Glass CK, Kiger AA. Conserved role for autophagy in RHO1-mediated cortical remodeling and blood cell recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:10502–7.
 36. Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 2009;137:1062–75.
 37. Duran A, Linares JF, Galvez AS, Wikenheiser K, Flores JM, Diaz-Meco MT, et al. The signaling adaptor p62 is an important NF- κ B mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell* 2008;13:343–54.
 38. Inami Y, Waguri S, Sakamoto A, Kouno T, Nakada K, Hino O, et al. Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Biol* 2011;193:275–84.
 39. Pohl C, Jentsch S. Midbody ring disposal by autophagy is a post-abscission event of cytokinesis. *Nat Cell Biol* 2009;11:65–70.
 40. Kuo TC, Chen CT, Baron D, Onder TT, Loewer S, Almeida S, et al. Midbody accumulation through evasion of autophagy contributes to cellular reprogramming and tumorigenicity. *Nat Cell Biol* 2011;13:1214–23.
 41. Sagona AP, Nezis IP, Pedersen NM, Liestøl K, Poulton J, Rusten TE, et al. PtdIns(3)P controls cytokinesis through KIF13A-mediated recruitment of FYVE-CENT to the midbody. *Nat Cell Biol* 2010;12:362–71.
 42. Piekny A, Werner M, Glotzer M. Cytokinesis: welcome to the RHO zone. *Trends Cell Biol* 2005;15:651–8.
 43. Yüce O, Piekny A, Glotzer M. An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RHOA. *J Cell Biol* 2005;170:571–82.
 44. Miller AL, Bement WM. Regulation of cytokinesis by RHO GTPase flux. *Nat Cell Biol* 2009;11:71–7.
 45. Chan CH, Lee SW, Li CF, Wang J, Yang WL, Wu CY, et al. Deciphering the transcriptional complex critical for RHOA gene expression and cancer metastasis. *Nat Cell Biol* 2010;12:457–67.
 46. Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22:159–80.
 47. Sahai E, Marshall CJ. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:133–42.
 48. Perez-Sala D, Boya P, Ramos I, Herrera M, Stamatakis K. The C-terminal sequence of RHOB directs protein degradation through an endo-lysosomal pathway. *PLoS One* 2009;4:e8117.
 49. Schmidt-Mende J, Geering B, Yousefi S, Simon HU. Lysosomal degradation of RHOH protein upon antigen receptor activation in T but not B cells. *Eur J Immunol* 2009;40:525–9.
 50. Cetin S, Ford HR, Sysko LR, Agarwal C, Wang J, Neal MD, et al. Endotoxin inhibits intestinal epithelial restitution through activation of RHO-GTPase and increased focal adhesions. *J Biol Chem* 2004;279:24592–600.

Supplemental Information

Autophagy plays a critical role in the degradation of active RHOA, the control of cell cytokinesis and genomic stability

Amine Belaid *et al.*

Supplemental movies

All movies are time-lapse videos captured by phase contrast. Pictures were captured at 5-min intervals at 37°C in growth medium and converted to a movie. All videos have clocks embedded (h:min) to follow the time frame of imaging.

Movie S1 (related to Fig. 2A) is a time-lapse recording showing the normal cell division of control wild-type (WT) cells. In the last frame, the daughter WT cells are outlined in white to help visualize their successful division.

Movie S2 (related to Fig. 2D) shows the delayed abscission of an $a3^{-/-}$ cell that remained connected by an intracellular bridge for up to 8 h 45 min before separating.

Movie S3 (related to Fig. 2E) is a time-lapse recording of four pairs of $a3^{-/-}$ cells that entered mitosis synchronously, likely bridged sister cells. Pairs of cells that entered mitosis synchronously are outlined in color in the first frame, and then marked with dots in the next frame to help visualize their progression in mitosis.

Movie S4 (related to Fig. 2F) illustrates the failed abscission of a mononucleated $a3^{-/-}$ cell that exited mitosis as a binucleated cell after 18 attempts at cleavage furrow formation. Note that this cell developed ectopic furrows, which led to the formation of anuclear fragments that fused back to the cell.

Movie S5 (related to Fig. 2G) is a time-lapse recording of a mononucleate $a3^{-/-}$ cell that formed a tetranucleate cell after two rounds of abortive mitosis.

Movie S6 (related to Fig. 6A) is a time-lapse recording showing that the *ATG5*-depleted A549 cells formed numerous ectopic furrows in addition to a wider-than-normal equatorial cleavage furrow.

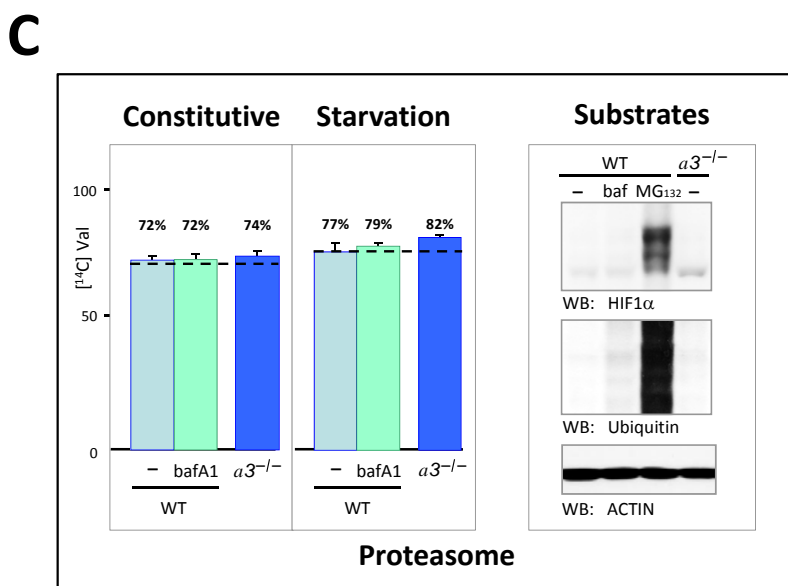
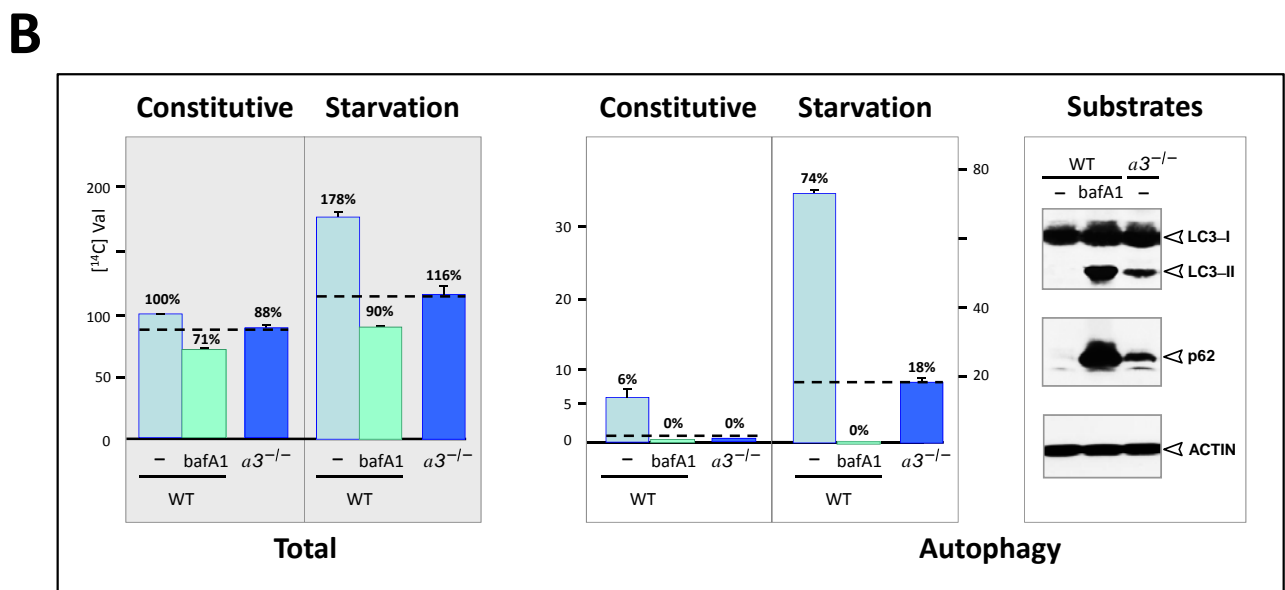
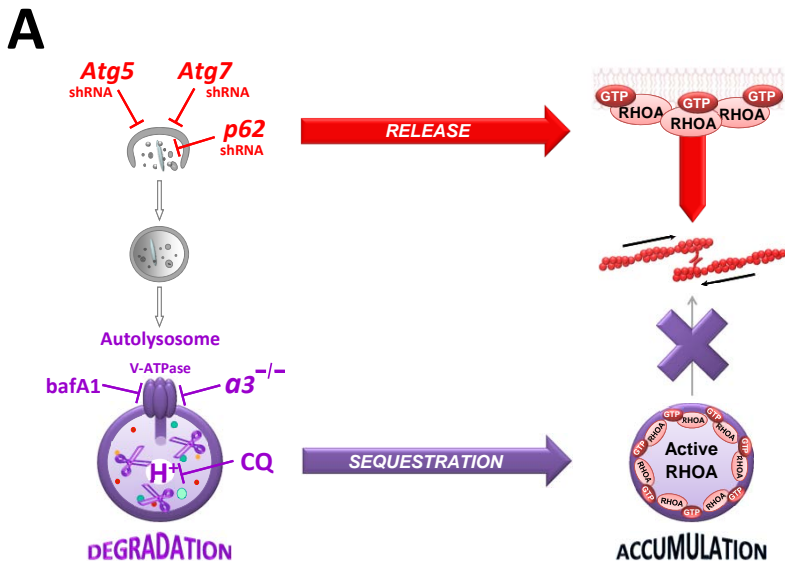


Figure S1 – Belaid *et al.* 2013

Figure S1, related to Figure 1A – The loss of the v-ATPase $\alpha 3$ subunit impairs autophagy, but not proteasomal degradation.

A, Strategies used to inhibit autophagy. Autophagy is a highly dynamic process during which phagophores sequester substrates to form an autophagosome. The latter fuses with a lysosome to form an autolysosome that carries out subsequent degradation. Within the autolysosome, activation of acid hydrolases requires acidification by the v-ATPase proton pump. We therefore used different strategies to inhibit autophagic degradation: *i*) depletion of the v-ATPase $\alpha 3$ subunit, *ii*) treatment with bafilomycin A₁ (bafA1, a specific v-ATPase inhibitor), and *iii*) treatment with chloroquine (CQ, a weak base that accumulates in lysosomes). All of these conditions raise the lysosomal pH and thereby block autolysosomal degradation downstream of fusion, as reflected by the accumulation of autolysosomes and/or the autophagy substrates LC3-II (that associates with autophagic membranes), p62 and RHOA-GTP, according to methods previously published (1). Alternatively, we prevented autophagosome formation by *ATG5* or *ATG7* short hairpin RNA (shRNA); in this situation, LC3-II cannot be detected, while the autophagy substrates p62 and RHOA-GTP accumulate. Depletion of p62 by shRNA abolishes the recruitment of autophagy substrates within the autophagic vesicles, but not the formation of autophagosomes.

B, Left: Degradation of long-lived proteins. After incorporation of [¹⁴C]-valine, cells were incubated in serum- and amino acid-supplemented (constitutive) or -deprived (starvation) media. Where indicated, cells were either untreated (total) or treated with the autophagy inhibitor 3-methyladenine (3MA; 10 mM) to measure the contribution of autophagy (difference between total- and 3MA-resistant-proteolysis). Treatment with bafA1 blocks autophagy and serves as a control. Error bars represent the mean \pm standard deviation of three independent repeats. Right: Aberrant accumulation of LC3-II and p62 in response to the $\alpha 3$ loss, and bafA1 treatment.

C, Nonlysosomal (proteasomal, NH₄Cl-resistant) proteolysis. [¹⁴C]-valine labelled cells were cultured in the presence of 20 mM NH₄Cl to determine the non-lysosomal degradation. Similarly, we did not observe any impairment of 20S proteasome activity when cells were subjected to v-ATPase inhibition (monitored by *in vitro* degradation of specific Suc-LLVY-AMC peptide, data not shown). As controls, the accumulation of two proteasomal substrates, HIF1 α and ubiquitinated proteins, were increased by MG132 (proteasome inhibitor) treatment but not by any of the autophagy impairments.

Figure S2, related to Figure 1 – The formation of giant aneuploid $\alpha 3^{-/-}$ cells does not result from cellular senescence.

A, Representative images of $\alpha 3^{-/-}$ cells and bafA1-treated WT cells. Similar to camptothecin-induced senescent cells (Cpt used as a positive control; 0.7 μ M, 4 days), the $\alpha 3^{-/-}$ cells exhibited several features of cellular senescence, such as enlarged cell shape with multiple nuclei, and a strong senescence-associated β -galactosidase activity (A, SA- β -galactosidase upper panels, blue staining). Notably, both the small and the giant $\alpha 3^{-/-}$ cells were positive for SA- β -galactosidase activity. Surprisingly, other senescence markers, such as the recruitment of heterochromatin protein 1- β to heterochromatin foci (HP1 β , A, lower panels, green, arrowheads) and the expression of the cell-cycle inhibitor p21 (CDKN1A/WAF1/CIP1) (B) were not induced by $\alpha 3$ knockdown. Note that upon treatment with bafA1 (100 nM, 18 h), the WT cells behaved similarly to the $\alpha 3^{-/-}$ cells (reorganization of ACTIN cytoskeleton, increased nuclear and cellular sizes).

B, The western blot shows the expression levels of the cell-cycle inhibitor p21 after the indicated treatments.

C, Increasing ploidy of $\alpha 3^{-/-}$ cells. Exponentially growing WT and $\alpha 3^{-/-}$ cells were analyzed by flow cytometry after DNA staining with propidium iodide. The tetraploid cells (colchicine-treated WT cells, +Colch) were used as a control. No signs of apoptosis were noticed in the $\alpha 3^{-/-}$ cells (sub-G₁ DNA content). Positions of 2N and 4N DNA content are indicated.

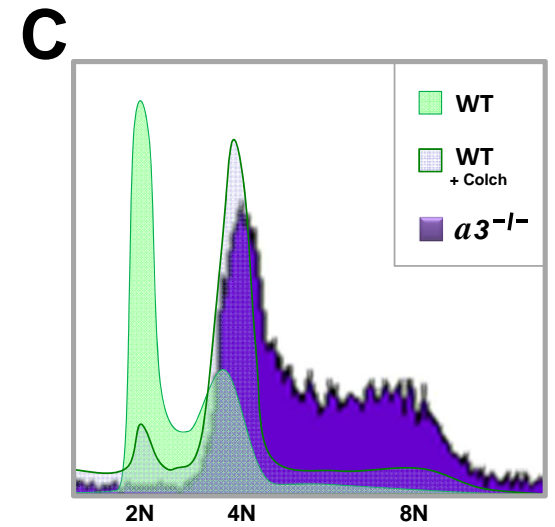
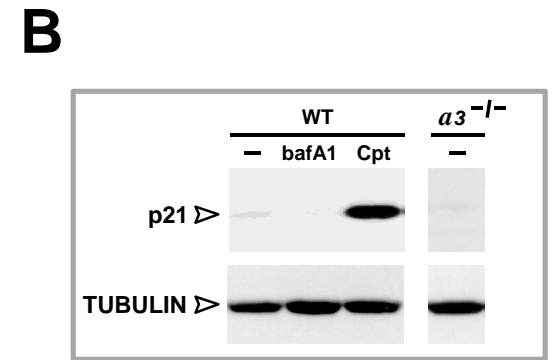
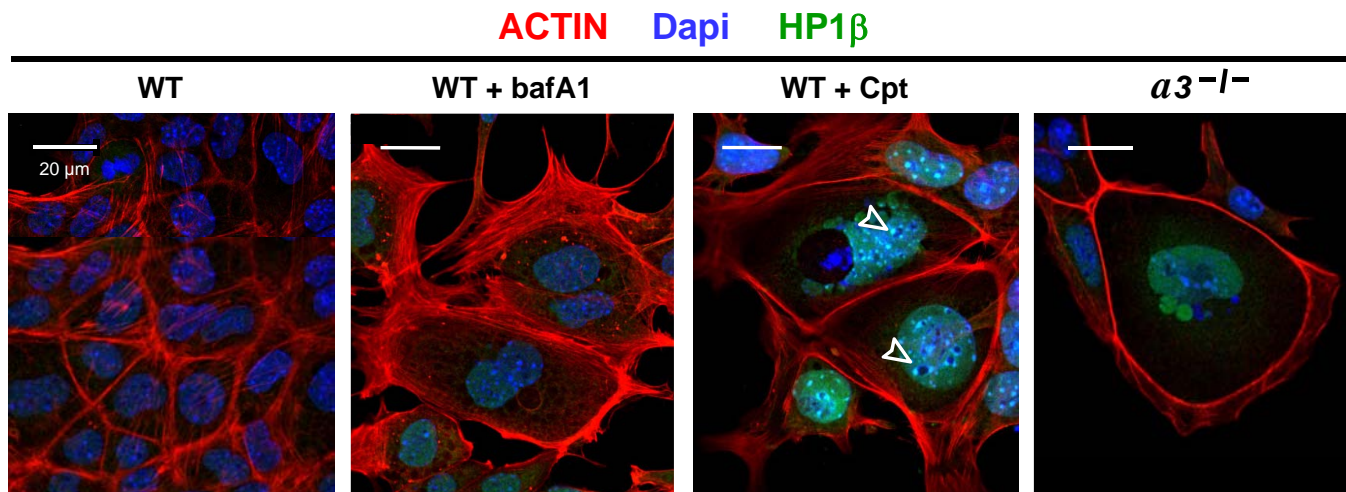
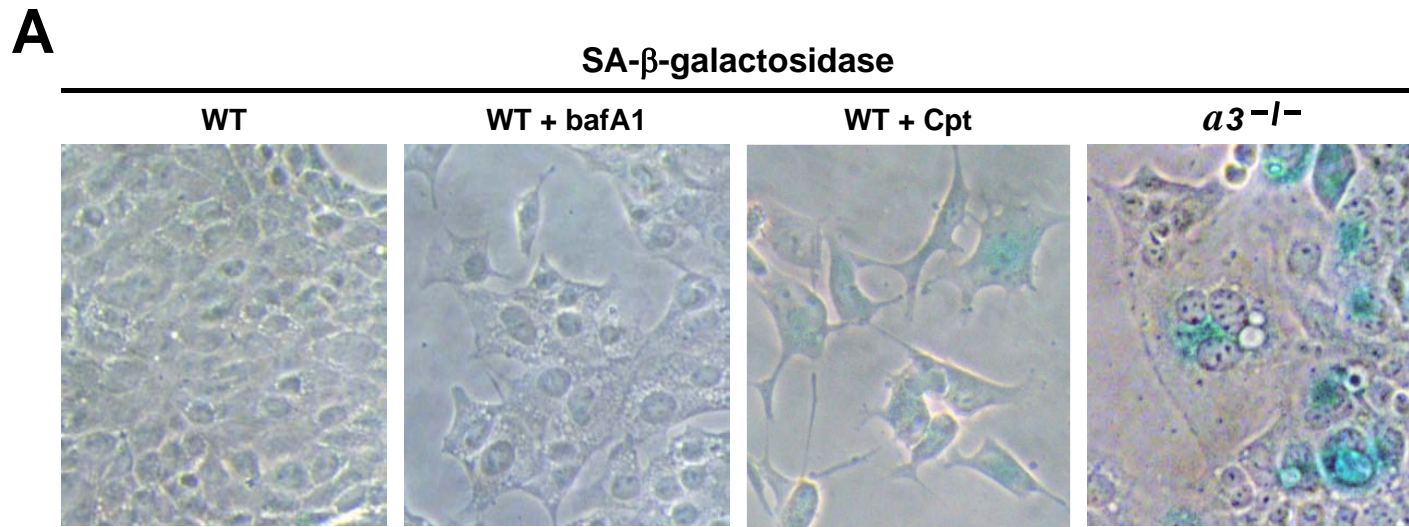


Figure S2 – Belaid *et al.* 2013

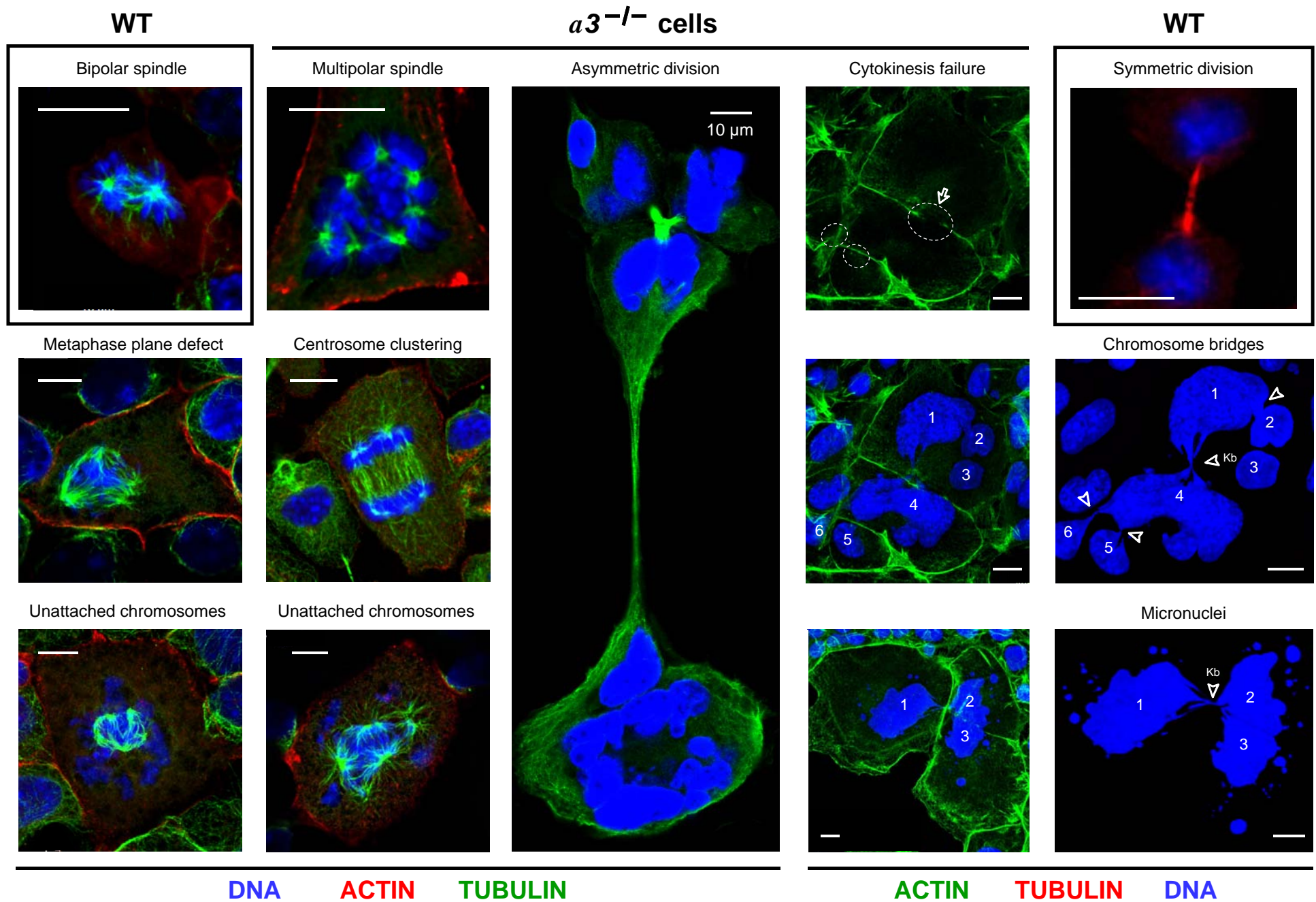


Figure S3 – Belaid *et al.* 2013

Figure S3, related to Figure 2 – Loss of $\alpha 3$ induces multiple mitotic defects.

Representative mitotic images of $\alpha 3^{-/-}$ cells and WT cells stained for DNA (DAPI, blue), microtubules (α -TUBULIN) and ACTIN (phalloidin). Midbodies were traced in white and indicated by an arrow, whereas arrowheads indicate a chromosome bridge (kb). Scale bars, 10 μ m.

Figure S4, related to Figure 3 – Vesicular pattern of RHOA and \textcircled{P} -MLC in $\alpha 3^{-/-}$ cells.

A, Representative confocal images showing in WT cells the presence of RHOA at the plasma membrane (left, arrow), and the formation of filaments of \textcircled{P} -MLC (middle, arrow) and F-ACTIN (right, arrow).

B, By contrast, we observed in $\alpha 3^{-/-}$ cells the concomitant recruitment of RHOA to intracellular membranes (that colocalized with LC3-II and LAMP1, *insets*, left) and the downstream phosphorylation of MLC. These biochemical markers of RHOA activation seem at first glance somewhat confusing, with RHOA inactivation due to sequestration. However, one has to consider that these pools of active RHOA and \textcircled{P} -MLC were exclusively distributed within intracellular vesicles (arrowheads) in $\alpha 3^{-/-}$ cells. For \textcircled{P} -MLC immunostainings, the permeabilization with Triton X-100 during cell fixation stabilizes the phosphorylation of MLC allowing its detection (2), but this method also provokes LC3 clustering artifacts (3), compromising the investigation of the nature of \textcircled{P} -MLC labeled vesicles.

C, Essential role for RHOA in cytokinesis of PCT cells and A549 cells. Constitutive RHOA activation by expression of a dominant-positive RHOA mutant (RHOA^{Q63}, RHOA⁺) in WT PCT cells and in A549 cells resulted in multinucleation (arrowhead) and in the formation of densely packed ACTIN stress fibers (arrow). Similarly, expression of a dominant-negative mutant of RHOA (RHOA^{N19}, RHOA⁻) increased the number of multinucleated cells, indicating that excessive activation or inhibition of RHOA impairs cytokinesis in PCT cells and A549 cells, in agreement with the cytokinesis defects reported for active RHOA mutants (4, 5). Note that the expression of inactive RHOA^{N19} in WT cells was sufficient to fully mimic the F-ACTIN depolymerization, multinucleation, and cell enlargement of $\alpha 3^{-/-}$ cells.

D, inhibiting RHOA by expression of RHOA^{N19} (RHOA⁻) did not rescue the spreading and the polynucleation of $\alpha 3^{-/-}$ cells, showing that RHOA over-activation was not responsible for the phenotype.

E, RAC is not affected by v-ATPase inhibition. Precipitation of the GTP-bound RAC was performed using 1 mg of cell lysate and 40 μ g of the RAC/CDC42 binding domain (PBD) of the human p21 activated kinase 1 protein (GST-PAK⁶⁷⁻¹⁵⁰-PBD; Cytoskeleton Inc.). The specificity of this assay was confirmed by adding 100 μ M GTP γ S as a positive control. Bound proteins (upper panel) and total cell lysates (lower panels) were analyzed by anti-RAC1 western blotting (clone 102; Transduction Laboratories). Western blots are representative of three independent experiments.

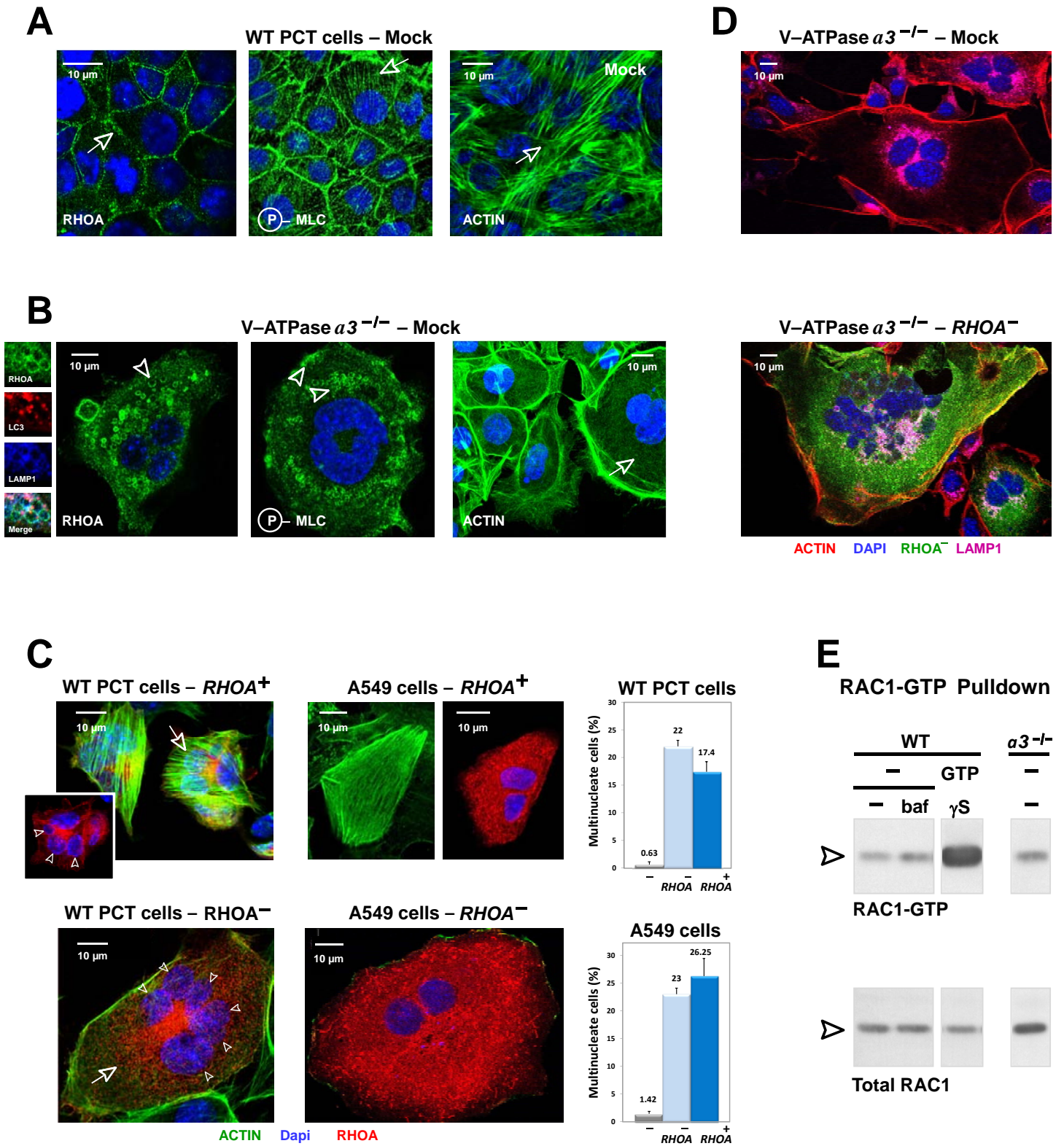


Figure S4 – Belaid *et al.* 2013

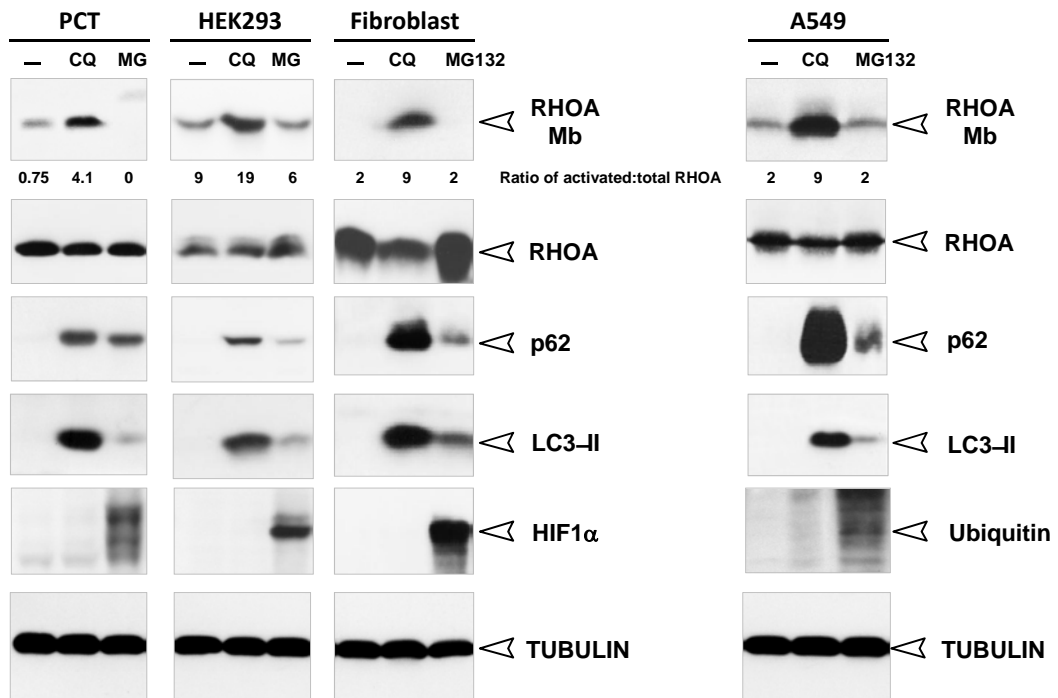
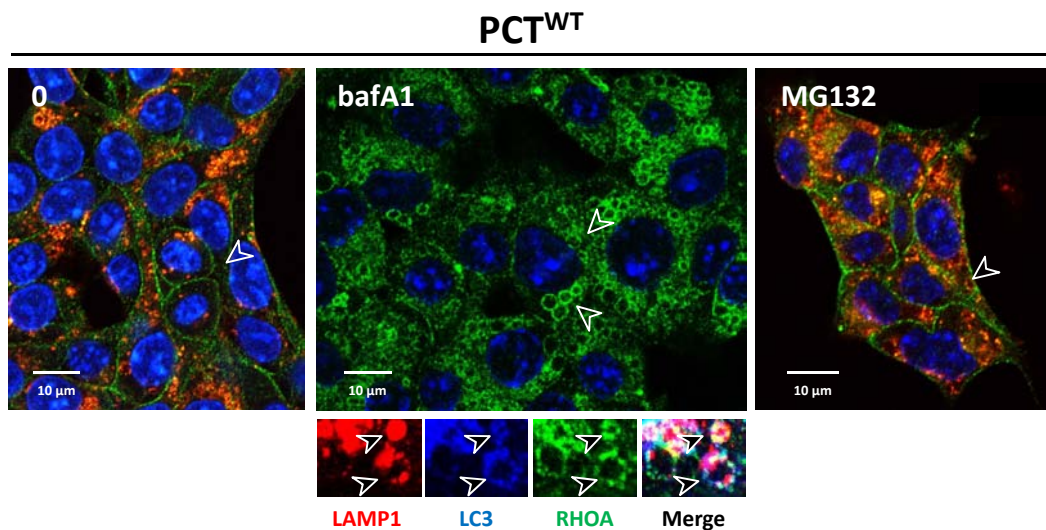
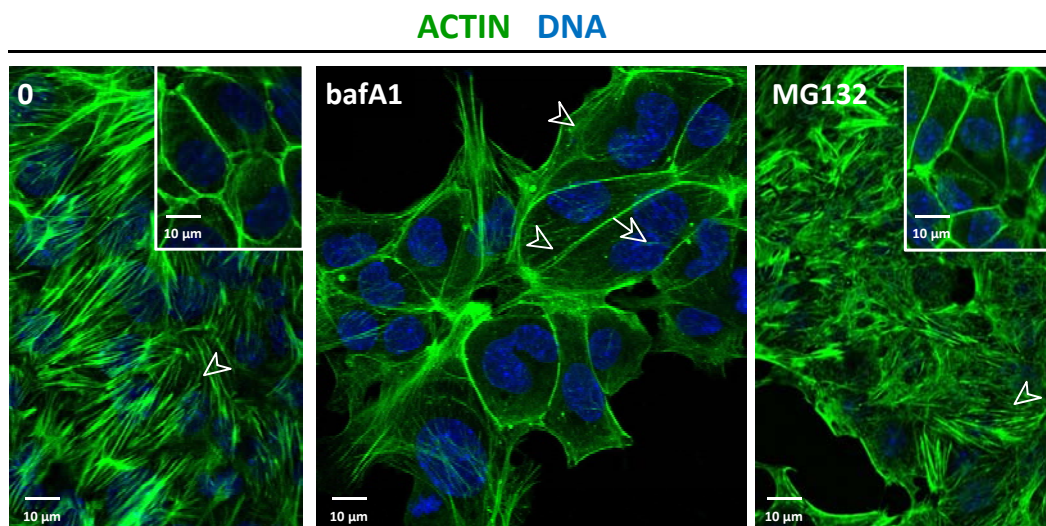
A**B****C**Figure S5 – Belaid *et al.* 2013

Figure S5, related to Figure 4 – The RHOA pathway is deregulated by inhibiting lysosomal degradation, but not proteasomal activity

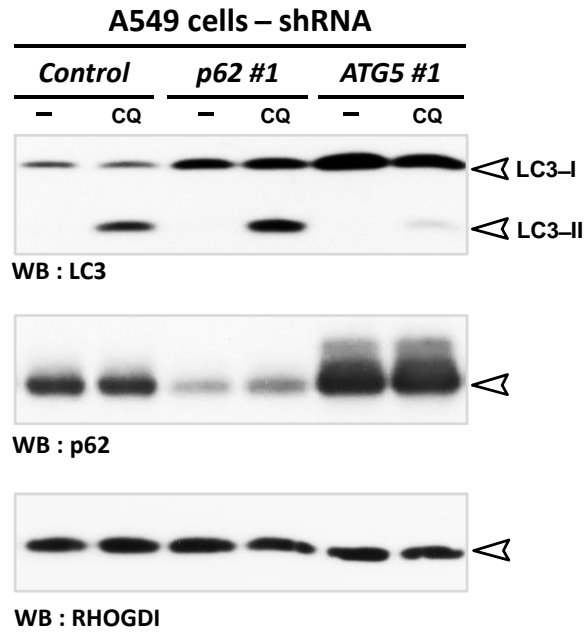
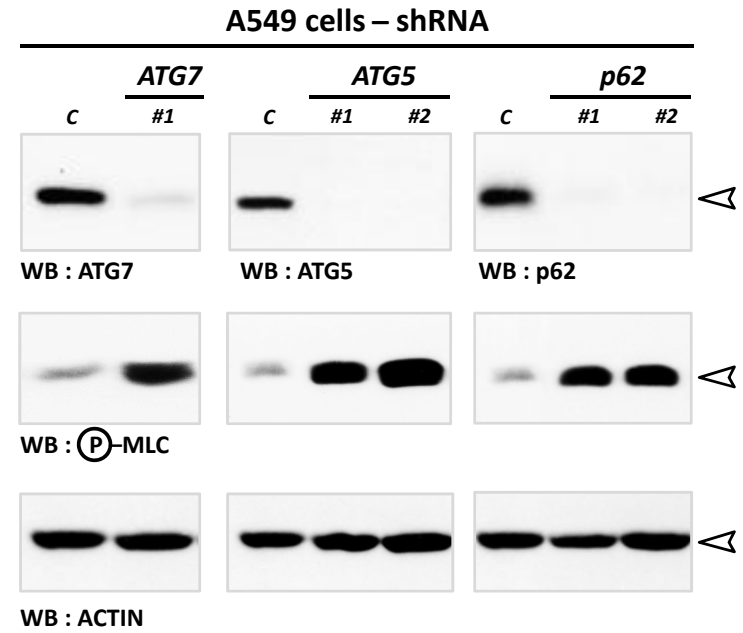
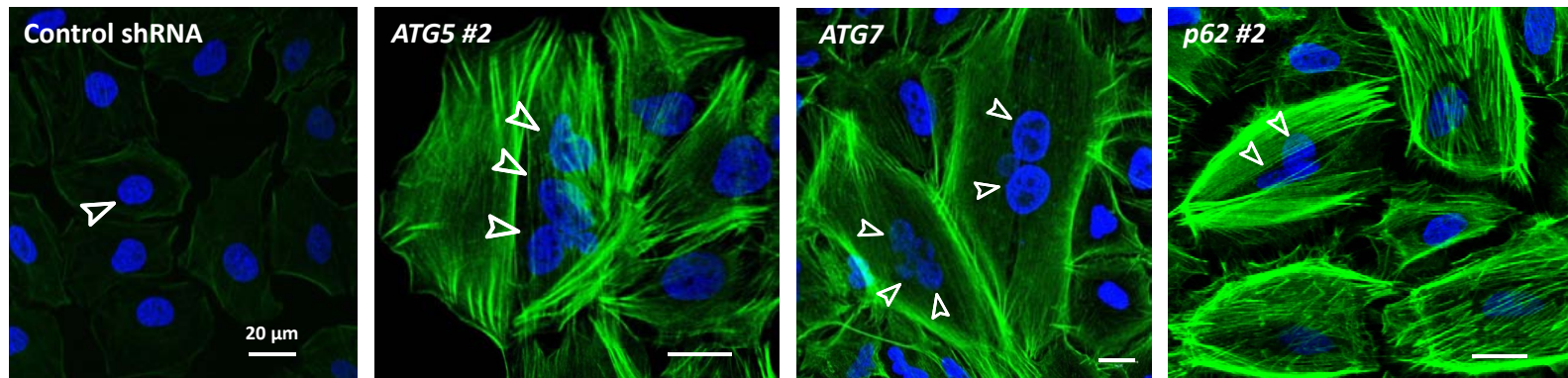
A, Accumulation of RHOA in the Triton X-100 insoluble membrane fraction of four different cell lines (murine PCT cells, human kidney cells, Swiss 3T3 fibroblasts and human lung alveolar A549 cells) in response to chloroquine (CQ; 100 μ M), but not MG132 (10 μ M) treatment for 24 h. Specificity of autophagy inhibition was analyzed by LC3-II and p62 levels. Accumulation of HIF1 α and ubiquitinated proteins served as positive controls of proteasome inhibition. Note that the ratio of activated RHOA (indicated below each lane, RHOA associated with the membrane fraction normalized to the total RHOA amount,) increased 4-fold after v-ATPase inhibition compared to MG132-treated cells and controls.

B-C, The responses of PCT WT cells to bafA1 (100 nM) and MG132 (10 μ M) treatments were examined with regard to RHOA localization (B, green; LC3, blue; and LAMP1, red); F-ACTIN depolymerization (C, phalloidin; green); nuclei (DAPI, blue) and cell enlargement.

Figure S6, related to Figures 4 and 5 – Inhibition of autophagosome formation drives an abnormal RHOA pathway and multinucleation in A549 tumor cells.

A, Autophagy-competent A549 tumor cells were transduced with lentiviruses expressing the control, *ATG5* (*ATG5* #1, and #2, two independent shRNA); *ATG7* and *p62* (*p62* #1, and #2) shRNA. Western blot analyses demonstrate autophagy inhibition (A, LC3-II, p62 levels after chloroquine treatment, 100 μ M, 4 h, CQ) and efficient decrease in protein levels of *ATG5* (*ATG12*–*ATG5* conjugate), *ATG7* and *p62* after shRNA knockdown. The data are representative of at least 3 independent experiments.

B-C, Tumor cell responses to defects in autophagosome formation (*ATG5* or *ATG7* shRNA) or sequestration (*p62* shRNA) were then examined with regard to RHOA activation (B, higher levels of Θ -MLC); F-ACTIN polymerization (C, phalloidin; green); nuclei (arrowheads), cell enlargement, and multinucleation.

A**B****C**Figure S6 – Belaid *et al.* 2013

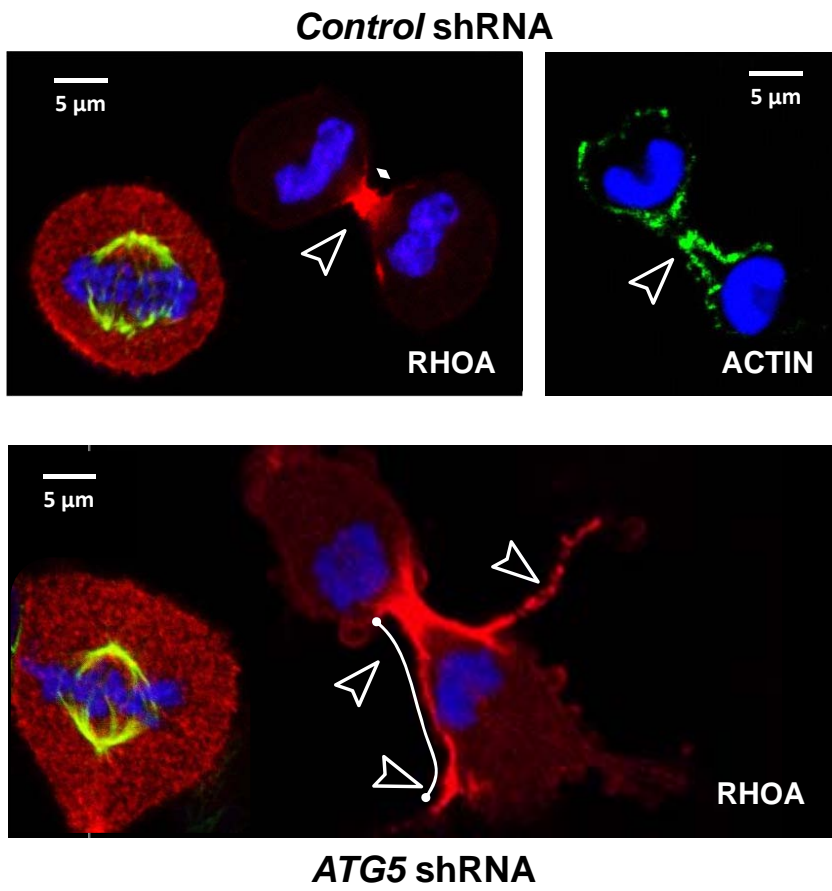
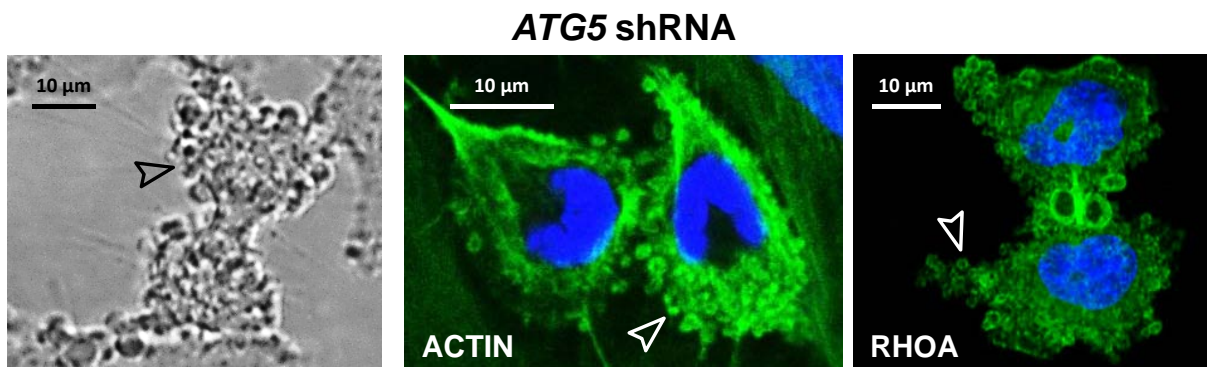
A**B**

Figure S7 – Belaid *et al.* 2013

Figure S7, related to Figure 5 – Cytokinetic defects of *ATG5*-depleted A549 cells.

A, RHOA was recruited at the equatorial furrow of *ATG5*-depleted A549 cells, yet it occupied a greater area (white line). By contrast, control cells exhibited focused RHOA (red, arrowhead) and F-ACTIN (green, arrowhead) staining at the cleavage furrow. Note that *ATG5*-depleted cells and control cells display similar cortical RHO staining during metaphase.

B, Outside the cell equator, RHOA activity was abnormally high at the cell cortex, leading to the development of ACTIN- and RHOA-labeled blebs (arrowheads) throughout the cell.

Figure S8, related to Figure 5 – the cytokinesis defects are not due to misdelivery of upstream RHOA regulators or endosomal membranes to the midbody.

A, Failure of RHOA to properly accumulate at the equatorial membrane of cytokinetic $\alpha 3^{-/-}$ cells is not a consequence of the absence of the upstream RHOA regulators, RHO GEF ECT2 (right) and the kinesin MKLP1 (Left). ECT2 (red, arrowheads) localizes in the nucleus during interphase, to the mitotic spindle during metaphase, and finally appears at the midbody during cytokinesis. The MKLP1 Immunofluorescence (red) in $\alpha 3^{-/-}$ cells helps to visualize the telophase midbody (open arrows), and the accumulation of up to five midbody remnants after abscission (arrowheads), in agreement with previously published data (6).

B, Narrowed recruitment of ECT2 at the midzone of *ATG5*-depleted cells.

C, Delivery of endosomal membranes to the midbody is not affected by *ATG5* depletion. Accumulating evidence supports a role for autophagy machinery in macroendocytosis (macropinocytosis and phagocytosis of pathogens and apoptotic bodies) (7, 8), however, the participation of autophagy in the delivery of endosomes to the abscission site remains to be elucidated. To this end, FITC-dextran (Sigma; 5 mg/mL in complete medium) was added to the cells for at least 1 h to label at steady state the endosomal pathway. After washing noninternalized probes, cells were fixed and labeled for TUBULIN. It is noteworthy that the distribution and the sizes of endosomes was not affected by the depletion of *ATG5*, in agreement with previous data (9): in interphase cells, endocytosed dextran was found in punctate structures just beneath the plasma membrane; and aligned along microtubule network towards the perinuclear region, representing early, recycling, late endosomes and lysosomes, respectively (*inset*). Significantly, we demonstrate that the delivery of endosomes to the midbody of cytokinetic cells was also independent of *ATG5*: endosomes were successfully transported to the cleavage furrow and clustered on either side of the midbody region of *ATG5*-depleted cells, as observed in control cells (*inset*).

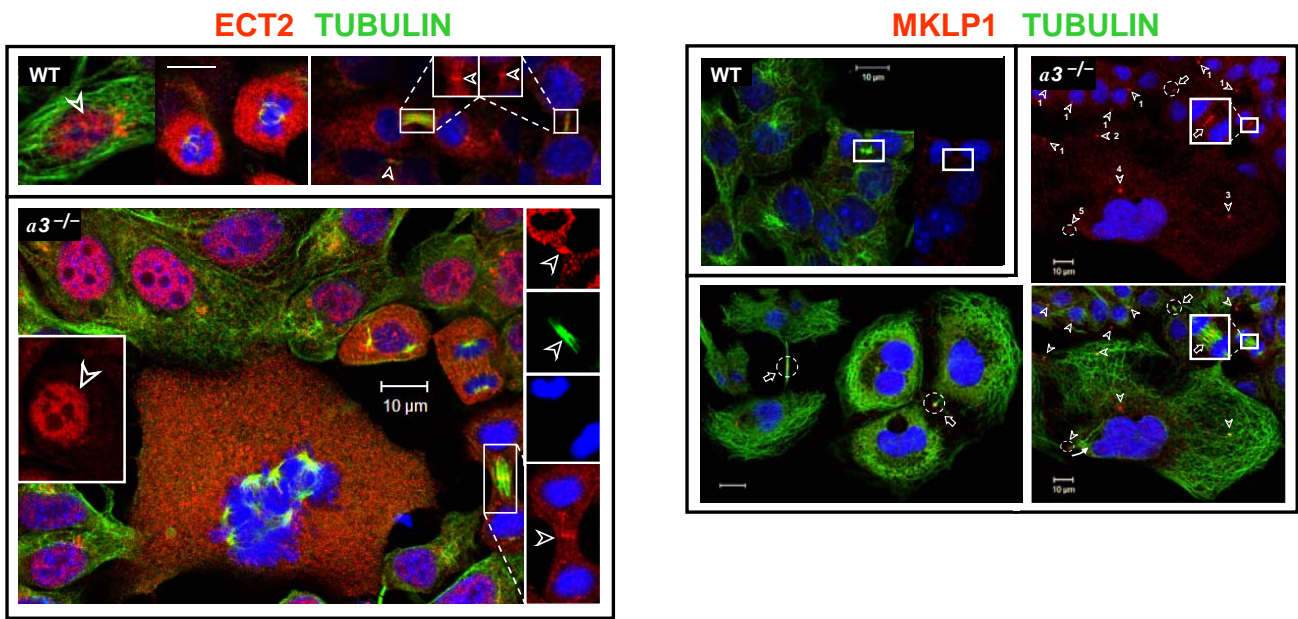
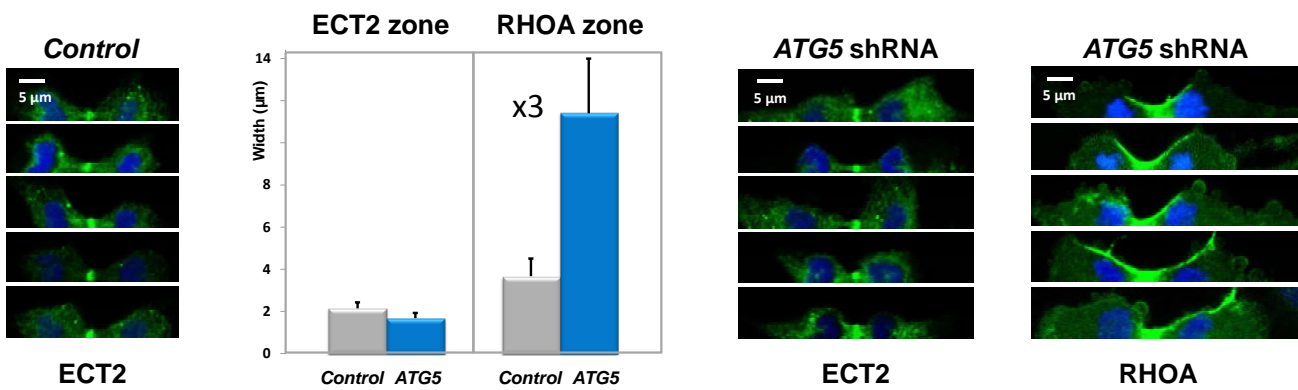
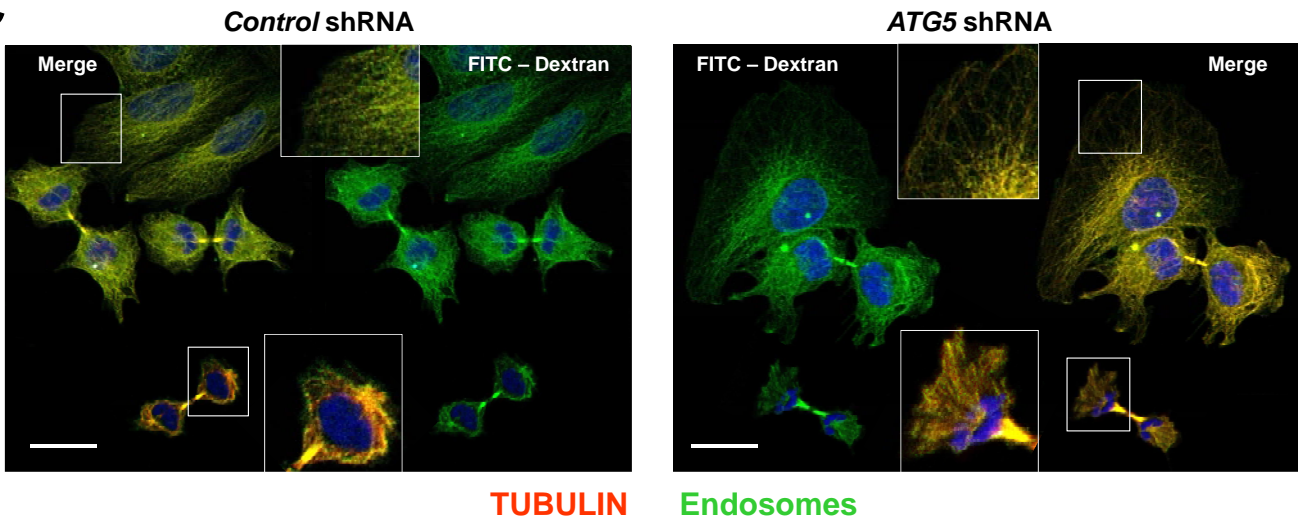
A**PCT cells****B****A549 cells****C**Figure S8 – Belaid *et al.* 2013

Table S1, related to Figure 7 – Clinical and histological data of NSCLC samples. pTNM stage: T = tumor, N = node, M = metastasis.

Sample No	Histology	pT stage	pN stage	pM stage	pTNM stage	Gender	Age (years)
LB09-0421	Invasive acinar adenocarcinoma	T2a	N0	M0	IB	M	61
LB09-0477	Invasive acinar adenocarcinoma	T2a	N0	M0	IB	M	53
LB10-0464	Invasive papillary adenocarcinoma	T2a	N0	M0	IB	M	53
LB10-0520	Invasive acinar adenocarcinoma	T2a	N0	M0	IB	M	57
LB09-0442	Invasive acinar adenocarcinoma	T2a	N2	M0	IIIA	M	43
LB10-0186	Invasive acinar adenocarcinoma	T4	N0	M0	IIIA	M	67
LB10-0515	Invasive papillary adenocarcinoma	T2a	N2	M0	IIIA	M	59
LB09-0399	Invasive acinar adenocarcinoma	T2a	N2	M0	IIIA	M	50

Materials and Methods

Cell culture and treatments

To inhibit the maturation of autophagosomes into degradative autolysosomes, renal cells derived from proximal convoluted tubules of wild-type (WT, *a3*^{+/+}) or the lysosomal v-ATPase *a3/TCIRG1*-null mice (*a3*^{-/-}, Jackson Laboratory) (10) were isolated and immortalized with the pSV3 neo vector, as described previously (11). G418-resistant clones were picked, expanded, and assayed for *a3* expression by RT-PCR experiments. The renal epithelial cell lines that do or do not express *a3* were referred to as WT and *a3*^{-/-} cells, respectively, and were maintained in collagen-coated Petri dishes, in M1 medium (12): DMEM/F12 (Invitrogen) containing 1% fetal calf serum (FCS), 1 nM EGF, 5 μM insulin, 2.5 pM dexamethasone, 30 pM selenium, 5 μM transferrin, 10 nM triiodothyronin (Sigma), 20 mM HEPES pH 7.4, and 2 mM glutamine.

As controls, fibroblasts, HEK 293 and human lung (A549) epithelial cell lines were maintained

in DMEM/F12 medium supplemented with 10% FCS. To inhibit the last step in the autophagic degradation process, cells were treated with a specific inhibitor of v-ATPase activity, bafA1 (100 nM, Sigma); or a weak base that raises intralysosomal pH, CQ (100 μM, Sigma). Alternatively, the formation of autophagosomes was inhibited at the initiation step by *ATG5* or *ATG7* shRNA. For this purpose, the *Atg5* shRNA lentivirus (Sigma, murine, NM_053069, CCGGGCAGAACCATACTATTTGCTTCTCGAGAAGCAAATAGTATGGTTCTGCTTTTTG; human, NM_004849, *ATG5* #1, CCGGCCTGAACAGAATCATCCTTAACCGAGTTAAGGATGATTCTGTTTCAGGTTTTTTG; human *ATG5* #2, CCGGCCTGAACAGAATCATCCTTAACCGAGTTAAGGATGATTCTGTTTCAGGTTTTTTG), the *ATG7* shRNA lentivirus (Sigma, human, NM_006395, CCGGGCCTGCTGAGGAGCTCTCCATCTCGAGA TGGAGAGCTCCTCAGCAGGCTTTTT) and control shRNA lentivirus (Sigma, SHC002V) were transduced into the cells. To establish a *p62* knockdown stable cell line, A549 cells were transduced with *p62* shRNA lentivirus (Sigma, human, NM_003900, *p62* #1, CCGGCCTCTGGGCATTGAAGTTGATCTCGAGATCAACTCAATGCCCA GAGGTTTTT; human *p62* #2, CCGGCCGAATCTAC

ATTAAGAGAACTCGAGTTCTCTTAATGTAGATTCGGTTTTT). ShRNA-mediated protein downregulation was controlled by immunoblotting (ATG5, clone 7C6, Nanotools and ATG7, clone D12B11, Cell Signaling Technology Inc.) or by RT-PCR with specific primers. As a further control, we analyzed the phenotype of *Atg5* knockout MEFs (kindly provided by N. Mizushima) (13). When required, MG132 (10 μ M; Sigma) was added to inhibit proteasomal degradation. All pharmacological inhibitors at the doses studied here failed to induce cell death for 18–24 h. The specificity of autophagy and proteasome impairments was checked by the accumulation of autophagy (LC3-II and p62; Nanotools clone 5F10 and BD Transduction Laboratories™ #610833, respectively) and proteasome (ubiquitinated proteins and HIF1 α : DAKO Z0458 and R & D SYSTEMS Clone 241812, respectively) substrates.

Clinical samples

Primary NSCLC (*i.e.*, pairs of pathological and control tissues from the same patient) were obtained from patients in Nice (France) and collected by the Tumor Biobank of Nice Hospital (14). All patients received the necessary information concerning the study, and consent was obtained from each of them. The study was approved by the local ethics committees (CHU of Nice, agreement 2010–06). Morphological classification was assigned according to WHO criteria (15). The tumors were staged according to the 7th edition of the international tumor-node-metastasis system (16). The main clinical and pathological data are summarized in Supplementary Table S1.

Analysis of autophagy

The activity of the autophagy pathway was monitored by four hallmarks: *i*) the formation of autophagic vesicles; and the degradation of three well-established autophagy substrates:

ii) membrane-associated LC3-II; *iii*) p62 (SQSTM1); and *iv*) long-lived proteins.

Formation of autophagic vesicles

Cells seeded on glass coverslips, were transiently transfected with EGFP-LC3 expression plasmids (17) using FuGene^{HD} (Roche Diagnostics or Promega). After 3 h transfection, cells were washed and allowed to recover for 24 h before bafA1 treatment (100 nM, 18 h). At the indicated times, the cells were fixed and subjected to anti-LAMP1 labeling (1:500, BD Pharmingen) to detect autolysosomes (LC3⁺ and LAMP1⁺). Alternatively, translocation of LC3 to the autophagic vesicles was analyzed by anti-LC3 immunofluorescence (1:500, clone 5F10, Nanotools). Pictures were taken with a 63x magnification lens using a confocal laser-scanning microscope (Zeiss) fitted with a 488- or 543-nm krypton/argon laser allowing simultaneous analysis of the fluorescein and rhodamine chromophores. The formation of autophagosomes is also followed by the increased formation of the ATG12–ATG5 conjugate by anti-ATG5 western blotting (clone 7C6, Nanotools).

Analysis of LC3-II and p62 degradation by western blotting

LC3 is a cytosolic protein that upon activation of macroautophagy is conjugated to phosphatidylethanolamine on phagophore membranes and ultimately degraded in an autolysosome. This lipid-conjugated LC3-II (16 kD) form can be separated from the nonconjugated form (LC3-I, 18 kD) by immunoblotting as previously described (18) with anti-LC3 (1:1,000, clone 5F10; Nanotools). In addition to LC3, we analyzed the levels of p62, a specific autophagy substrate, by western blotting using anti-p62 antibodies (BD Transduction Laboratories™; #610833, 1:1000 or Santa Cruz Biotechnology; SC25575; 1:500). After washing, the presence of primary antibodies was revealed with horseradish peroxidase

conjugated–anti-mouse (1:6,000; sc-2005; Santa Cruz Biotechnology) or –anti-rabbit (1:10,000; sc-45040; Santa Cruz Biotechnology), and visualized with the Enhanced Chemiluminescence detection system (Perkin Elmer). After stripping, equal loading of proteins was verified by reprobing the same blots with anti-ACTIN or anti-TUBULIN (Santa Cruz Biotechnology).

Degradation of long-lived proteins

Protein degradation was determined according to the method previously reported (18, 19). Briefly, cells were incubated for 72 h at 37°C in fresh DMEM/F12 medium containing 2% dialyzed FCS and 0.15 μ Ci of L-[¹⁴C] valine (Amersham Pharmacia Biotech Europe). After washing, cells were chased with culture medium containing 10 mM cold valine. The chase medium was replaced with either a fresh DMEM/F12 complete medium supplemented with growth factors (Insulin Transferrin Selenium, ITS-A, Invitrogen) and amino acids (constitutive degradation) or serum and amino acid-free medium (HBSS, starvation-induced degradation) and, when required, bafA1 (100 nM) was added to inhibit v-ATPase activity. Total protein degradation was then analyzed for a period of 5 h by measuring the trichloroacetic acid (TCA)-soluble radioactivity. Both cells and media were precipitated in 10% TCA, and total proteolysis was calculated as the percent of acid-soluble radioactivity (amino acids and peptides) based on the sum of acid-soluble and acid-precipitable radioactivities (proteins). In parallel, the above proteolysis experiments were performed in the presence of 20 mM NH₄Cl or 10 mM 3MA to block lysosomal proteolysis and autophagy, respectively. Nonlysosomal-dependent degradation (which is largely mediated by the proteasome) was the percent of protein degradation resistant to NH₄Cl. The contribution of autophagy was calculated by subtracting the radioactivity remaining after inhibition with 3MA from the total radioactivity. All experiments were performed at least three times with duplicate samples.

Ploidy determination and chromosomal abnormalities by metaphase spread

At 70% confluency, cells were arrested with colchicine (24 μ g/ml, overnight; Invitrogen) in metaphase. Cells were then harvested by trypsinization, centrifuged and allowed to swell up by incubation in hypotonic 0.1x Hank's solution followed by methanol:acetic acid fixation (3:1 v/v; overnight 4°C) before being dropped onto a glass slide. Giemsa-stained mitotic chromosomes were photographed.

Ploidy determination of $\alpha 3^{-/-}$ cells by flow cytometry

WT and $\alpha 3^{-/-}$ cells were fixed for 1 h in ice-cold 70% ethanol in PBS and stained overnight in PBS containing 2.5 μ g/mL propidium iodide and 250 μ g/mL ribonuclease A (Sigma) at 4°C. The DNA content was measured by flow cytometry (Becton Dickinson FACScan). G₁, S, and G₂/M cells were quantified according to the DNA content of the cell using CELLQuest software (Becton Dickinson). At least 20,000 cells were analyzed per sample. WT cells synchronized at metaphase by colchicine treatment (24 μ g/ml, 16 h; Invitrogen) were used as a reference 4N peak.

Detection of senescent cells

Senescent cells were identified by the expression of a lysosomal β -galactosidase activity at pH 6.0 (SA- β -Gal staining kit; Cell Signaling Technology Inc.), senescence-associated heterochromatin foci (SAHFs), and the upregulation of the cell cycle inhibitor p21. SAHFs are detected by the preferential binding of DNA dyes, such as DAPI, and the presence of heterochromatin protein-1 β (anti-HP1 β , Chemicon). As a positive control, senescence of WT cells was induced by camptothecin (Cpt 0.7 μ M, 4 days).

Quantification of cell and nuclei area

Cells seeded on glass coverslips were fixed for 15 min in 3.7% paraformaldehyde in PBS and permeabilized for 5 min with 0.3% Triton X-100 (Sigma) at room temperature. Cell boundaries were labeled by TRITC-conjugated phalloidin (Sigma) and nuclei were stained with DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, Invitrogen). Confocal images were acquired using a Zeiss confocal microscope with a 63x magnification lens. 10 to 15 pictures (at least 100 cells per genotype) were captured randomly using the same gain and offset settings from each sample. Then, the average pixel intensity and the area of nuclei and cells were estimated using Visilog 5.3 software® and expressed in μm^2 (NOESIS VISION Inc., France).

Time-lapse video microscopy

For monitoring single-cell progression through mitosis, exponentially growing cells cultured in complete growth medium were imaged on an inverted microscope (Carl Zeiss) equipped with a CO₂-equilibrated chamber (37°C and 5% CO₂) and a motorized X-Y stage. Three different fields per condition were photographed and a total of 18 fields were followed in three independent experiments. Images were captured every 5 min with a $\times 20$ ph2 ($\alpha 3^{-/-}$) and $\times 32$ ph1 (WT) phase-contrast objective during 18 h using MetaMorph 2.0 software (Molecular Devices). Videos were generated from the acquired images with ImageJ. The duration of cytokinesis was quantified from the formation of two daughter cells to abscission.

Analysis of the RHOA pathway

The activity of the RHOA pathway was monitored by *i*) the levels of active GTP-bound RHO (RHOTEKIN RHO Binding Domain Pull-down and ELISA-based G-LISA assays, Cytoskeleton Inc.); *ii*) the recruitment of RHOA to membranes; and *iii*) the downstream Ser19-phosphorylation of

myosin regulatory light chain (α -MLC, Cell Signaling Technology) and reticulation of the ACTIN cytoskeleton.

RHOTEKIN RBD pull-down assay

In brief, WT and $\alpha 3^{-/-}$ cells were grown to 60% confluence, then cultured in serum-free medium supplemented with growth factors (Insulin Transferrin Selenium, ITS-A, Invitrogen). After 18 h, cells were lysed in G-LISA lysis buffer (supplemented with protease inhibitor cocktail; Cytoskeleton Inc.), then clarified by centrifugation for 2 min at 10,000g. One mg of cell lysate was immediately affinity-precipitated at 4°C for 1 h with 40 μg of GST-RHOTEKIN-RHO binding domain (RBD) fusion proteins freshly precoupled to glutathione-agarose beads. Beads were then washed three times with RBD buffer (50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 10 mM MgCl₂, and 1% Triton X-100) and the bound RHOA-GTP was eluted in 1 volume of Laemmli buffer. Samples were resolved by 15% SDS-PAGE followed by anti-RHOA immunoblotting (clone 26C4; Santa Cruz Biotechnology; 1:250) to detect the active RHOA GTPases. Total RHOA GTPases were measured in whole cell lysates (directly solubilized in Laemmli buffer) that were used for the affinity isolation studies. Precipitation of the GTP-bound RAC was also performed using 1 mg of cell lysate and 40 μg of the RAC/CDC42 binding domain (PBD) of the human p21 activated kinase 1 protein (GST-PAK⁶⁷⁻¹⁵⁰-PBD; Cytoskeleton Inc.). The specificity of these assays was confirmed by adding 100 μM GTP γ S as a positive control.

RHOA recruitment to cellular membranes

RHOA activation was also assessed by its association with Triton X-100 insoluble membrane fractions (20). Cells (in 100-mm Petri dishes) were washed in PBS and solubilized with ice cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5% Triton X-100, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM β -glycerophosphate, 10 mM NaF; 25 mM NaPPi, 1

mM EDTA, and Complete™ protease inhibitors) for 30 min at 4°C. Lysates were subjected to centrifugation at 15,000g for 15 min at 4°C. The insoluble proteins in the pellet fraction were then dissolved by sonication in Laemmli buffer. 70 µg of insoluble fractions were subjected to anti-RHOA western blotting (clone 26C4; Santa Cruz Biotechnology, 1:250). The relative amount of active RHOA was determined by the ratio of membrane RHOA/total RHOA (membrane RHOA + cytosolic RHOA).

RHOA immunoprecipitation

Untreated and CQ-treated A549 cells (100 µM, 20 h) were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris, pH 8, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.2% sodium deoxycholate; 150 mM sodium chloride, and 2 mM EDTA supplemented with 100 mM N-ethyl maleimide, 1 mM Na₃VO₄, 20 mM β-glycerophosphate, 1.25 mM NaPPI, 5 mM NaF and Complete™ protease inhibitors), and clarified by centrifugation for 15 min at 10,000g. Total cell lysate (2 mg) was incubated with 4 µg of anti-RHOA antibody (mouse, clone 26C4, Santa Cruz Biotechnology) for 18 h at 4°C. Immunoprecipitation with nonimmune immunoglobulins under the same condition served as a negative control. Mouse exacta beads (40 µL, Santa Cruz Biotechnology; sc-45040) were added into the mixture and incubated with agitation for an additional 3 h at 4°C. The immunoprecipitated samples were washed four times with cell lysis buffer, two times with PBS and subjected to western blotting with anti-ubiquitin (Rabbit; DAKO Z0458; 1:6000), anti-p62 (Rabbit; Santa Cruz Biotechnology; sc25575; 1:500), anti-LC3 (Nanotools; clone 5F10; 1:1000) and anti-RHOA antibodies (clone 26C4; Santa Cruz Biotechnology; 1:100 and Cytoskeleton Inc.; #GL01; 1:500).

Analysis of the RHOA pathway by immunofluorescence staining

To determine whether RHOA is membrane associated and thus activated, cells were fixed with ice-cold 10% TCA for 15 min, a method that preserves membrane-associated, but not cytoplasmic, RHOA (21). RHOA intensity profiles along the cell edge (expressed in arbitrary units) were generated from maximum intensity projections using the free-hand function of Zen software (Zeiss). The length and intensity (area under the curve) of the RHO zone within and outside the equatorial furrow were analyzed using Visilog (Noesis). Alternatively, cells were fixed in PBS with 3.7% paraformaldehyde for 15 min at room temperature before staining of the ACTIN cytoskeleton with TRITC-phalloidin (1 h; room temperature; 1:1,000; Sigma). For anti- β -MLC labeling, cells were fixed for 10 min in PBS with 3.7% paraformaldehyde and 0.5% Triton X-100 (2). The cells were then washed in PBS, and permeabilized in 0.3% Triton X-100 in PBS for 5 min. After saturation, cells were incubated with either anti-RHOA (clone 26C4; 1:100; Santa Cruz Biotechnology), anti-phospho(Ser19)-MLC2 (1:50; Cell Signaling Technology), ECT2 (C-20; 1:75; Santa Cruz Biotechnology), MKLP1 (H-110; 1:100; Santa Cruz Biotechnology) or anti-TUBULIN (Clone DM 1A; T9026; 1:700; Sigma) antibodies for 18 h at 4°C. Incubation with appropriate secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488, 568, or 647 (Molecular Probes,) was carried out for 1 h at room temperature, followed by staining of DNA with DAPI (Invitrogen) for 5 min. Slides were mounted with Pro Long Gold antifade reagent with DAPI after three washes with PBS, and examined using a confocal microscope (Zeiss).

RhoA mRNA levels

Total RNA was purified from cell-lines and tumor samples using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) through the QIAcube (Qiagen) and was treated with DNase I (NEB). Reverse transcription was performed with the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) on 1 µg of total RNA. For real time detection of *RhoA* and *Rplp0* (internal control)

transcripts, PCR was performed on equal amounts of cDNA using SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), and the following sets of oligonucleotides: murine *RhoA*-F: 5'-CATGCTCCACGCGTCTGCCATG-3'; murine *RhoA*-R: 5'-GCCACGATTGCTCAAGAACGCA-3'; murine *Rplp0*-F: 5'-TCCAGGCTTTGGGCATCA-3'; murine *Rplp0*-R: 5'-CTTTATCAGCTGCACATCACTCAGA-3'; human *RHOA*-F: 5'-GTCTGGTCTTCAGCTA CCCGCCTTC-3'; human *RHOA*-R: 5'-CAGTTTCTCCGGATGGCAGCC-3'; human *RPLP0*-F: 5'-GCATCA GTACCCATTCTAT-3' and human *RPLP0*-R: 5'-AGGTGTAATCCGTCTCCACA-3'. The conditions of real-time PCR were as follows: stage 1, 50°C for 2 min, stage 2, 95°C for 10 min, stage 3, 40 cycles at 95°C for 15 sec, 60°C for 1 min, stage 4, 95°C for 15 sec, 60°C for 1 min, 95°C for 15 sec, 60°C for 15 sec. Data were analyzed using the 7500 software system (Applied Biosystems).

Analysis of RHOA localization in NSCLC by immunohistochemistry

RHOA immunostainings were performed on a Benchmark XT automated immunostainer (Ventana medical systems, Roche). Briefly, serial

deparaffinized tissue sections were pretreated 60 min with cell conditioner #2 (citrate buffer, pH 6) for RHOA or cell conditioner #1 (EDTA buffer, pH 8.4) for p62 to unmask antigen targets, followed by incubation with anti-RHOA (Santa Cruz Biotechnology; clone 26C4; 1:600) or anti-p62 (BD Transduction Laboratories™; #610833; 1:400) for 2 h at 37°C. Incubation with nonimmune immunoglobulins under the same condition served as a negative control. Wash steps with reaction buffer (Tris pH 7.6, Ventana) were performed at 37°C. Sections were then incubated with biotinylated secondary antibody for 8 min at 37°C, rinsed, and incubated with streptavidin biotinylated peroxidase complex (XT iView DAB V.1 detection kit, Ventana) for 8 min at 37°C. Diaminobenzidine was the chromogen and tissue sections were counterstained with hematoxylin II (Ventana) for 8 min. RHOA and p62 immunoreactivity were identified as brown dots in NSCLC sections counterstained with hematoxylin. A microscope (Axio Observer D1; Carl Zeiss) equipped with a digital camera (AxioCam MRm; Carl Zeiss) and AxioVision software (Carl Zeiss) was used for picture acquisition.

References

1. Fass E, Shvets E, Degani I, Hirschberg K, Elazar Z. Microtubules support production of starvation-induced autophagosomes but not their targeting and fusion with lysosomes. *J Biol Chem.* 2006;281:36303-16.
2. Bhadriraju K, Elliott JT, Nguyen M, Plant AL. Quantifying myosin light chain phosphorylation in single adherent cells with automated fluorescence microscopy. *BMC Cell Biol.* 2007;8:43.
3. Ciechomska IA, Tolkovsky AM. Non-autophagic GFP-LC3 puncta induced by saponin and other detergents. *Autophagy.* 2007;3:586-90.
4. Morin P, Flors C, Olson MF. Constitutively active RhoA inhibits proliferation by retarding G(1) to S phase cell cycle progression and impairing cytokinesis. *Eur J Cell Biol* 2009;88:495-507.
5. Lee JS, Kamijo K, Ohara N, Kitamura T, Miki T. MgcRacGAP regulates cortical activity through RhoA during cytokinesis. *Exp Cell Res.* 2004;293:275-82.
6. Pohl C, Jentsch S. Midbody ring disposal by autophagy is a post-abscission event of cytokinesis. *Nat Cell Biol.* 2009;11:65-70.
7. Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SWG, Moshiah S, Dorsey F, Connell S, et al. Toll-like receptor signalling in macrophages

- links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature*. 2007;450:1253-7.
8. Florey O, Overholtzer M. Autophagy proteins in macroendocytic engulfment. *Trends Cell Biol*. 2012;22:374-80.
 9. Li C, Macdonald JI, Hryciw T, Meakin SO. Nerve growth factor activation of the TrkA receptor induces cell death, by macropinocytosis, in medulloblastoma Daoy cells. *J Neurochem*. 2010;112:882-99.
 10. Scimeca JC, Franchi A, Trojani C, Parrinello H, Grosgeorge J, Robert C, et al. The gene encoding the mouse homologue of the human osteoclast-specific 116-kDa V-ATPase subunit bears a deletion in osteosclerotic (oc/oc) mutants. *Bone*. 2000;26:207-13.
 11. Rubera I, Tauc M, Verheecke-Mauze C, Bidet M, Poujeol C, Touret N, et al. Regulation of cAMP-dependent chloride channels in DC1 immortalized rabbit distal tubule cells in culture. *Am J Physiol*. 1999;276:F104-F21.
 12. L'Hoste S, Chargui A, Belfodil R, Duranton C, Rubera I, Mograbi B, et al. CFTR mediates cadmium-induced apoptosis through modulation of ROS level in mouse proximal tubule cells. *Free Radic Biol Med*. 2009;46:1017-31.
 13. Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*. 2004;432:1032-6.
 14. www.biobank06.com/agreement LPB04/LPB05.
 15. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2011;6:244-85.
 16. Goldstraw P. The 7th Edition of TNM in Lung Cancer: what now? *J Thorac Oncol*. 2009;4:671-3.
 17. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*. 2000;19:5720-8.
 18. Corcelle E, Nebout M, Bekri S, Gauthier N, Hofman P, Poujeol P, et al. Disruption of autophagy at the maturation step by the carcinogen lindane is associated with the sustained mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activity. *Cancer Res*. 2006;66:6861-70.
 19. Fuertes G, Martin De Llano JJ, Villarroja A, Rivett AJ, Knecht E. Changes in the proteolytic activities of proteasomes and lysosomes in human fibroblasts produced by serum withdrawal, amino-acid deprivation and confluent conditions. *Biochem J*. 2003;375:75-86.
 20. Zeidan A, Javadov S, Chakrabarti S, Karmazyn M. Leptin-induced cardiomyocyte hypertrophy involves selective caveolae and RhoA/ROCK-dependent p38 MAPK translocation to nuclei. *Cardiovasc Res*. 2008;77:64-72.
 21. Yüce O, Piekny A, Glotzer M. An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA. *J Cell Biol*. 2005;170:571-82.

Autophagy and SQSTM1 on the RHOA(d) again

Emerging roles of autophagy in the degradation of signaling proteins

Amine Belaid^{1,2,3,4}, Papa Diogop Ndiaye^{1,2,3,4}, Michaël Cerezo^{1,2,5}, Laurence Cailleteau^{1,2},
Patrick Brest^{1,2,3,4}, Daniel J. Klionsky⁶, Georges F. Carle^{2,4,7}, Paul Hofman^{1,2,3,4,8},
Baharia Mograbi^{1,2,3,4}✉

¹Institute of Research on Cancer and Ageing of Nice (IRCAN), INSERM U1081, CNRS UMR7284, Nice, F-06107, France; ²Université de Nice-Sophia Antipolis, Faculté de Médecine, Nice, F-06107, France; ³Equipe Labellisée par l'ARC 9 rue Guy Môquet F- 94803 Villejuif, France; ⁴Centre Antoine Lacassagne, Nice, F-06107, France; ⁵INSERM U895 / C3M: Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Nice, F-06204, France; ⁶University of Michigan, Life Sciences Institute, Ann Arbor, Michigan, 48109 USA; ⁷Laboratoire TIRO-MATOs UMR E4320, Commissariat à l'Energie Atomique, Nice, F-06107, France; ⁸Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Pasteur Hospital, Laboratory of Clinical and Experimental Pathology, Nice, France.

Short title: Control of the RHOA pathway by Autophagy

Keywords: Autophagy; RHOA; tumor suppression; cytokinesis; aneuploidy, migration

Degradation of signaling proteins is one of the most powerful tumor-suppressive mechanisms by which a cell can control its own growth, its survival and its motility. Emerging evidence suggests that autophagy limits several signaling pathways by degrading kinases, downstream components and transcription factors; however, this often occurs under stressful conditions. Our recent studies revealed that constitutive autophagy temporally and spatially controls the RHOA pathway. Specifically, inhibition of autophagosome degradation induces the accumulation of the GTP-bound form of RHOA. The active RHOA is sequestered via SQSTM1/p62 within autolysosomes, and accordingly fails to localize to the spindle midbody or to the cell surface, as we demonstrate herein. As a result, all RHOA-downstream responses are deregulated, thus driving cytokinesis failure, aneuploidy and motility, three processes that directly have an impact upon cancer progression. We therefore propose that autophagy acts as a degradative brake for RHOA signaling and thereby controls cell proliferation, migration and genome stability.

Abbreviations: Atg; autophagy-related, GAP; GTPase-activating proteins, GEF; guanine nucleotide exchange factors, LAMP; lysosomal-associated membrane protein, MAP1LC3 (LC3); microtubule-associated protein 1 light chain 3, shRNA; short hairpin RNA, SQSTM1/p62; sequestosome 1, *Tcirg1/a3*; T-Cell Immune Regulator 1; ATPase; H+ Transporting; Lysosomal V0 Subunit, v-ATPase; vacuolar-ATPase, WT; wild-type.

Some components of the autophagic machinery are commonly mutated or downregulated in human cancers.^{1,2} Despite a huge amount of work, the roles of autophagy in cancer still remain controversial; it may act either as a tumor-suppressive or a tumor-promoting pathway. The current consensus is that the autophagic process initially acts to prevent tumor initiation. As a safeguard mechanism against cancer, it has been proposed that constitutive autophagy (*i.e.*, under physiological nutrient conditions) can dispose of old and damaged organelles, such as mitochondria, which would otherwise cause genotoxic stress resulting in DNA mutations. Autophagy may also promote cellular senescence in response to oncogenic signaling, thus inhibiting cellular transformation. Moreover, autophagy can prevent inflammation, a trigger of tumorigenesis.¹ Conversely, once the cancer is

established, autophagy is dramatically induced to meet the needs of cancer cells. As a tumor promoter, autophagy may sustain cell survival and tumor dormancy in response to hypoxia and nutrient limitation in the inner area of the tumor.¹ Later, autophagy enables cancer cells to survive anoikis during metastasis^{3,4} and to evade cell death during chemotherapy. As a result, modulation of autophagy in cancer therapy can be a “double-edged sword”, promoting or preventing the cytotoxic effect of anticancer drugs.⁵

Even though the tumor-suppression function of autophagy was first described in 2003,^{6,7} its precise role in tumorigenesis is not understood. Key observations of Eileen White *et al.* have described five years ago the role of autophagy in genomic stability,^{8,9} but the underlying mechanisms still remain unknown. This issue is critical given the

importance of genomic integrity in cell homeostasis, and the correlation between defects in genomic integrity with tumorigenesis.¹⁰ Foremost among the signaling players that influence genome stability is the small GTPase RHOA. Decades of studying small GTPases have led to the concept that RHOA must be tightly controlled by activating (a guanine nucleotide exchange factor, GEF) and inhibiting (a GTPase activating protein) factors. Of particular interest, recent accumulating evidence suggests that the levels of inactive RHOA are also controlled by proteasomal degradation,¹¹⁻¹⁶ but whether RHOA-GTP is similarly degraded remains, so far, elusive.

Instead of the proteasome, however, we recently demonstrated that active RHOA is constitutively maintained at low levels by autophagy.¹⁷ Indeed, through targeted manipulation of the autophagy pathway [such as *Atg5*, *Atg7*, *Sqstm1*, and *Tcirg1* (v-ATPase *a3*) knockdowns, gene deletion and use of chemical inhibitors], we establish that autophagy is the most important mechanism for restricted RHOA activation at the midbody during cytokinesis. Inhibition of autophagosome degradation (by the loss of the TCIRG1 subunit) allowed us to demonstrate the accumulation of RHOA-GTP within autolysosomes, close to the midbody of cells undergoing cytokinesis. At the molecular level, we identified SQSTM1 as the molecular adaptor that targets the active and ubiquitinated RHOA to autophagosomes. As a result, a failure in autophagy inhibition (irrespective of the studied defects: formation, sequestration, or degradation) deregulates all RHOA downstream responses, driving cytokinesis failure, and aneuploidy, one hallmark of aggressive cancer. Importantly, the control of RHOA by autophagy is remarkably specific as the closely related GTPase RAC as well as the upstream regulators required for proper activation of RHOA such as the kinesin KIF23/MKLP1, the RHOA GEF ECT2, and ARHGDI/RHOGDI are not affected.¹⁷

Considering the apparent connection between autophagy and RHOA, a key issue is how defects in autophagy might affect cell migration, another RHOA-controlled cell response relevant for cancer progression. Remarkably, the v-ATPase TCIRG1-dependent autophagy defect was characterized by an increase in cell size, a dramatic remodeling of the ACTIN cytoskeleton with the loss of stress fibers, and the formation of ACTIN-rich lamellipodia (**Fig. 1A**). Correlated with the mesenchymal spreading, another striking hallmark of *Tcirg1*-null cells was a

punctate staining of RHOA within autophagic vesicles, just under the lamella of crawling *Tcirg1*-null cells (**Fig. 1A, left panel**), one region where RHOA inactivation is essential in cell migration.^{18, 19} We thus followed the wild-type (WT) and *Tcirg1*-null cells by time-lapse microscopy and observed that the *Tcirg1*-null cells migrated seven times as fast as the WT cells (**Fig. 1B and 1C, Movie S1**). A role for autophagy in controlling the localization of RHOA-GTP was then demonstrated by the shRNA-mediated inhibition of autophagosome formation: expression of *ATG5* shRNA released active RHOA at the plasma membrane of *Tcirg1*-null cells, which allowed ACTIN polymerization into filaments, and impaired formation of cell protrusions (**Fig. 1D**).¹⁷ In light of these findings, we propose that autophagy might be absolutely necessary for maintaining the appropriate amount of RHOA at the lamellipodia to allow cell motility (**Fig. 2G**).

If our model were correct, one would expect that the inhibition of autophagy sequestration in autophagy-competent A549 tumor cells would be sufficient to impair cell motility (**Fig. 2**). We found that depletion of *ATG5* or *SQSTM1* (**Fig. S1A**) recapitulated the accumulation of RHOA at the cell surface (**Fig. 2B and 2C, left panels**), higher levels of downstream phosphorylation of myosin regulatory light chain (P-MLC, **Fig. S1B**), a denser ACTIN network (**Fig. 2B, 2C, and S1C**) and consistently suppressed motility (**Fig. 2E, 2F, S1D, Movies S2 to S6**), in comparison with control shRNA-transduced cells (**Fig. 2A and 2D**). As expected, the inhibition of autophagosome formation by *ATG7* depletion produced similar effects (**Fig. S1**). Reintroduction of *ATG5* or *SQSTM1* (rescue) back into these cells cancelled the stabilization of RHOA signaling as reflected by the loss of F-ACTIN, and the promotion of lamellipodia (**Fig. 2B and 2C**). In keeping with this scenario, inhibiting RHO kinase by Y27632 treatment promoted cell spreading, formation of broad lamellipodia, and cell migration of *ATG5*-depleted cells and *SQSTM1*-depleted cells, showing that RHOA overactivation was directly responsible for the phenotype (**Fig. 2D to F, Movies S3 to S6**). These data together provide support that SQSTM1-dependent autophagy is required for fine-tuning the RHOA pathway to ensure cell motility.

Recent compelling evidence suggests that autophagy negatively regulates several signaling pathways by degrading kinases,²⁰⁻²⁷ key downstream components^{28, 29} and transcription factors (**Fig 2H**).³⁰⁻³⁵ However, this often occurs under stressful

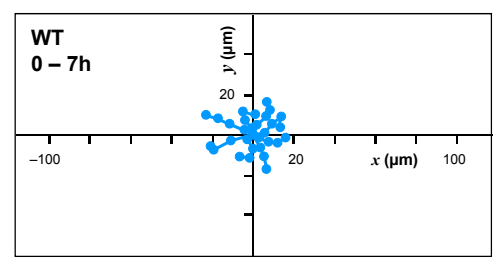
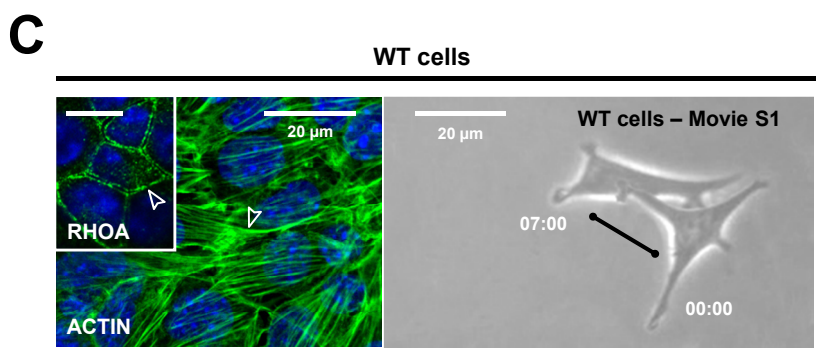
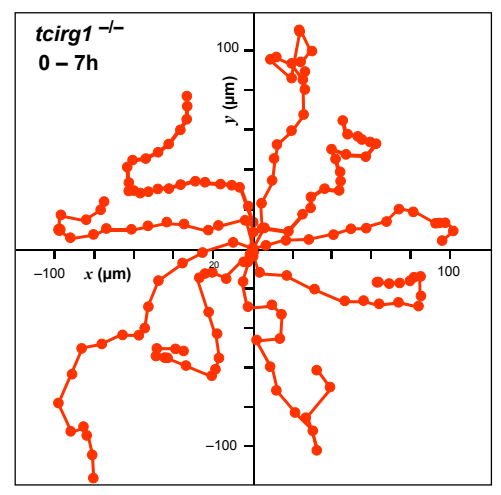
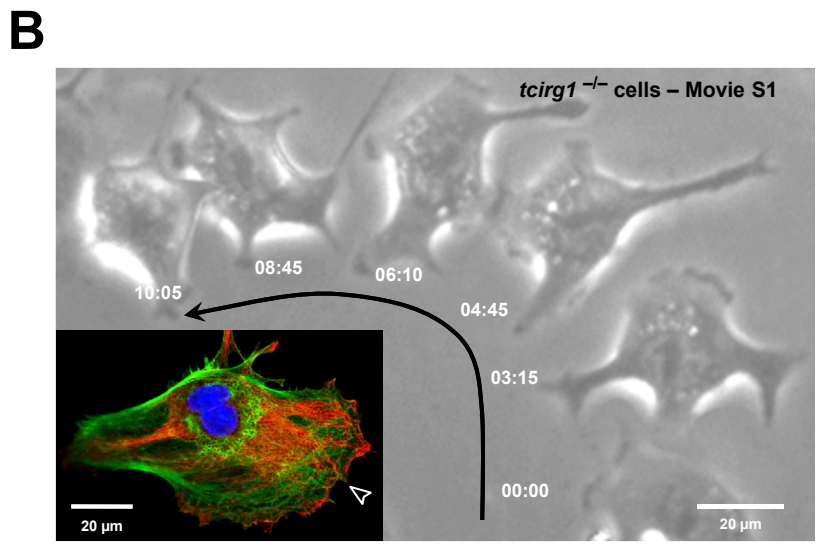
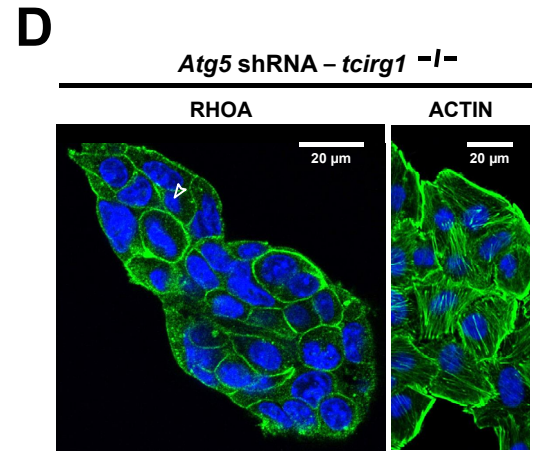
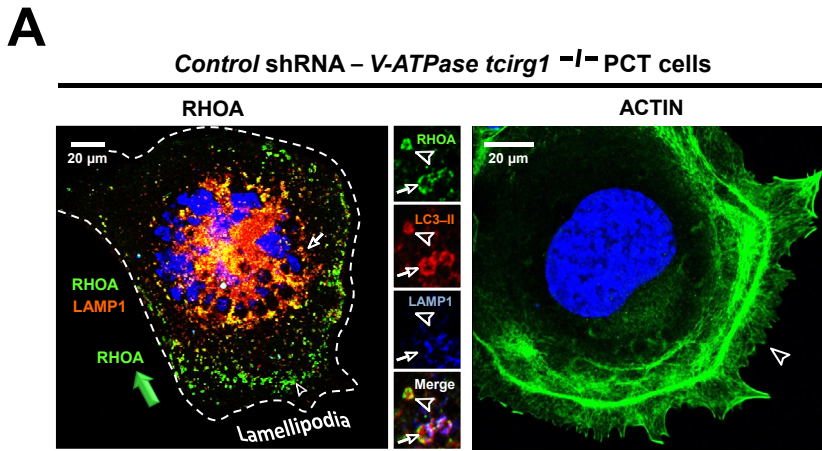


Figure 1 – Belaid *et al.* 2013

Figure 1. Cell motility is induced by v-ATPase *Tcirg1* loss. **(A)** Confocal images of v-ATPase *Tcirg1*-null cells showing colocalization of RHOA with autophagosomes (LC3-positive, arrowhead) and autolysosomes (LC3- and LAMP1-positive, arrows), close to highly dynamic lamellipodia (right). As a result of the apparent RHOA sequestration, *Tcirg1*-null cells lacked ACTIN stress fibers and developed aberrant lamellipodia (arrowhead, left). **(B)** Time-lapse video microscopy (right) and XY migration tracks (left) showing that the *Tcirg1*-null cells established short-lived cellular contacts, and migrated rapidly at $15.2 \pm 3.9 \mu\text{m/h}$ over long distances (still-images from **Movie S1**; intervals in h:min). Arrows indicate the direction of cell movement. Inset: representative ACTIN (green) and microtubule (red) staining showing that *Tcirg1*-null cells displayed a classical front-rear polarized morphology, with membrane protrusion at the leading edge (arrowhead). **(C)** Left, representative confocal images showing in WT cells the presence of RHOA at the plasma membrane (inset, arrowhead), and the formation of F-ACTIN (arrowhead). Time-lapse video microscopy (middle, images selected from **Movie S1**; intervals in h:min) and XY migration tracks (left, cell positions were recorded every 60 min for 7 h) showing that WT cells moved slowly at $2 \pm 1 \mu\text{m/h}$. **(D)** Inhibition of autophagosome formation by *Atg5* shRNA dramatically increases localization of active RHOA at the plasma membrane of *Tcirg1*-null cells, which restored a normal small morphology and the formation of actin fibers (arrowhead).

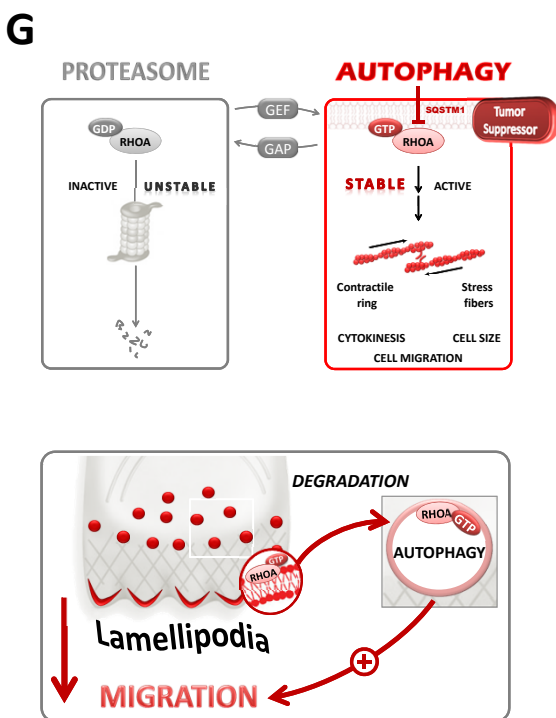
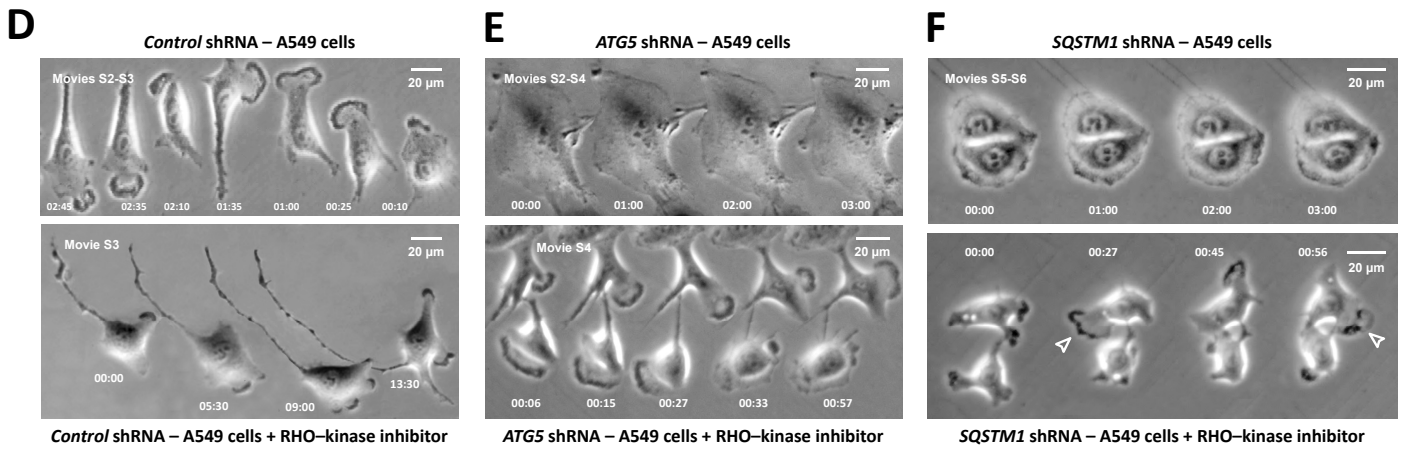
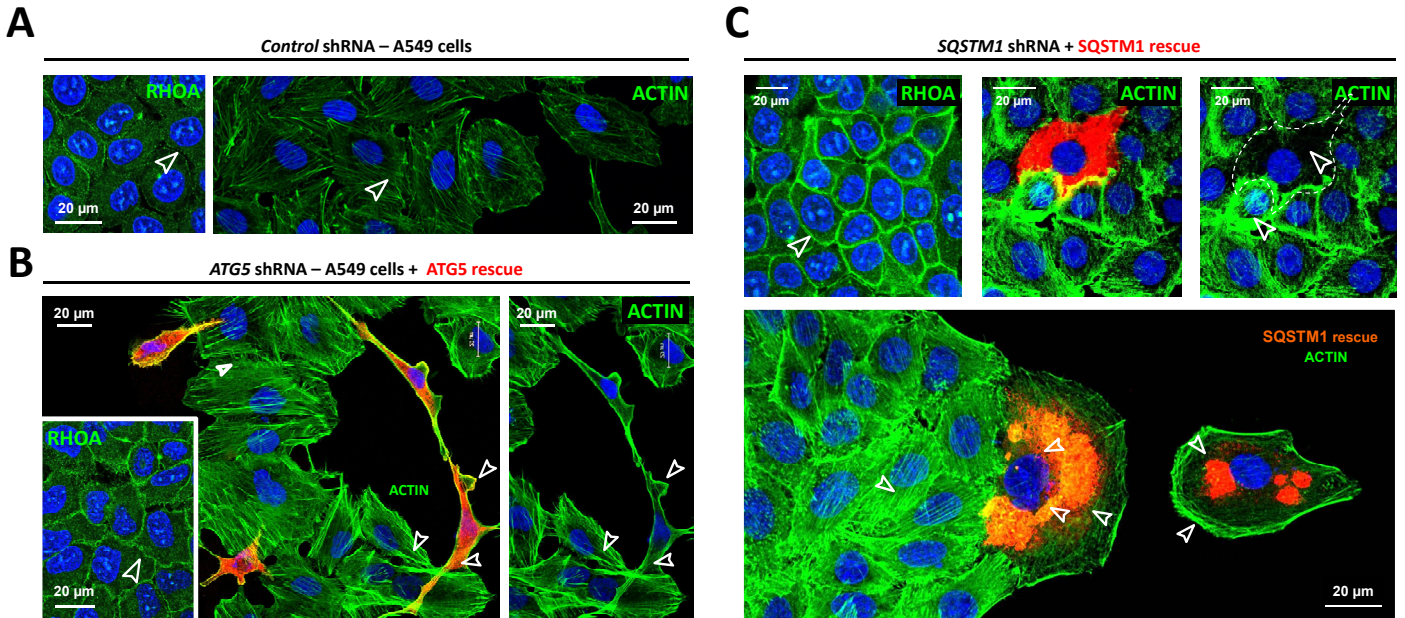
conditions such as nutrient starvation, extracellular matrix (ECM) detachment, HSP90 inhibition, proteasome inhibition, infections and treatment with chemotherapy drugs.^{20, 23-27, 29, 31-33, 35} Therefore, the ability of autophagy to degrade signaling proteins under basal growth conditions and thereby to ensure tumor-suppressive functions remains to be established.

Our data raise the importance of constitutive autophagy as a master regulator of RHOA-GTP. The regulation of RHOA is unique in that it involves GEFs, and GTPase activating proteins, along with the proteasome and autophagy (**Fig. 2G**). Depending on its activation state, we provide the first lines of evidence that RHOA uses distinct routes for degradation: while the proteasome degrades the cytosolic and inactive forms, the autophagy pathway specifically degrades the membrane-associated and active pool of RHOA.¹⁷ This is consistent with the recently reported degradation of two constitutively active RHO proteins, RHOH and RHOB, within lysosomes^{36, 37} and the redistribution of the active RHOA to undefined intracellular puncta during cell migration,¹⁹ or after activation with an autophagy inducer, lipopolysaccharide (LPS).³⁸ We therefore propose that basal autophagy acts as a tumor suppressor pathway that constitutively turns off RHOA activation (**Fig. 2G**). In this model, the remarkable dynamics of autophagy together with its integration of extracellular cues might dictate the time and place where a RHO GTPase is active, and able to interact with its downstream substrates. Accordingly, we reported the targeting of autolysosomes at the leading edge of migrating cells, the same subcellular and temporal localizations where RHOA should be inactivated.

So far, the emerging mechanisms by which autophagy limits cell signaling involve both ubiquitination and SQSTM1 (**Fig. 2H**).^{27-30, 32, 33, 35}

Importantly, upon inhibition of autophagy by chloroquine treatment, we identified that RHOA is ubiquitinated and recognized by the autophagy receptor SQSTM1.¹⁷ We therefore propose that RHOA, once activated undergoes ubiquitination, recruiting the scaffold protein SQSTM1 that bridges RHOA to the autophagosome marker LC3 for selective autophagic targeting. In line with this concept, two recent connections suggest the existence of feedback loops between RHOA and the autophagic pathway in which LC3 dampens RHOA activation by inactivating the RHO-GEF activity of AKAP13/AKAP-Lbc,^{39, 40} while active RHOA triggers the degradation of BECN1, a critical mediator of autophagy.⁴¹ Together, this sophisticated crosstalk between autophagy and RHOA might commit cells to irreversible cell cycle exit and directed migration.

Future work is required to understand how, mechanistically, a plasma membrane protein is targeted to autophagy degradation. There are a number of ways, non-mutually exclusive, in which plasma membrane proteins can be targeted for degradation; the most common of which involves endocytosis followed by lysosomal degradation. Remarkably, autophagy was recently involved in the degradation of two internalized plasma membrane proteins, GABRA/GABAA receptors and connexins.⁴²⁻⁴⁴ It is thus possible that active RHOA present at the plasma membrane are internalized into endosomes that fuse with autophagosomes. Another possibility is the recruitment of autophagy machinery (ATG5, LC3 and ATG7) to the RHOA-containing endosomes, leading to rapid trafficking and fusion with the lysosomes, as recently suggested.⁴⁵ At odds with endocytosis hypothesis, an intriguing finding of our study is the higher "retention" of RHOA at the plasma membrane of *ATG5*-depleted cells and *SQSTM1*-depleted cells (both in PCT cells and A549 cells), instead of an intracellular accumulation.



H

Pathways	Substrate	Nature of Substrates	Degradation stimulated by	Degraded by	Mediated by	Consequences	Ref
GTPase	RHOA	Active	constitutive		SQSTM1 Ub	↓ Cancer – Migration – Genomic stability	17
Tyrosine kinases	SRC	Active	cell detachment		CBL	↑ Cancer cell viability	24
	RET	(P)	cell detachment		not SQSTM1 not CBL	↑ Cancer cell viability	25
	KIT	Inactive & Active	Hsp90 inhibition		Coloc. SQSTM1	↓ Cancer – Chemotherapy	26
NFκB pathway	CHUK, IKKB, IKBK	Active	Hsp90 inhibition			↓ Cancer – Chemotherapy	20
	IKKB	Active	HTLV TAX oncoprotein		Ub		21
	IKKB	Active	TNF		KEAP1 Not Ub	↓ NFκB pathway	22
	IKBK	Active	Infection			Aggresome ↓ NFκB pathway	23
	BCL10		TCR activation		SQSTM1 Ub	↓ TCR signaling	28
	RELA/p65		Hepatoma CM		SQSTM1 Ub	↑ Aggresome	30
Onco proteins	PRAM1/PML-RARα	Active	all-trans retinoic acid		SQSTM1	↓ Cancer – Chemotherapy	32
Onco proteins	BCR-ABL	Active	Arsenic trioxide		SQSTM1	↓ Cancer – Chemotherapy	27
EMT regulators	SNAI1		Overexpression of DEDD		Coloc. SQSTM1	↓ Cancer – EMT	34
	TWIST		Overexpression of DEDD		Coloc. SQSTM1	↓ Cancer – EMT	34

(P) : Phosphorylated Coloc. : Colocalisation : Autophagy : Proteasome : Ubiquitinated

Figure 2 – Belaid *et al.* 2013

In accordance, there is already evidence that the blockage of autophagy induces accumulation of GJA1 (connexin 43) at the plasma membrane by preventing its internalization (3-methyladenine, *Atg7*- and *Atg5*-null cells).⁴⁴ Similarly to RHOA, ubiquitination and SQSTM1 are also the signal that target connexins for selective autophagy.^{43, 44} Other lines of evidence are the observations that autophagy stimuli increase endocytosis, that plasma membrane participates in the formation of phagophores and that some components of the autophagy machinery (at least ATG16L1) associate with the plasma membrane.⁴⁶ Altogether this might suggest that SQSTM1-dependent autophagy orchestrates endocytosis and degradation of signaling proteins. Understanding how autophagy and endocytosis are coordinated to allow timely degradation of signaling proteins will be our next challenge. In conclusion, this unexpected link between RHOA and autophagy helps us to revisit under a new light the temporal and spatial control of RHOA,^{18, 19, 47} the signaling and tumorigenic roles of

SQSTM1,⁴⁸⁻⁵⁰ and the tumor-suppressive function of autophagy. Our findings also raise the possibility that inappropriate activation of autophagy in cancer cells can contribute to their rapid migration, by enhancing the degradation of RHOA. Of particular interest, when silencing autophagy, the A549 tumor cells failed to migrate, an observation that suggests important therapeutic implications. Metastasis is responsible for more than 90% of cancer deaths; interestingly, all cancers (melanoma, lung, pancreatic and colorectal cancers) prone to metastasize are characterized by an “enhanced” autophagy, *i.e.* overexpression of SQSTM1 and punctate staining of LC3, in agreement with our study.⁵¹⁻⁵⁷ Based on our result, we propose that inhibiting autophagy initiation might be useful for treatment of metastatic cancer. Given that inhibition of autolysosomal acidification/degradation might enhance cell migration (our study and refs. [58-60](#)), the therapeutic benefit of drugs such as chloroquine warrants careful investigation..

Acknowledgments

We thank Nathalie Rochet, Nathalie Singer, Etienne Boulter, and Jean Albrengues for helpful discussions. Grant support: “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale”, “Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie” (A B and A C: convention ADEME n° 08 62 C 0044), Agence régionale santé Provence Alpes Côte d'Azur and Direction régionale de l'Environnement, de l'aménagement et du logement Provence Alpes Côte d'Azur (A B: plan régional santé environnement PRSE PACA n°6.3.3.3 and 6.3.3.4), “Association pour la Recherche contre le Cancer” (ARC Grants n° SL220110603478), French national research agency (“Investments for the Future” LABEX SIGNALIFE # ANR-11-LABX-0028-01, and “STEATOX” # ANR-13-CESA-0009-01) and NIH (DJK: GM053396). The authors declare no conflicting financial interests.

Figure 2. Autophagy is required for tumor A549 cell migration through the degradation of RHOA. (A–F) Consequences of autophagy defects on the RHOA pathway in tumor A549 cells. Depletion of *ATG5* (B, E) and *SQSTM1* (C, F) in A549 cells led to increased RHOA levels at the plasma membrane (A, B, C; left), a denser F-ACTIN reticulation (A, B, C; right) and a strong suppression of tumor cell migration [examined by time-lapse video microscopy (D, E, F) and wound closure assay (see also Fig. S1)]. Shown are confocal images of A549 cells cotransfected with human shRNA and expressing proteins encoded by shRNA-resistant murine autophagy genes (red). (E, F) The migratory defects of *ATG5*-depleted A549 cells (middle) and *SQSTM1*-depleted A549 cells (right) were rescued upon RHO kinase inhibition with a low concentration of Y27632 (2.5 μM) that did not impede A549 tumor cell migration and only compromised rear retraction (D, lower panel). (See also Movies S2–S6). (G) Proposed model by which autophagy is essential for the control of the RHOA pathway and the subsequent cell migration; once activated, the sequestration of the active RHOA within autophagic vesicles and the following degradation would limit the level of active RHOA present at the plasma membrane, thereby relieving inhibitory RHOA signaling. As a result, alterations in the autophagy pathway can have a profound impact upon cell motility: inhibition of autophagy degradation would promote rapid cell migration through the increased RHOA sequestration (*TCIRG1* loss), whereas blocking autophagosome formation or sequestration would have the opposite effects (*ATG5*, *ATG7*, *SQSTM1* shRNA). (H) Growing list of signaling proteins degraded by autophagy.

Materials and Methods

Cell culture and treatments. To inhibit the maturation of autophagosomes into degradative autolysosomes, renal cells derived from proximal convoluted tubules (PCT) of wild-type (WT, *Tcirg1*^{+/+}) or *tcirg1*^{-/-} (lysosomal v-ATPase $\alpha 3$ -deficient, Jackson Laboratory) mice were isolated and immortalized with the pSV3 neo vector, as described previously.¹ PCT cells were chosen, as they express the highest level of v-ATPase,² the $\alpha 3$ subunit is localized in the lysosomal limiting membrane.³ In agreement with the other reported defect of v-ATPase [mutations in PS1],⁴ V-ATPase *Tcirg1* depletion raises the lysosomal pH and thereby blocks autolysosomal degradation downstream of fusion, as reflected by the accumulation of the autolysosomes and/or autophagy substrates LC3-II, SQSTM1 and RHOA-GTP,¹ accordingly to.⁵ Likewise, we have checked that *Tcirg1* depletion does not affect the activity of proteasomes, which degrade several Rho GTPases, their upstream regulators and downstream targets.¹ Alternatively, we prevented autophagosome formation in the human lung cancer A549 cell line by *ATG5* shRNA (Sigma, SHCLNV-NM_004849) or *ATG7* shRNA (Sigma, SHCLNV-NM_NM_006395) transduction, and the recruitment of autophagy substrates within the autophagic vesicles by *SQSTM1*, through shRNA treatment (Sigma, SHCLNV-NM_NM_003900).¹ ShRNA-mediated protein downregulation and autophagy impairment were monitored by immunoblotting (*ATG5*, clone 7C6, Nanotools; *ATG7*, clone D12B11, Cell Signaling Technology Inc.; LC3-II, Nanotools clone 5F10 and *SQSTM1*, BD Transduction Laboratories™ #610833).

Analysis of the RHOA pathway. The activity of the RHOA pathway was monitored by *i*) the recruitment of RHOA to membranes; *ii*) the downstream Ser19-phosphorylation of myosin regulatory light chain (P-MLC, Cell Signaling Technology, western blotting; #3671) *iii*) the reticulation of ACTIN cytoskeleton, and *iv*) cell migration. Where indicated, a low dose of the selective RHO Kinase inhibitor Y27632 (2.5 μ M; Calbiochem, #688002) was added.

Immunofluorescence staining. To determine whether RHOA is membrane-associated and thus activated, cells seeded on glass coverslips were fixed

with ice-cold 10% TCA for 15 min, a method that preserves membrane-associated, but not cytoplasmic, RHOA.⁶ The cells were then washed in PBS, and permeabilized in 0.3% Triton X-100 in PBS for 5 min. To detect the translocation of RHOA to autolysosomes (LC3⁺ and LAMP1⁺), cells were then incubated with anti-RHOA (clone 26C4; 1:100; Santa Cruz Biotechnology), anti-LC3 (1:500, clone 5F10, Nanotools) and anti-LAMP1 (1:500, BD Pharmingen, #553792) antibody labeling. Alternatively, cells were fixed in PBS with 3.7% paraformaldehyde for 15 min at room temperature before staining of the ACTIN cytoskeleton with TRITC-phalloidin (1 h; room temperature; 1:1,000; Sigma, P1951). Slides were mounted with Pro Long Gold antifade reagent (Molecular Probes, P36931) with DAPI after three washes with PBS, and examined using a confocal microscope (Zeiss LSM5; Carl Zeiss, Marly Le Roi, France).

Time-lapse video microscopy. For monitoring single-cell migration, exponentially growing cells cultured in complete growth medium were imaged on an inverted microscope (Axio Observer.Z1; Carl Zeiss, Marly Le Roi, France) equipped with a CO₂-equilibrated chamber (37 °C and 5% CO₂) and a motorized X-Y stage. Three different fields per condition were photographed and a total of 18 fields were followed in three independent experiments. Images were captured every 5 min with a $\times 20$ ph2 (*Tcirg1*-null) and $\times 32$ ph1 (WT) phase-contrast objective during 18 h using MetaMorph 2.0 software (Molecular Devices). Videos were generated from the acquired images with ImageJ.

Scratch wound assay. Confluent cell monolayers were scratched with a pipet tip to create a uniform wound area. Cells were washed to remove debris, and fresh complete medium was then applied. 3 random images of wounds were captured immediately after wounding and 48 h later, migration was quantified as the percentage of the wound area that was closed using Visilog 5.3 software®. The values are means of three scratches from two independent clones ($n = 6$) \pm s.d.

References

- Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:961-7.
- Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 132:27-42.
- Lock R, Debnath J. Extracellular matrix regulation of autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20:583-8.
- Fung C, Lock R, Gao S, Salas E, Debnath J. Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Mol Biol Cell* 2008; 19:797-806.
- Livesey KM, Tang D, Zeh HJ, Lotze MT. Autophagy inhibition in combination cancer treatment. *Curr Opin Investig Drugs* 2009; 10:1269-79.
- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 2003; 112:1809-20.
- Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:15077-82.
- Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S, et al. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev* 2007; 21:1621-35.
- Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K, et al. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev* 2007; 21:1367-81.
- Fujiwara T, Bandi M, Nitta M, Ivanova EV, Bronson RT, Pellman D. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* 2005; 437:1043-7.
- Doye A, Mettouchi A, Bossis G, Clément R, Buisson-Touati C, Flatau G, et al. CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion. *Cell* 2002; 111:553-64.
- Wang HR, Zhang Y, Ozdamar B, Ogunjimi AA, Alexandrova E, Thomsen GH, et al. Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science* 2003; 302:1775-9.
- Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang HR, Zhang Y, Wrana JL. Regulation of the polarity protein Par6 by TGF β receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* 2005; 307:1603-9.
- Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Faul C, Tomino Y, Kim K, Mundel P. Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling. *Nat Cell Biol* 2006; 8:485-91.
- Chen Y, Yang Z, Meng M, Zhao Y, Dong N, Yan H, et al. Cullin mediates degradation of RhoA through evolutionarily conserved BTB adaptors to control actin cytoskeleton structure and cell movement. *Mol Cell* 2009; 35:841-55.
- Boulter E, Garcia-Mata R, Guilluy C, Dubash A, Rossi G, Brennwald PJ, et al. Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1. *Nat Cell Biol* 2010; 12:477-83.
- Belaid A, Cerezo M, Chargui A, Corcelle-Termeau E, Pedeutour F, Giuliano S, et al. Autophagy controls cell cytokinesis and genomic stability via the degradation of active RhoA. *Cancer Res* 2013; [Epub ahead of print].
- Machacek M, Hodgson L, Welch C, Elliott H, Pertz O, Nalbant P, et al. Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* 2009; 461:99-103.
- Heasman SJ, Carlin LM, Cox S, Ng T, Ridley AJ. Coordinated RhoA signaling at the leading edge and uropod is required for T cell transendothelial migration. *J Cell Biol* 2010; 190:553-63.
- Qing G, Yan P, Xiao G. Hsp90 inhibition results in autophagy-mediated proteasome-independent degradation of I κ B kinase (IKK). *Cell Res* 2006; 16:895-901.
- Niida M, Tanaka M, Kamitani T. Downregulation of active IKK beta by Ro52-mediated autophagy. *Mol Immunol* 2010; 47:2378-87.
- Kim JE, You DJ, Lee C, Ahn C, Seong JY, Hwang JI. Suppression of NF- κ B signaling by KEAP1 regulation of IKKbeta activity through autophagic degradation and inhibition of phosphorylation. *Cell Signal* 2010; 22:1645-54.
- Fliiss PM, Jowers TP, Brinkmann MM, Holstermann B, Mack C, Dickinson P, et al. Viral mediated redirection of NEMO/IKKgamma to autophagosomes curtails the inflammatory cascade. *PLoS Pathog* 2012; 8:e1002517.
- Sandilands E, Serrels B, McEwan DG, Morton JP, Macagno JP, McLeod K, et al. Autophagic targeting of Src promotes cancer cell survival following reduced FAK signalling. *Nat Cell Biol* 2012; 14:51-60.
- Sandilands E, Serrels B, Wilkinson S, Frame MC. Src-dependent autophagic degradation of Ret in FAK-signalling-defective cancer cells. *EMBO Rep* 2012; 13:733-40.
- Hsueh YS, Yen CC, Shih NY, Chiang NJ, Li CF, Chen LT. Autophagy is involved in endogenous and NVP-AUY922-induced KIT degradation in gastrointestinal stromal tumors. *Autophagy* 2012; 9.
- Goussetis DJ, Gounaris E, Wu EJ, Vakana E, Sharma B, Bogoy M, et al. Autophagic degradation of the BCR-ABL oncoprotein and generation of antileukemic responses by arsenic trioxide. *Blood* 2012; 120:3555-62.
- Paul S, Kashyap AK, Jia W, He YW, Schaefer BC. Selective autophagy of the adaptor protein Bcl10 modulates T cell receptor activation of NF- κ B. *Immunity* 2012; 36:947-58.
- Gao C, Cao W, Bao L, Zuo W, Xie G, Cai T, et al. Autophagy negatively regulates Wnt signalling by promoting Dishevelled degradation. *Nat Cell Biol* 2010; 12:781-90.
- Chang CP, Su YC, Hu CW, Lei HY. TLR2-dependent selective autophagy regulates NF- κ B lysosomal degradation in hepatoma-derived M2 macrophage differentiation. *Cell Death Differ* 2012; [Epub ahead of print].
- Sukhdeo K, Mani M, Hideshima T, Takada K, Pena-Cruz V, Mendez G, et al. beta-catenin is dynamically stored and cleared in multiple myeloma by the proteasome-aggresome-autophagosome-lysosome pathway. *Leukemia* 2012; 26:1116-9.
- Isakson P, Bjoras M, Boe SO, Simonsen A. Autophagy contributes to therapy-induced degradation of the PML/RARA oncoprotein. *Blood* 2010; 116:2324-31.
- Wang Z, Cao L, Kang R, Yang M, Liu L, Zhao Y, et al. Autophagy regulates myeloid cell differentiation by p62/SQSTM1-mediated degradation of PML-RARalpha oncoprotein. *Autophagy* 2011; 7:401-11.
- Lv Q, Wang W, Xue J, Hua F, Mu R, Lin H, et al. DEDD interacts with PI3K3 to activate autophagy and attenuate epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer. *Cancer Res* 2012; 72:3238-50.
- Jia L, Gopinathan G, Sukumar JT, Gribben JG. Blocking autophagy prevents bortezomib-induced NF- κ B activation by reducing I- κ Balpha degradation in lymphoma cells. *PLoS One* 2012; 7:e32584.
- Perez-Sala D, Boya P, Ramos I, Herrera M, Stamatakis K. The C-terminal sequence of RhoB directs protein degradation through an endo-lysosomal pathway. *PLoS ONE* 2009; 4:e8117.
- Schmidt-Mende J, Geering B, Yousefi S, Simon HU. Lysosomal degradation of RhoH protein upon antigen receptor activation in T but not B cells. *Eur J Immunol* 2009; 40:525-9.
- Cetin S, Ford HR, Sysko LR, Agarwal C, Wang J, Neal MD, et al. Endotoxin inhibits intestinal epithelial restitution through activation of Rho-GTPase and increased focal adhesions. *J Biol Chem* 2004; 279:24592-600.

39. Baisamy L, Cavin S, Jurisch N, Diviani D. The ubiquitin-like protein LC3 regulates the Rho-GEF activity of AKAP-Lbc. *J Biol Chem* 2009; 284:28232-42.
40. Bauer PO, Wong HK, Oyama F, Goswami A, Okuno M, Kino Y, et al. Inhibition of Rho kinases enhances the degradation of mutant huntingtin. *J Biol Chem* 2009; 284:13153-64.
41. Yoo BH, Wu X, Li Y, Haniff M, Sasazuki T, Shirasawa S, et al. Oncogenic ras-induced down-regulation of autophagy mediator Beclin-1 is required for malignant transformation of intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2010; 285:5438-49.
42. Rowland AM, Richmond JE, Olsen JG, Hall DH, Bamber BA. Presynaptic terminals independently regulate synaptic clustering and autophagy of GABAA receptors in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 2006; 26:1711-20.
43. Fong JT, Kells RM, Gumpert AM, Marzillier JY, Davidson MW, Falk MM. Internalized gap junctions are degraded by autophagy. *Autophagy* 2012; 8:794-811.
44. Bejarano E, Girao H, Yuste A, Patel B, Marques C, Spray DC, et al. Autophagy modulates dynamics of connexins at the plasma membrane in a ubiquitin-dependent manner. *Mol Biol Cell* 2012; 23:2156-69.
45. Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SW, Moshiah S, Dorsey F, Connell S, et al. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* 2007; 450:1253-7.
46. Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, Rubinsztein DC. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol* 2010; 12:747-57.
47. Miller AL, Bement WM. Regulation of cytokinesis by Rho GTPase flux. *Nat Cell Biol* 2009; 11:71-7.
48. Duran A, Linares JF, Galvez AS, Wikenheiser K, Flores JM, Diaz-Meco MT, et al. The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell* 2008; 13:343-54.
49. Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 2009; 137:1062-75.
50. Kadandale P, Stender JD, Glass CK, Kiger AA. Conserved role for autophagy in Rho1-mediated cortical remodeling and blood cell recruitment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:10502-7.
51. Lazova R, Camp RL, Klump V, Siddiqui SF, Amaravadi RK, Pawelek JM. Punctate LC3B expression is a common feature of solid tumors and associated with proliferation, metastasis, and poor outcome. *Clin Cancer Res* 2012; 18:370-9.
52. Han C, Sun B, Wang W, Cai W, Lou D, Sun Y, et al. Overexpression of microtubule-associated protein-1 light chain 3 is associated with melanoma metastasis and vasculogenic mimicry. *Tohoku J Exp Med* 2011; 223:243-51.
53. Sato K, Tsuchihara K, Fujii S, Sugiyama M, Goya T, Atomi Y, et al. Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation. *Cancer Res* 2007; 67:9677-84.
54. Yoshioka A, Miyata H, Doki Y, Yamasaki M, Sohma I, Gotoh K, et al. LC3, an autophagosome marker, is highly expressed in gastrointestinal cancers. *Int J Oncol* 2008; 33:461-8.
55. Fujii S, Mitsunaga S, Yamazaki M, Hasebe T, Ishii G, Kojima M, et al. Autophagy is activated in pancreatic cancer cells and correlates with poor patient outcome. *Cancer Sci* 2008; 99:1813-9.
56. Rolland P, Madjd Z, Durrant L, Ellis IO, Layfield R, Spendlove I. The ubiquitin-binding protein p62 is expressed in breast cancers showing features of aggressive disease. *Endocr Relat Cancer* 2007; 14:73-80.
57. Jo YK, Kim SC, Park IJ, Park SJ, Jin DH, Hong SW, et al. Increased Expression of ATG10 in Colorectal Cancer Is Associated with Lymphovascular Invasion and Lymph Node Metastasis. *PLoS One* 2012; 7:e52705.
58. Chi C, Zhu H, Han M, Zhuang Y, Wu X, Xu T. Disruption of lysosome function promotes tumor growth and metastasis in *Drosophila*. *J Biol Chem* 2010; 285:21817-23.
59. Tu C, Ortega-Cava CF, Chen G, Fernandes ND, Cavallo-Medved D, Sloane BF, et al. Lysosomal cathepsin B participates in the podosome-mediated extracellular matrix degradation and invasion via secreted lysosomes in v-Src fibroblasts. *Cancer Res* 2008; 68:9147-56.
60. Taddei TH, Kacena KA, Yang M, Yang R, Malhotra A, Boxer M, et al. The underrecognized progressive nature of N370S Gaucher disease and assessment of cancer risk in 403 patients. *Am J Hematol* 2009; 84:208-14.

Autophagy and SQSTM1 on the RHOA(d) again

Emerging roles of autophagy in the degradation of signaling proteins

Supplemental Information

Supplemental movies

All movies are time-lapse videos captured by phase contrast. Pictures were captured at 5-min intervals at 37 °C in growth medium and converted to a movie. All videos have clocks embedded (h:min) to follow the time frame of imaging.

Movie S1 is a time-lapse recording of a WT cell that rotated mainly on its own axis, and moved a small distance (inset), in contrast to the rapid migration of a *Tcirg1*-null cell (related to **Fig. 1B-1C**).

Movie S2 illustrates the rapid migration of an A549 tumor cell (control shRNA, related to **Fig. 2D**, upper) that was impaired upon *ATG5* depletion (related to **Fig. 2E**, lower).

Movie S3 depicts that the inhibition of RHO kinase by a low concentration of Y27632 (2.5 μM, right) did not inhibit migration of A549 tumor cells but only compromised rear retraction (related to **Fig. 2D**).

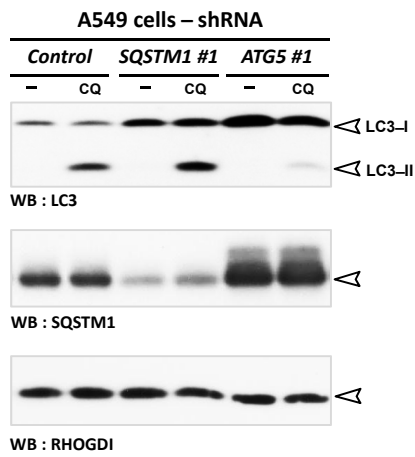
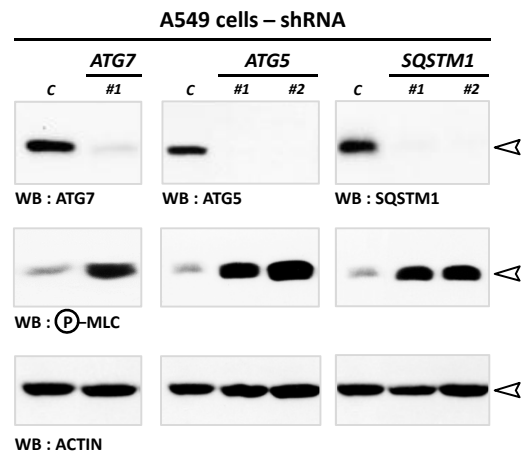
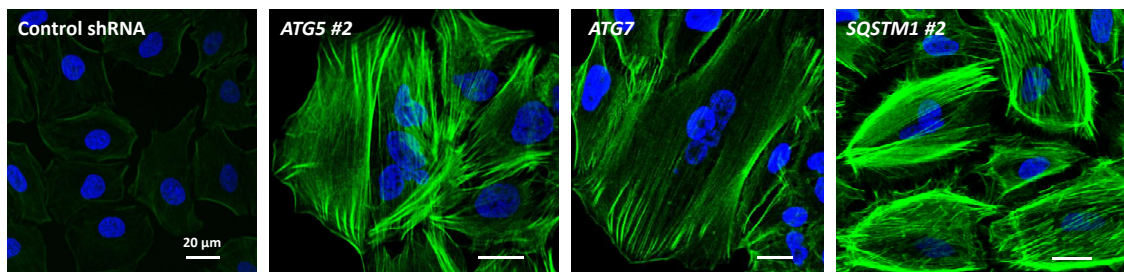
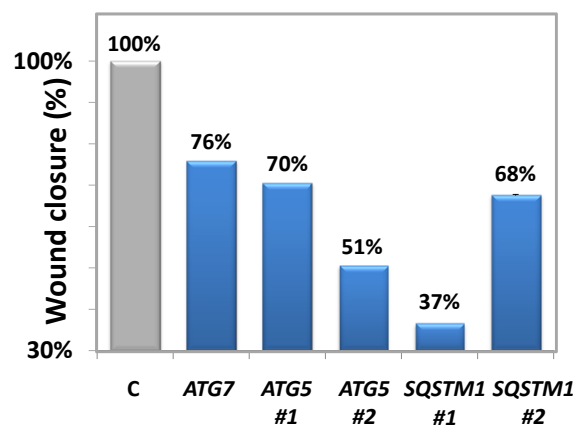
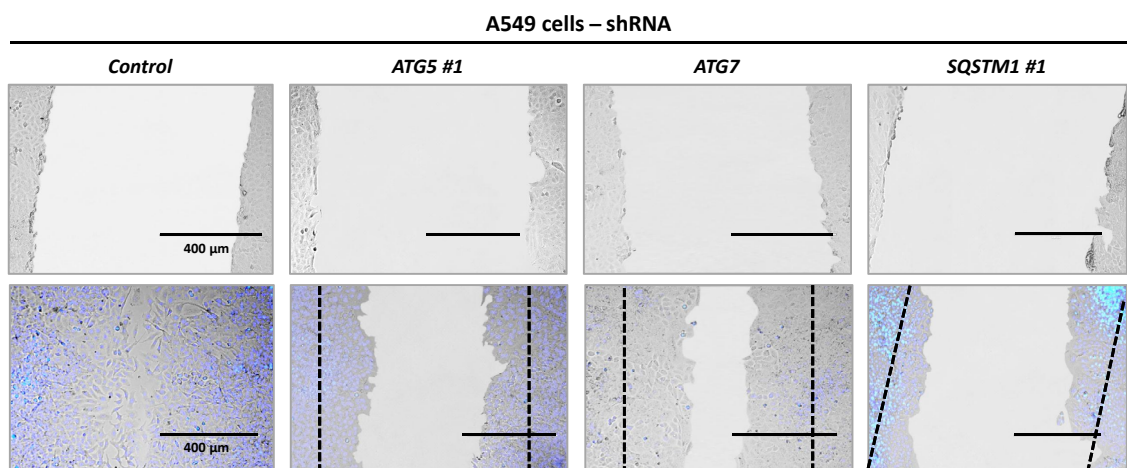
Movie S4 shows the migratory defect in *ATG5*-depleted A549 cells (untreated cells, left) that was rescued upon RHO kinase inhibition (Y27632-treated cells, 2.5 μM, right) (related to **Fig. 2E**).

Movie S5 depicts the stationary behavior of *SQSTM1*-depleted A549 cells that became motile upon RHO kinase inhibition (Y27632-treated cells, 2.5 μM, right) (related to **Fig. 2F**).

Movie S6 illustrates cell spreading of *SQSTM1*-depleted cells upon Y27632 treatment (2.5 μM, lower). Note the stationary behaviour of a single *SQSTM1*-depleted cell (arrowhead) (upper, related to **Fig. 2F**). Cell outlines were traced in white at the first and last frames of the movie.

Supplemental figure

Figure S1. (Related to Fig. 2) Inhibition of autophagosome formation or sequestration impairs tumor cell migration. Autophagy-competent A549 tumor cells were transduced with lentiviruses expressing the control, *ATG5* (*ATG5* #1, and #2); *ATG7* and *SQSTM1* (*SQSTM1* #1, and #2) shRNA. Western blot analyses demonstrate autophagy inhibition (**A**) and efficient decrease in protein levels of *ATG5*, *ATG7* and *SQSTM1* after shRNA knockdown (**B**). Tumor cell responses to defects in autophagosome formation (*ATG5* or *ATG7* shRNA) or sequestration (*SQSTM1* shRNA) were then examined with regard to RHOA activation (**B**, higher levels of P-MLC); F-ACTIN polymerization (**C**, phalloidin; green); nuclei and cell enlargement (**C**), and cellular motility (**D**, wound healing assays at 0 and 48 h after scratching, upper and lower panels respectively).

A**B****C****D**

Signalphagy

Scheduled signal termination by macroautophagy

Amine Belaid,^{1,2,3,4} Papa Diogop Ndiaye,^{1,2,3,4} Daniel J Klionsky,⁵ Paul Hofman,^{1,2,3,4,6} Baharia Mograbi^{1,2,3,4,*}

¹Institute of Research on Cancer and Ageing of Nice (IRCAN); INSERM U1081; CNRS UMR7284; Nice, France; ²Université de Nice-Sophia Antipolis; Faculté de Médecine; Nice, France; ³Equipe Labellisée par l'ARC; Villejuif, France; ⁴Centre Antoine Lacassagne; Nice, France; ⁵Life Sciences Institute; University of Michigan; Ann Arbor, MI USA; ⁶Centre Hospitalier Universitaire de Nice; Pasteur Hospital; Laboratory of Clinical and Experimental Pathology; Nice, France

Keywords: autophagy, tumor suppression, signaling, active RHOA, cytokinesis, migration

Submitted: 07/04/13

Revised: 07/18/13

Accepted: 07/24/13

<http://dx.doi.org/10.4161/auto.25880>

*Correspondence to: Baharia Mograbi;
Email: mograbi@unice.fr

Punctum to: Belaid A, Cerezo M, Chargui A, Corcelle-Terméau E, Pedetour F, Giuliano S, Ilie M, Rubera I, Tauc M, Barale S, et al. Autophagy plays a critical role in the degradation of active RHOA, the control of cell cytokinesis and genomic stability. *Cancer Res* 2013; 73:4311–22; PMID:23704209; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4142> and

Belaid A, Ndiaye PD, Cerezo M, Cailleteau L, Brest P, Klionsky DJ, Carle GF, Hofman P, Mograbi B. Autophagy and SQSTM1 on the RHOA(d) again: emerging roles of autophagy in the degradation of signaling proteins. *Autophagy* 2013; In press

A fundamental issue in cell biology is how the activation of a signaling pathway should lead to the appropriate cell response. Because of their oncogenic potential, the abundance, the duration and the localization of key signaling proteins must be carefully controlled. Negative feedback loops that combine transcription and protein-protein interactions are among the strategies by which a cell can turn off signaling. Our recent studies in *Cancer Research* and *Autophagy* show that degradation of key active proteins such as RHOA-GTP by constitutive autophagy represents one safeguard mechanism that limits signaling in a spatially and temporally restricted manner for faithful cytokinesis and directed migration. As a result, all autophagy compromises drive cytokinesis failure, aneuploidy, and motility—three processes that directly have an impact upon cancer progression. We therefore propose the term “signalphagy” to indicate a dedicated type of macroautophagy that degrades and thereby maintains the appropriate level of active signaling proteins to achieve tumor suppression.

Since its discovery in the 1950s, macroautophagy was first thought to be a bulk, nonselective “self-eating” process to cope with starvation and other environmental challenges. In response to these emergency states, macroautophagy is dramatically upregulated to provide the supply of energy needed for cell survival. As a

result, yeast and mice deficient for autophagosome formation rapidly die under nutrient poor conditions. This has led to the notion that the primary function of autophagy is adaptation to starvation. In contrast, constitutive autophagy was less studied until its defects were recently shown to be involved in a growing list of common devastating human diseases including neurodegeneration, myopathies and cancers. Emerging evidence suggests now that autophagy occurs continuously at basal levels in rich conditions and degrades selectively damaged and unneeded proteins/organelles that would otherwise accumulate during a cell's life.

The Pandora's box of constitutive autophagy is open: the substrates that are selectively degraded by autophagy include, as expected, organelles such as mitochondria (mitophagy), peroxisomes (pexophagy), large protein aggregates (aggrephagy), invading bacteria (xenophagy) and even portions of the nucleus and micronuclei (nucleophagy). Far from being simply a housecleaner, a pioneering study by Gao et al. provides the evidence that autophagy also negatively regulates WNT (wingless-type MMTV integration site family) signaling by degrading DVL (disheveled segment polarity protein); however, this occurs under nutrient starvation. Other fascinating observations report signaling molecules, kinases, cell-cycle regulators, and transcription factors among the autophagy substrates. However, similarly to DVL, this occurs under stressful conditions such as extracellular matrix

detachment, infections and treatment with chemotherapy drugs.

One key step in understanding the tumor suppressive function of autophagy will be to better characterize its substrates. We assume that constitutive autophagy keeps in check cell growth by degrading a signaling protein. To identify such a signaling protein, a feature of our strategy was to block the autophagy pathway, at the degradation step, within the autolysosome. For this purpose, we made a targeted disruption of the *TCIRG1/A3* subunit of the *v*-ATPase proton pump in order to raise the pH and thereby completely block the acidic proteases and autophagic degradation, leading to the accumulation of the substrates within the autolysosomes.

By analyzing the phenotype of the *Tcirg1*-null cells we made the surprising demonstration that autophagy controls the RHOA pathway, a pathway critical for cancer progression. As with other autophagic substrates, the active form of RHOA is a long-lived protein, whereas the inactive form has a substantially shorter half-life. Strikingly, the difference in stability stems from the fact that the inactive form of RHOA is degraded by the proteasome, whereas the active form is degraded by autophagy. By contrast to starvation-induced macroautophagy, the degradation of RHOA is a highly selective process that occurs under basal conditions and involves ubiquitination. Mechanistically, a new paradigm is emerging: we propose that there are two types of autophagy, that is, constitutive and starvation-induced autophagy, which do not fulfil the same function and target the same type of cargo for degradation. The substrates that are

selectively degraded by autophagy, irrespective of their nature—aggregates, organelles and signaling proteins—are all ubiquitinated. Ubiquitination helps recruit the autophagy adaptor SQSTM1/p62 that binds simultaneously to LC3/GABARAP on the nascent autophagosome, thereby ensuring the selective sequestration and degradation of the targeted substrates.

Perspectives, Promises, and Challenges

We are rapidly gaining insight into how autophagy is regulated by signaling pathways, and how autophagy in turn controls signaling. Such intricate interplay between autophagy and signaling allows a cell to respond appropriately to its environment. Yet, many questions remain: for instance to date, there are over 70 RHO guanine nucleotide exchange factors (RHO-GEFs) that activate RHOA, 60 RHO GTPase-activating proteins (RHO-GAPs) that inactivate it, 3 GDIs that sequester RHOA in concert with several kinases that phosphorylate it. Therefore, what are the reasons for using selective autophagy instead of transcription, or reversible GEF, GAP and phosphorylation events to modulate RHOA activity? We should keep in mind that upon activation, not all the RHOA molecules are turned on simultaneously. Instead, only a small fraction of RHOA is activated in highly dynamic zones: the midbody during cytokinesis, and the lamella during migration. In both cases, RHOA appears to be degraded by autophagy to ensure signaling efficiency—that is, restricted activation of RHOA allowing irreversible

exit of mitosis and directed migration. Undoubtedly, this timely and irreversible degradation by autophagy contrasts with gradual and reversible enzymatic events (such as phosphorylation, the action of GEFs, GAPs, etc.). We therefore postulate that signal termination by autophagy, which we call “signalphagy”, achieves signaling specificity; compartmentalization and dynamic modulation. We guess that the next years are going to be as exciting as the previous with regard to our gaining further insight into the role of autophagy in regulating cellular physiology.

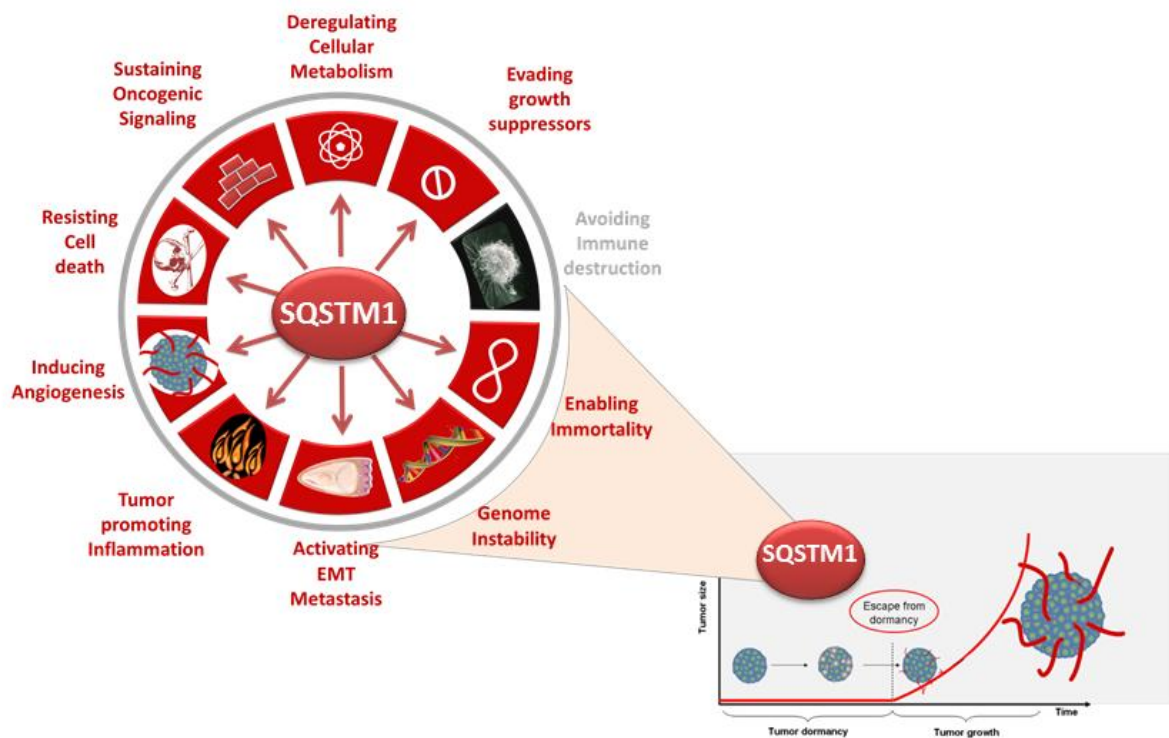
Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank Nathalie Rochet, Nathalie Singer, Etienne Boulter, and Jean Albrengues for helpful discussions. This work was supported by grants from “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale”, “Agence de l’Environnement et de la Maîtrise de l’Energie” (AB: ADEME n° 0862C0044), Agence régionale santé Provence Alpes Côte d’Azur and Direction régionale de l’Environnement, de l’Aménagement et du Logement (AB: plan régional santé environnement PRSE PACA n°6.3.3.3 et 6.3.3.4), “Association pour la Recherche contre le Cancer” (ARC Grants no SL220110603478), “Programme Hospitalier De Recherche Clinique” (PH: PHRC Nice CHU 2003), “Cancéropole PACA” (PROCAN 2007, axe II), “Institut National du Cancer” (PH: PNEs POUMON INCa), and the NIH (DJK: GM053396).

Orchestration of tumour growth by p62



Introduction

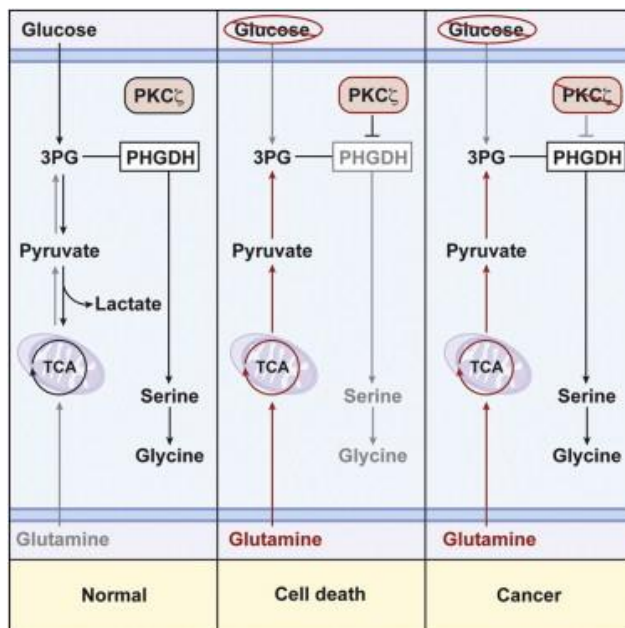
Malgré l'accumulation de SQSTM1 dans de nombreux cancers et de l'importance du métabolisme pour le développement tumoral, seuls quelques arguments indirects ont été rapportés à ce sujet:

- **Pour le métabolisme lipidique**

Il est clair aujourd'hui grâce à trois modèles murins d'inactivation de SQSTM1 qui deviennent obèses que SQSTM1 joue un rôle important dans le métabolisme lipidique (Duran et al., 2004; Komatsu et al., 2007; Muller et al., 2013). A l'origine, cette obésité a été attribuée à un défaut d'activation d'un des partenaires de SQSTM1 :

- C'est-à-dire l'activation **d'ERK** ; normalement séquestrée, réprimée par SQSTM1 et impliquée dans l'adipogenèse (Rodriguez et al., 2006, Lee, 2010 #411).
- Ou à l'inactivation de la voie de signalisation **P38/PGC1 α /UCP1** ; normalement activé par SQSTM1 et nécessaire à la thermogénèse et à la biogénèse mitochondriale des adipocytes bruns (Muller et al., 2013).

De façon paradoxale, en réponse à l'anisomycine, SQSTM1 va permettre à cette même kinase **P38** de phosphoryler et d'inhiber l'activité transcriptionnelle de PPAR α (COS-7 et



hépatocarcinomes H4IIE, (Diradourian et al., 2008)). Or, PPAR α est incontestablement impliquée dans le catabolisme oxydatif des acides gras (AG), et la biogénèse mitochondriale (Braissant et al., 1996; Reinhard et al., 2008). Néanmoins ces données sont bien loin du développement tumoral (tissu adipeux et anisomycine).

- **Pour la glutaminolyse**

Très récemment, la kinase C atypique PKC ζ , un partenaire du domaine PB1 de SQSTM1 a été identifiée comme un suppresseur tumoral métabolique à la fois dans un model transgénique comme dans des cohortes de patients souffrants de cancers colorectaux. La PKC ζ réprime en effet l'expression et l'activité des enzymes (PHGDH et PSAT1) responsables de la conversion du 3-phosphoglycérate en phosphosérine. En absence de glucose, son défaut favorise la plasticité des cellules tumorales en reprogrammant leur métabolisme vers l'utilisation de la glutamine comme source d'énergie (Kaiser et al., 2007; Ma et al., 2013).

- **Pour la glycolyse aérobie**

Même si l'expression d'oncogènes tels que Ras, Myc et Akt, sont reconnus pour induire SQSTM1 et engager la glycolyse aérobie. Aucune preuve directe quant à l'implication de SQSTM1 dans le métabolisme tumoral n'a été apportée.

Hypothèse

De l'ensemble de ces données, nous avons émis l'hypothèse que la surexpression ou des mutations de SQSTM1 pourrait en affectant l'activité de ces partenaires (P38, ERK, PKC ζ , Akt) favoriser le switch métabolique vers la glutaminolyse et la glycolyse aérobie; ce qui offrirait un avantage sélectif à la cellule.

Jusqu'à présent toutes les études menées sur le pouvoir pro-oncogénique de SQSTM1 ont été menées grâce à des modèles murins d'adénocarcinomes pulmonaires RAS mutés {Duran, 2008 # 109}.

Stratégie

Pour étudier le rôle pro-oncogénique de SQSTM1, nous avons utilisé la lignée du cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) A549 qui exprime l'oncogène KRASG12S et surexprime SQSTM1. Nous avons généré des lignées A549 déplétées en SQSTM1 grâce à la transduction de deux shRNA indépendants ciblant son ARNm au niveau de la séquence codante ou de l'extrémité 3' non codantes. Nous avons également produits des lignées de cancer du poumon, mélanomes et gliomes déplétées en ATG5, ATG7 et SQSTM1 afin de définir leur protéome.

Tous les résultats obtenus ont été validés sur des cohortes des patients atteints du cancer du poumon, des mélanomes, et des gliomes (tumorothèque, biopuces, et analyse *in silico*).

Les résultats de l'Article 5 sont en cours d'évaluation pour propriété intellectuelle. Une version épurée du matériel et méthodes et de toutes les applications brevetables vous est proposée.

Résultats

1) L'expression de SQSTM1 est absolument requise pour l'établissement de glycolyse aérobie (effet Warburg) dans les cellules A549 de cancer du poumon.

- De façon remarquable, l'inactivation de SQSTM1 réverse le phénotype « transformé » des cellules A549, comme en témoignent leur faible prolifération et l'incapacité de ces cellules à former des colonies à faible densité (**Figure 1A**).
- Par analyse protéomique, nous avons mis en évidence le rôle central de SQSTM1 dans la programmation de la glycolyse aérobie (effet Warburg); une condition universelle et sinécquanone à toute croissance tumorale rapide (**Fig. 1B**). Par rapport aux cellules A549 transduites par un shARN contrôle, l'inactivation de SQSTM1 en effet a pour conséquence la chute (en bleu sur le schéma) de l'expression des deux principaux transporteurs du glucose SLC2A1/GLUT1 et SLC2A4/GLUT4, de l'hexokinase II (HK II), l'enzyme clé de la première étape de la glycolyse et de la phosphofructokinase (PFK), un régulateur du flux glycolytique. Les expressions de la lactate déshydrogénase isoforme A (LDHA), qui convertit le pyruvate en lactate pendant la glycolyse et de son transporteur SLC16A3 (MCT4) sont également considérablement diminuées.
- Les analyses Q RT-PCR des messagers et les dosages biochimiques du milieu conditionné ont confirmé de façon indépendante cette reprogrammation métabolique importante. La répression de SQSTM1 réduit de façon significative l'expression des messagers des marqueurs de la glycolyse (**Fig. 1B**), la consommation de glucose (**Fig. 1C, à droite**), la production de lactate (**Fig. 1C ; gauche**); et l'acidification extracellulaire (**Fig. S1**). Faits marquants les cellules A549 invalidées pour SQSTM1 sont résistantes à la déprivation de glucose (**Fig. 1D**), par rapport aux cellules A549 hautement addictives au glucose.

Ces données suggèrent que SQSTM1 est indispensable pour l'instauration d'un métabolisme glycolytique (affectant plusieurs étapes limitantes qui régissent l'absorption du glucose et son métabolisme).

2) L'invalidation de SQSTM1 restaure la phosphorylation oxydative dans les cellules tumorales grâce à l'activation PPARA

Comme le montre la Figure 2, l'invalidation de SQSTM1 fait basculer le métabolisme hautement glycolytique des cellules A549 vers le métabolisme oxydatif des acides gras, comme le suggèrent

- (i) la diminution des réserves de lipides (**Fig. 2A**),
- (ii) la régulation positive des gènes impliqués dans la lipolyse et la β -oxydation des acides gras (**Fig. 2B**), et
- (iii) une grande sensibilité des cellules invalidées en SQSTM1 à la carence en lipides (**Fig. 2C**).

L'acquisition de deux autres caractéristiques métaboliques des cellules cancéreuses : la glutaminolyse (**Fig. S3**) et la synthèse *de novo* d'acides gras (**Fig. 2B et S3**) sont également perdus suite à l'invalidation de SQSTM1.

L'invalidation de SQSTM1 induit la biogenèse mitochondriale

Conformément à une reprogrammation métabolique vers OXPHOS, nous mettons en évidence une augmentation de

- (i) la consommation d'oxygène (cellules intactes et perméabilisées quelles que soient la nature des substrats respiratoires : pyruvate -malate, succinate et G3P, **Fig. 2D gauche, et S2B**)
- (ii) la production d'ATP (**Fig. 2D, droite**),
- (iii) la densité des mitochondries (activité de la citrate synthase et marquage mitotracker, **Fig. 2E**),
- (iv) avec une augmentation spectaculaire de toute la chaîne respiratoire (niveaux d'expression et des activités des complexes OXPHOS, **Fig. S2A et S2B**).

Nous l'avons évoqué dans l'introduction les mitochondries qui réalisent la phosphorylation oxydative et la beta oxydation des d'acides gras sont sélectivement dégradées par un processus appelé mitophagie dépendant de SQSTM1 comme récepteur. Toutefois, nous avons démontré que c'est l'augmentation de la biogenèse des

mitochondries et non pas un défaut de la mitophagie qui est responsable de ce changement métabolique. En effet, l'inhibition de l'autophagie par des shRNA *ATG5* et *ATG7* augmentent comme attendue la densité mitochondriale (marquage mitotracker, **Fig. S2D**), mais cette accumulation de mitochondries endommagées n'est pas suffisante pour rétablir la phosphorylation oxydative (production d'ATP, niveaux et activités des complexes mitochondriaux **Fig. 2G et S2**) et pour affecter le métabolisme glycolytique (consommation de glucose, l'acidification du milieu et addiction au glucose **Fig. 2H, 2I et S2G**).

Faits marquants, les taux d'expression du messager de PGC-1 α , le régulateur principal de la biogenèse mitochondriale, est multiplié par un facteur trois dans des cellules invalidées par SQSTM1 par rapport aux cellules ShRNA contrôle (**Fig. 2F**). En accord avec ce scénario, ses partenaires les facteurs de transcription PPAR α , PPAR β/δ , et PPAR γ sont tous trois exprimés dans des cellules A549 : les expressions protéiques et des messagers de PPAR α sont augmentés alors que celles de PPAR γ sont significativement diminuées par l'invalidation de SQSTM1.

Parmi les membres de la famille PPAR, nous démontrons que seul PPAR α est essentiel à la reprogrammation métabolique dépendante de SQSTM1: en effet les augmentations de la densité mitochondriale (**Fig. 2E**) et d'expression des complexes de la chaîne respiratoire (**Fig. 2G**) sont abrogées que ce soit par un antagoniste spécifique de PPAR α ou des shRNA PPAR α . Parallèlement, l'inhibition de PPAR α dans les cellules invalidées SQSTM1 bloque l'utilisation des acides gras (**Fig. 2B**), et restaure l'expression de Glut1 (**Fig. 2H**) et l'addiction au glucose (**Fig. 2I**). Aucun effet n'a été observé lors d'un traitement avec des antagonistes de PPAR β/δ , ou de PPAR γ (**Fig. 2I**).

3) L'invalidation de SQSTM1 induit la différenciation des cellules tumorales

Parallèlement à cette reprogrammation métabolique, l'invalidation de SQSTM1 induit la différenciation épithéliale avec la perte des marqueurs mésenchymateux au profit des marqueurs épithéliaux. Par rapport à la morphologie mésenchymateuse des cellules A549 (**Fig. 3A**), les cellules invalidées en SQSTM1 sont des cellules polarisées cuboïdes formant des structures tubulaires (**Fig. 3B**), rappelant la différenciation de cellules épithéliales

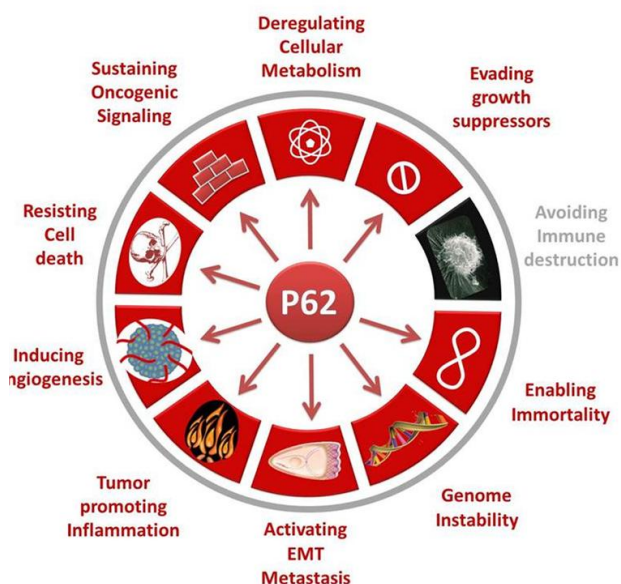
bronchiques. Ainsi, le phénotype et la signature métabolique des cellules invalidées en SQSTM1 se rapprochent de celle des cellules normales et saines.

De façon remarquable, l'inactivation de SQSTM1 a également induit la différenciation de deux autres types de tumeurs agressives et pour lesquels il n'y a aucun traitement efficace: la lignée humaine de mélanome A375 exprimant l'oncogène BRAFV600 (**Fig. 3D**) et la lignée humaine de gliomes U87 haplo-insuffisant pour PTEN (**Fig. 3G**) (différenciation morphologique riche en dendrites associée à une chute de la prolifération, et à la perte de leur addiction en glucose).

L'ensemble de ces données mettent en évidence l'addiction des cellules tumorales à la surexpression de SQSTM1 pour le maintien de leur phénotype « malin », quel que soit le type de tumeur et la nature mutation oncogénique initiatrice (**Fig. 3**).

4) SQSTM1 engage un programme tumoral en réprimant le microARN suppresseur de tumeur let - 7

Afin de comprendre comment SQSTM1 pourrait être si essentiel au développement tumoral, nous avons poursuivi l'analyse protéomique globale des cellules A549 invalidées en



SQSTM1. Bien au-delà du rôle rapporté de SQSTM1 dans l'activation des voies NFκB {Duran, 2008 # 109} et de RHOA (article 2), l'analyse du protéome a révélé de façon inattendue que le SQSTM1 orchestre la progression tumorale en régulant 9 des 10 voies fondamentales de la tumorigénèse (Hanahan and Weinberg, 2011) ; tels que la glycolyse, la signalisation oncogénique, l'anabolisme, l'angiogenèse, l'inflammation, la migration au profit de la différenciation et du métabolisme OxPhos (**Fig. 3C**) .

La réanalyse des données publiques de biopuces de cohortes de patients souffrant de cancers du poumon, de mélanome et de gliomes utilisant GSEA (Gene Set Enrichment Analysis, logiciel v2.07, <http://www.broad.mit.edu/gsea>, $p < 0,05$) confirme le rôle pronocogénique d'une expression élevée de SQSTM1 dans le métabolisme, l'anabolisme, la croissance cellulaire, l'angiogenèse et la transition épithéliale mésenchymateuse (dédifférenciation) au cours de la progression tumorale (**Fig. 3K et 3L, Fig. S3 à S8**). Après stratification, la surexpression de SQSTM1 a été corrélée à une survie plus courte des patients atteints de NSCLC (fumeurs, **Fig. 3J**), de cancer du rein et de gliome (courbes de Kaplan –Meier, **Fig. S10**). Rappelons que la surexpression de SQSTM1 peut être induite par la consommation de tabac (NSCLC), une amplification génique (région 5q35, cancer du rein) ainsi qu'une inflammation (NFκB), le stress oxydatif (NRF2), propices au développement tumoral. En accord, par la re-analyse des data d'Eileen White, nous avons mis en évidence que la transfection de *SQSTM1* dans les cellules tumorales suffit à engager la glycolyse, l'angiogenèse et la transition épithéliale mésenchymateuse les rendant plus agressives (**Fig. S3, S4, S6 à S9**).

Même s'il est important que nous définissions comment au cours du développement tumoral, le métabolisme et la différenciation sont régulés de manière coordonnée pour proposer de nouvelles applications thérapeutiques, les mécanismes sous-jacents restent actuellement inconnus. Sur la base de nos résultats, nous proposons que SQSTM1 pourrait agir tel un interrupteur oncogène qui régirait l'ensemble de la programmation tumorale, probablement par la régulation d'un facteur de transcription ou d'un microARN. Les microARN sont en effet des acteurs clés de la progression tumorale en raison de leur capacité à réprimer > 60 % des gènes humains et ainsi dicter plusieurs fonctions cellulaires simultanément. Parmi les candidats, nous avons focalisé notre attention sur les miRs let-7 (pour lethal-7) car ils sont des suppresseurs de tumeur majeurs qui favorisent la différenciation cellulaire, et répriment le métabolisme du glucose.

Nous avons observé que les microARN let-7 sont fortement exprimés dans les cellules bronchiques différenciées normales, mais pas dans les cellules cancéreuses A549. Remarquablement, six membres de la famille let-7 sont augmentés plus de 7 fois dans les cellules invalidées pour SQSTM1 (**Fig. 4A**). En accord, l'expression des trois cibles oncogéniques de let-7 RAS MYC et HMGA2 est fortement réprimée de façon concomitante

dans les cellules invalidées pour SQSTM1 (**Fig. 4B**). En conséquence, l'invalidation de SQSTM1 réprimée en aval multiples voies oncogénique (expression du cluster d'oncomiR-17-92, l'activation des voie Akt et HIF) et bloquent ainsi la glycolyse, la dédifférenciation, et la prolifération (**Fig. 4C-4E**).

Compte tenu de cette relation alliant la différenciation au métabolisme, nous avons ensuite testé la capacité de PPARA à contrôler l'expression des let-7. L'inhibition de PPARA dans les cellules invalidées pour SQSTM1 par antagoniste chimique ou un shRNA inhibe significativement l'expression des six membres de la famille let-7 et de façon concomitante restaure ces cibles K-Ras, C-Myc, et en aval les oncomiR-17-92 et la prolifération cellulaire (**Fig. 4**).

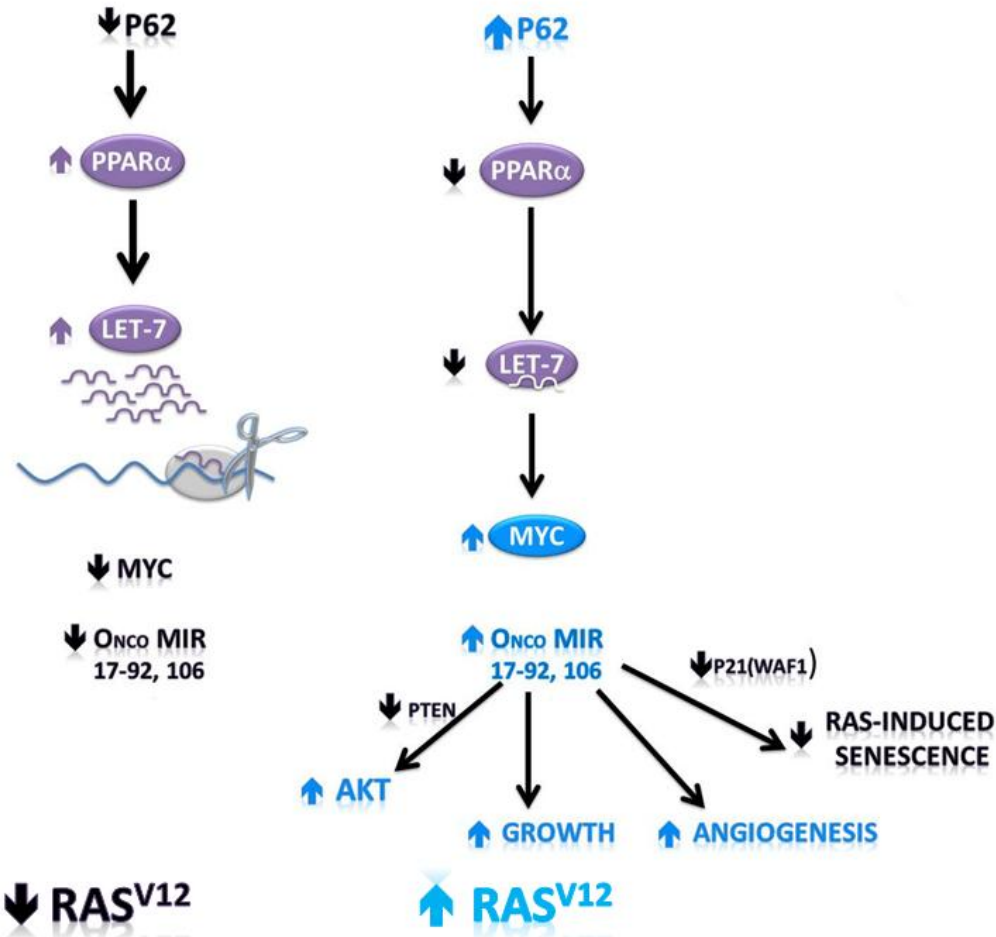
A ce stade, il est important de revenir sur la notion d'oncogène,

L'oncogène Ras contribue à 30% des cancers les plus agressifs pour lesquels il n'y a pas de traitement efficace. Contre toute attente, des arguments scientifiques dans différents modèles cellulaires et transgéniques démontrent que l'expression de l'oncogènes KRAS n'est pas suffisante à induire le cancer. Ceci est à rapprocher de la détection de la mutation Kras chez 10 à 20% de la population saine et qui pourtant ne développe pas de cancer (Daniluk et al., 2012). Pour expliquer ce paradoxe, le consensus avancé suggère que la transformation cellulaire est un processus intrinsèquement inefficace en raison de l'incapacité des cellules tumorales à dépasser l'arrêt en sénescence.

Sur la base de nos résultats nous proposons que la surexpression de SQSTM1 serait l'événement clé responsable de la levée de la répression de la voie PPAR-let7 sur l'expression des oncogènes KRAS, MYC et HMGA2, leur permettant d'atteindre le seuil requis à l'engagement irréversible vers le cancer.

Le mécanisme moléculaire sous-jacent ainsi que les applications potentielles font l'objet d'un dépôt de brevet en partenariat avec l'Inserm Transfert, et ne seront pas discutés dans cette thèse. Ces nouvelles fonctions pro-tumorales de SQSTM1 mettent en lumière l'importance de maintenir à un niveau bas l'expression de SQSTM1 grâce à l'autophagie constitutive, là encore en relation avec sa fonction suppresseur de tumeur. Soulignons que très récemment let-7 a été rapporté pour réprimer l'activation de mTOR, induire

l'autophagie et ainsi à la lumière de nos résultats instaurer un boucle positive favorisant son expression via la dégradation de let7.



Liste des figures (Belaid et al. 2013)

- Figure 1.** L'expression de SQSTM1 est absolument requise pour l'établissement de la glycolyse aérobie (effet Warburg) dans les cellules A549 de cancer du poumon non à petites cellules.
- Figure 2.** L'invalidation de SQSTM1 restaure la phosphorylation oxydative dans les cellules tumorales grâce à l'activation du facteur de transcription PPARA.
- Figure 3.** L'invalidation de SQSTM1 induit la différenciation des cellules tumorales (cancers du poumon, mélanomes, et astrocytomes).
- Figure 4.** SQSTM1 engage l'ensemble de la programmation tumorale en réprimant le microARN suppresseur de tumeur let – 7 : rôle de PPARA.

Figure S1. SQSTM1 régit la dépendance en glucose indispensable à la prolifération des cellules tumorales A549.

Figure S2. La reprogrammation métabolique des cellules A549 déplétées en SQSTM1 est indépendante d'un défaut de la mitophagie.

Liste des Datasets

Figure S3. L'accumulation de SQSTM1 est corrélée au métabolisme des acides aminés et à la synthèse de novo des acides gras dans les cancers (cancers du poumon, mélanomes, et astrocytomes).

Figure S4. L'accumulation de SQSTM1 est corrélée à la glycolyse aérobie dans les cancers.

Figure S5. L'accumulation de SQSTM1 est corrélée à la croissance cellulaire et au stress du réticulum dans les cancers.

Figure S6. L'accumulation de SQSTM1 est corrélée à l'angiogenèse tumorale dans les cancers, en régulant le facteur HIF1 α .

Figure S7. L'accumulation de SQSTM1 est corrélée à la transition épithéliale mésenchymateuse et à la migration tumorale dans les cancers.

Figure S8. L'accumulation de SQSTM1 est corrélée à la dédifférenciation tumorale dans les cancers.

Figure S9. L'accumulation de SQSTM1 est corrélée à une signature oncogénique dans les cancers.

Figure S10. L'accumulation de SQSTM1 est un facteur de mauvais pronostic.

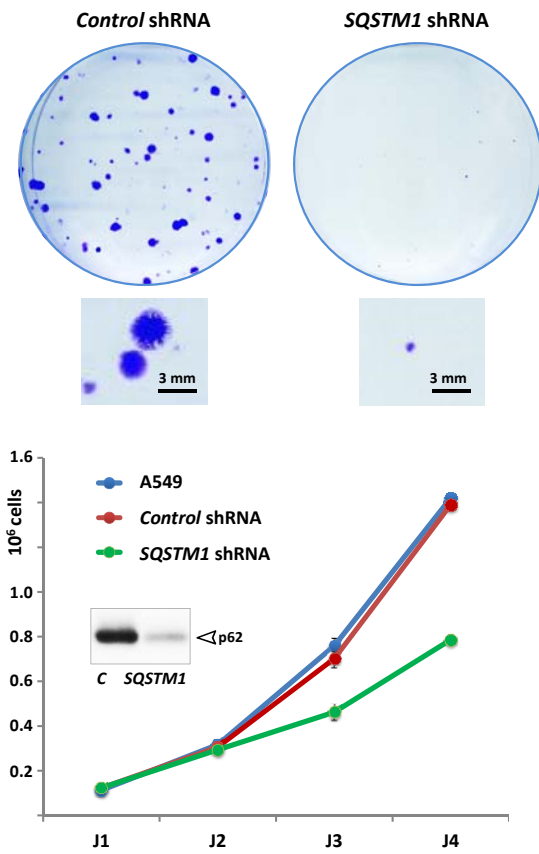
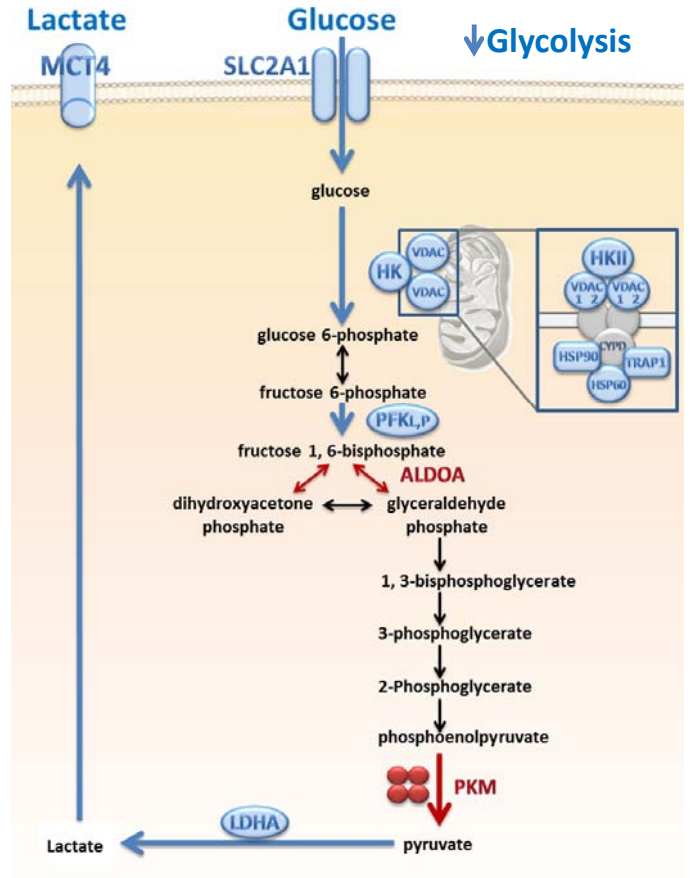
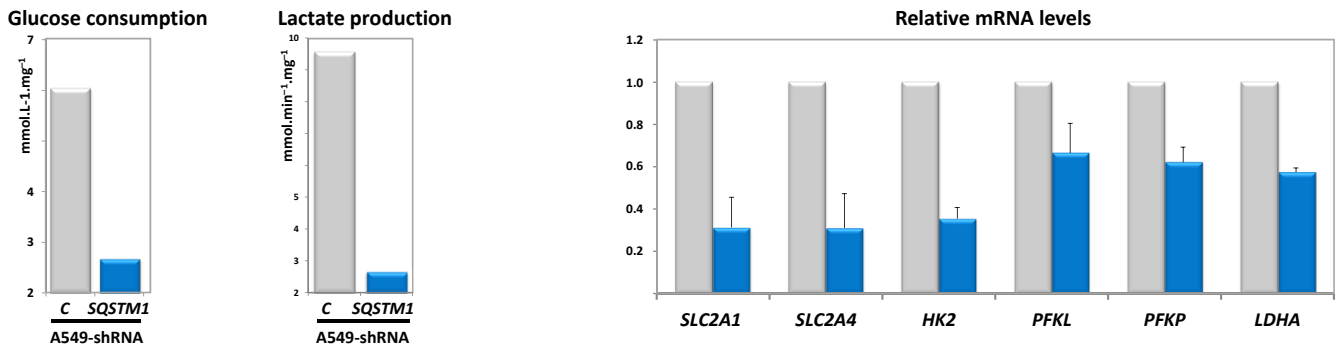
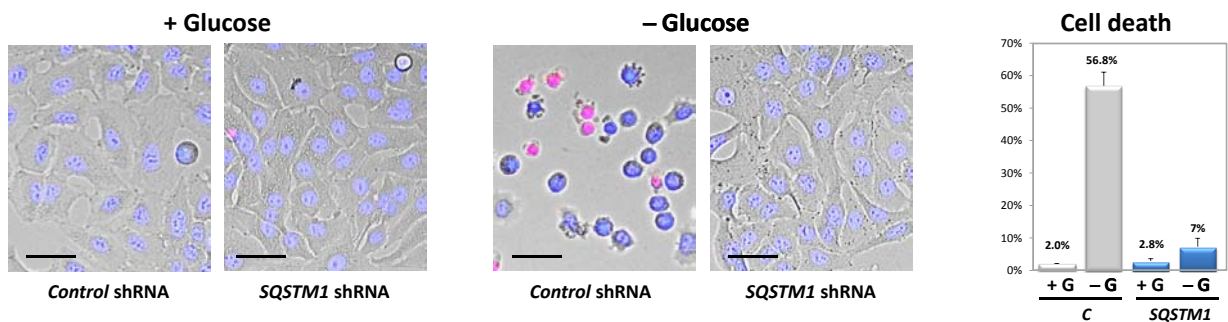
A**B****C****D**

Figure 1 – Belaid *et al.* 2013

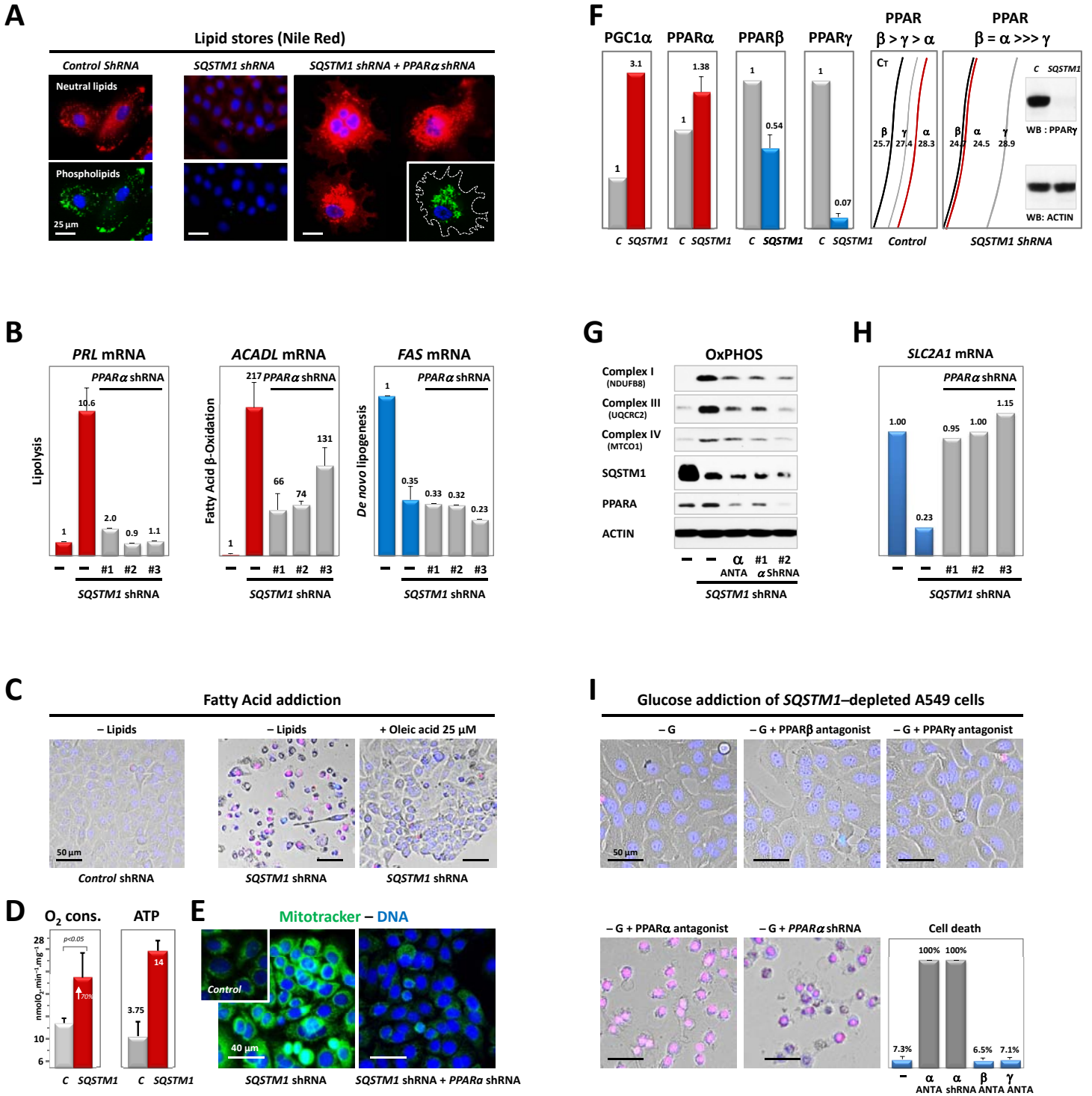
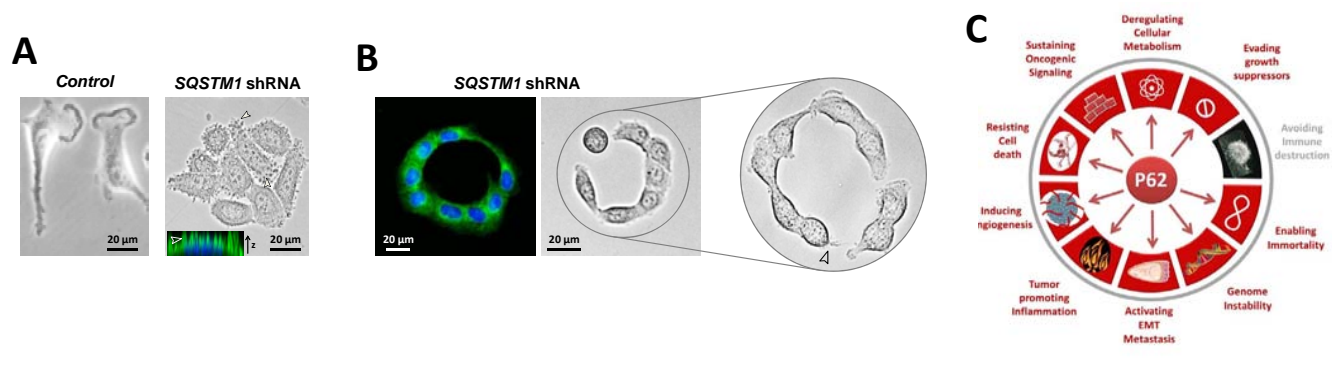
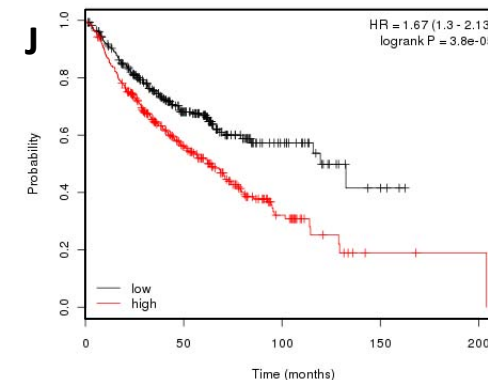


Figure 2 – Belaid *et al.* 2013

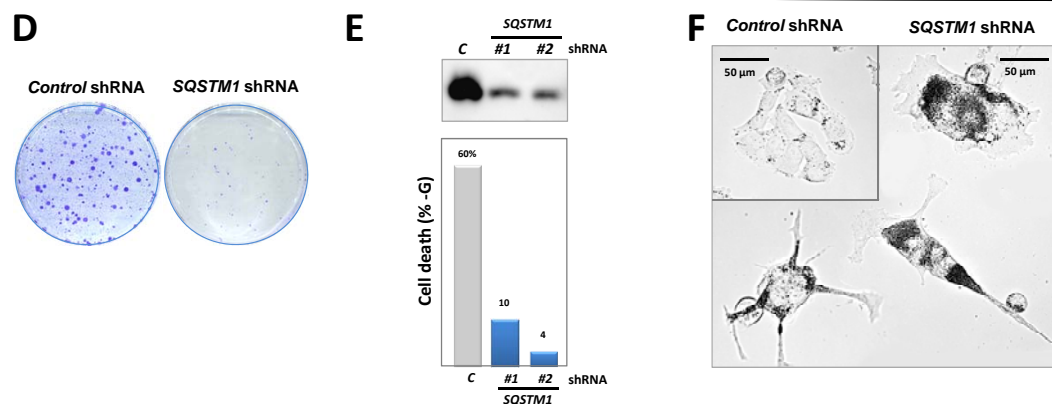
A549 cells – NSCLC – *KRAS*^{G12S}



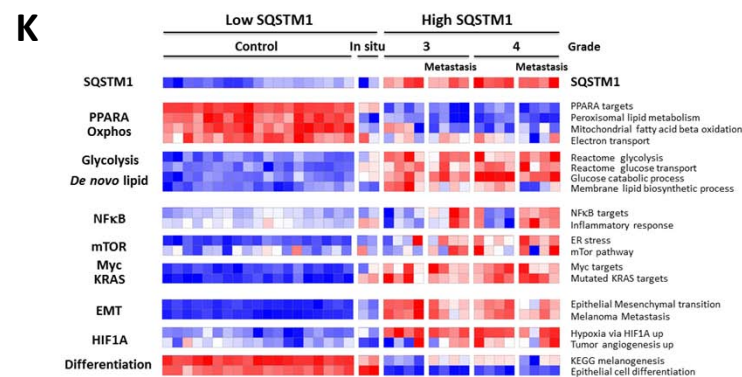
NSCLC (smokers)



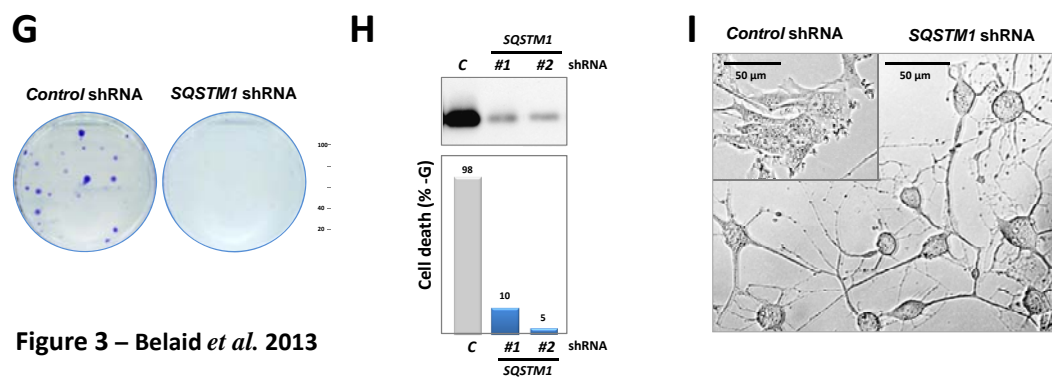
A375 cells – Melanoma – *BRAF*^{V600E}



MELANOMA



U87 MG cells – Glioma



GLIOMA

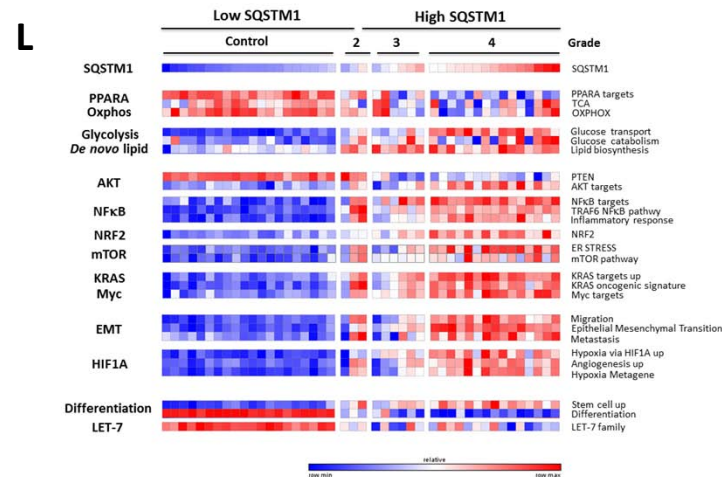


Figure 3 – Belaid et al. 2013

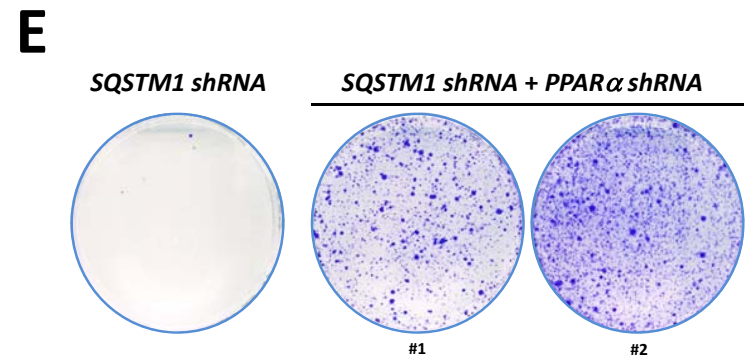
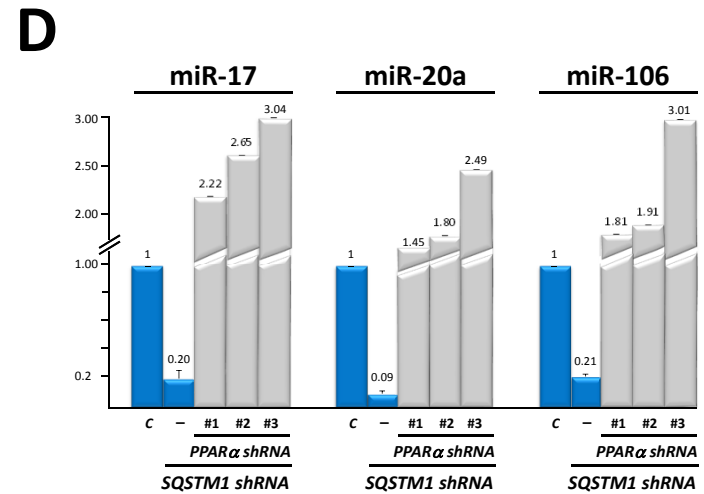
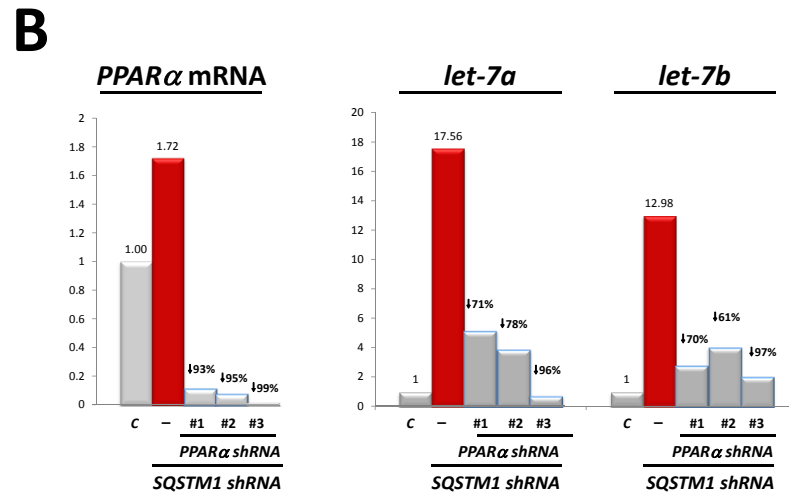
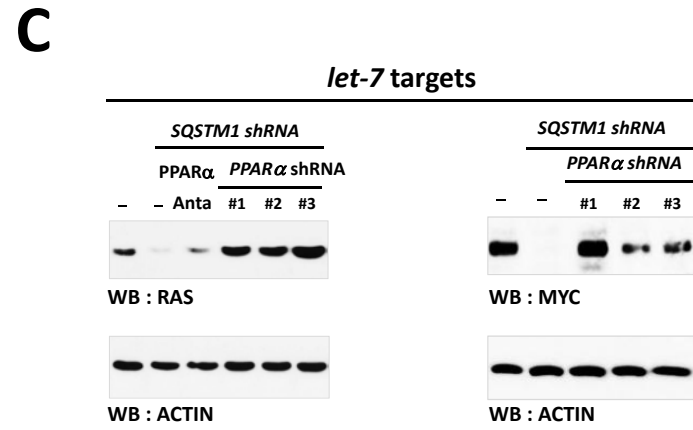
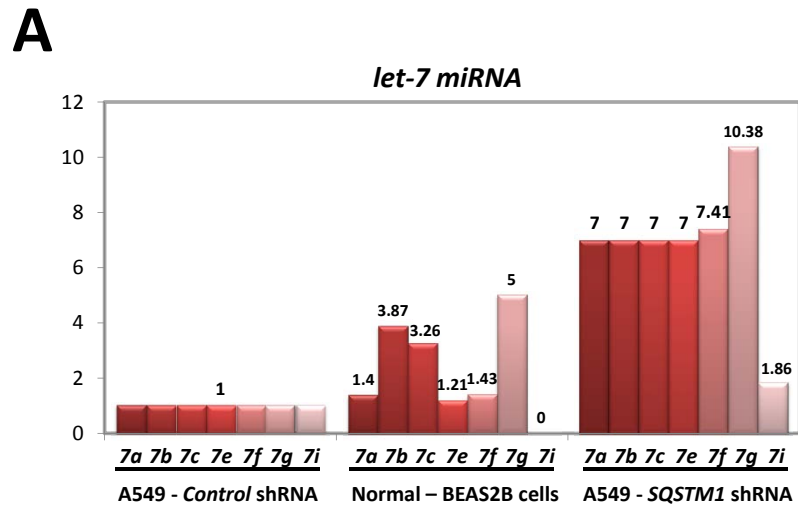


Figure 4 – Belaid *et al.* 2013

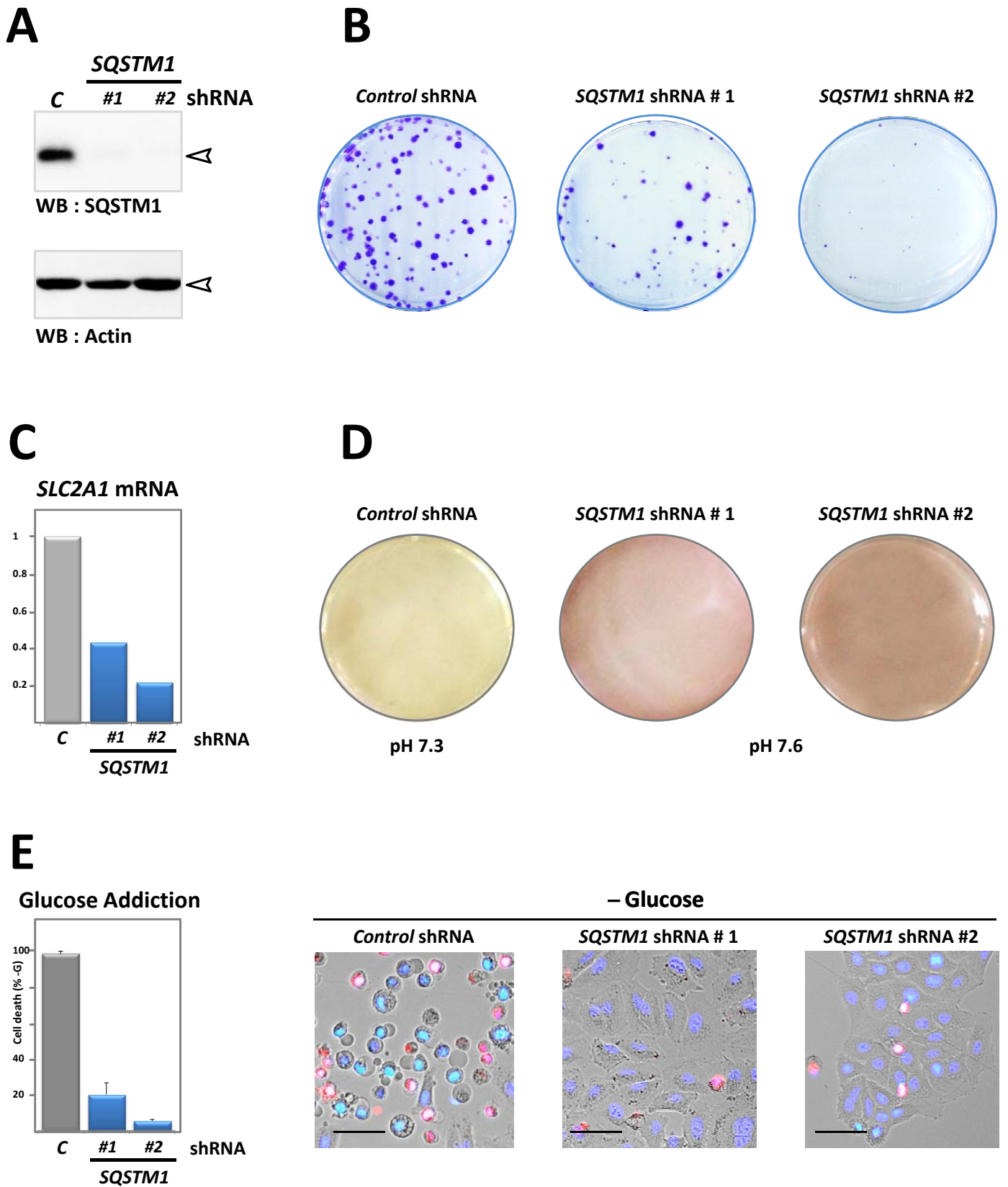


Figure S1 – Belaid *et al.* 2013

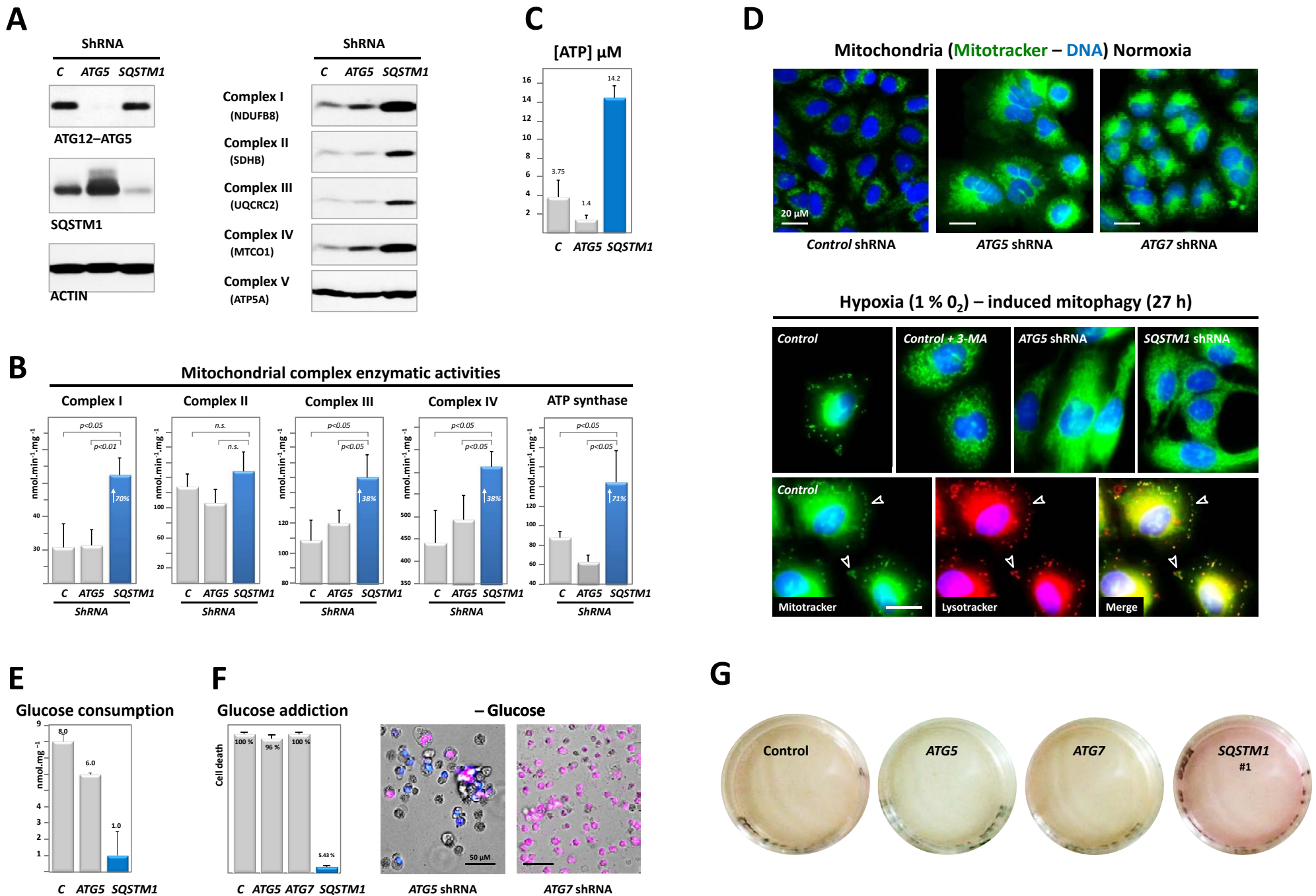


Figure S2 – Belaid *et al.* 2013

O₂ consumption

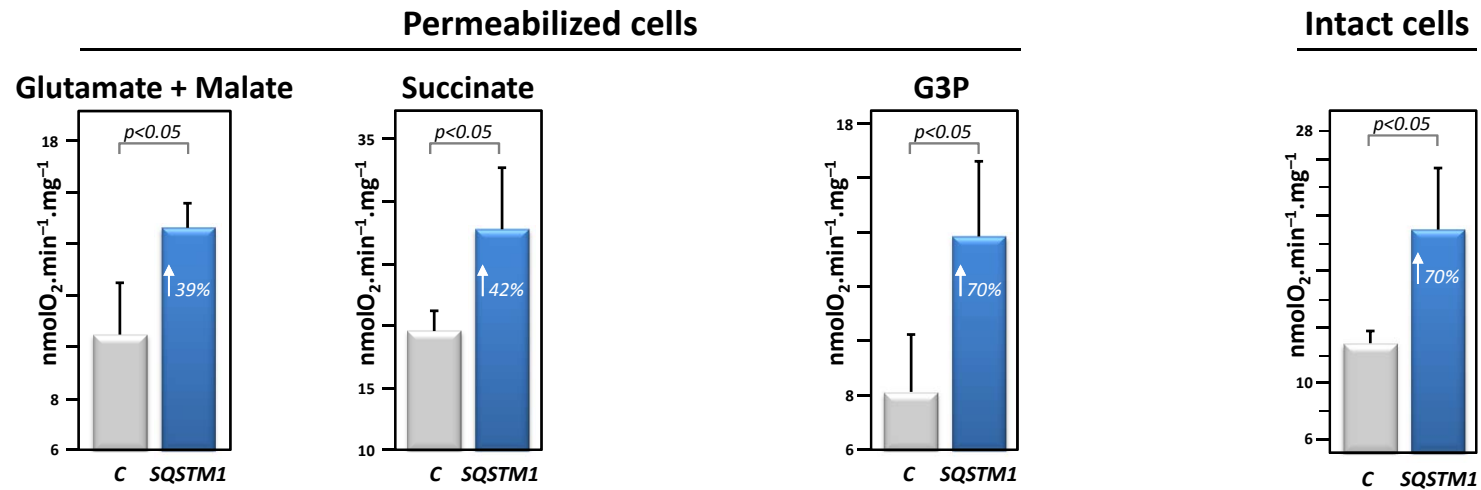


Figure S2H – Belaid *et al.* 2013

Datasets

Lung cancers

ISDB10828: Compilation of GSE2109, GSE8545, GSE10006, GSE10135, GSE10245, GSE11784, GSE11952, GSE12667, GSE13933, GSE27716, GSE28582, GSE30063

Organism: Homo sapiens

Control lung : 106

- Non-smoker(60), Smoker(46)

Lung cancers : 364

- Lung adenocarcinoma-mixed (24)
- Lung adenocarcinoma (186)
- Lung bronchioloalveolar carcinoma (29)
- Lung large cell carcinoma (30)
- Lung squamous cell carcinoma (85)

- 1A(45), 1B(36), 2A(2), 2B(14), 3A(15), 3B(1), IV(7) NILL(350)

- Former smoker(22), non-smoker(10), smoker(115)

Metastasis : 7

USA Caucasian(248) – **Europe** Caucasian(182)

Sqstm1 overexpression

GSE15182 ([Mathew R et al., Cell. 2009](#))

Cell Line iBMK ATG5-/- Bcl-2 immortalized mouse epithelial cells

Genotype/Variation (4)
EGFP(2), p62-EGFP(2)

Organism: Mus musculus

Melanoma

ISDB10061: Compilation of GSE7553, GSE28914, GSE13355, GSE19293, ISDB3055

Organism: Homo sapiens

Control Skin (77) : GSE7553, GSE28914, GSE13355

Primary melanoma (90):GSE7553, GSE19293, GSE23376

- in situ melanoma (2)
- IIIB(19), IIIC(28), IV(27)

Metastasis (71): GSE7553, GSE10282, GSE22968,

- IIIB(28), IIIC(36), IV(7)

USA, Finland

Glioma

GSE4290: ([Sun L et al., Cancer Cell. 2006](#))

Organism: Homo sapiens

Non-tumor brains (27)

- epilepsy(23), normal(4)

Glioma (153)

- Astrocytoma (26)
- Glioblastoma (77)
- Oligodendroglioma (50)

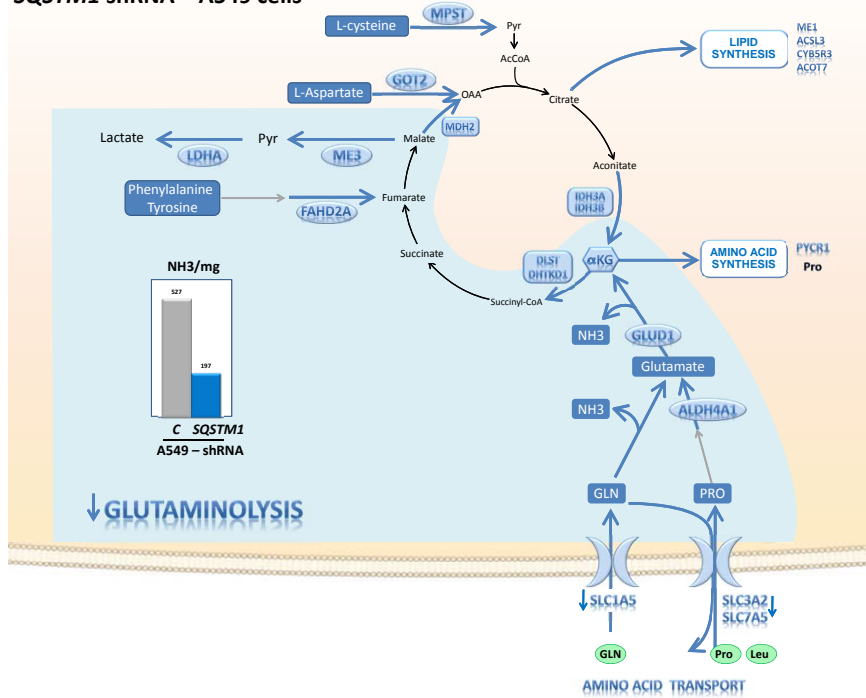
WHO Grade (153)

- 2(45), 3(31), 4(77)

USA

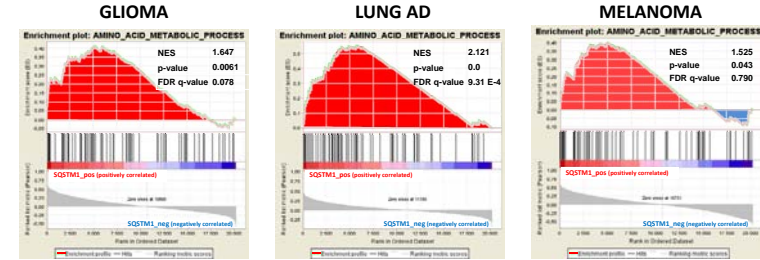
A AMINOACID METABOLISM

PROTEOMIC ANALYSIS SQSTM1 shRNA – A549 cells



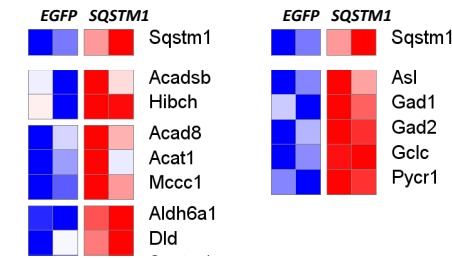
B GSEA: AMINO_ACID_METABOLIC_PROCESS

http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards/AMINO_ACID_METABOLIC_PROCESS.html



SQSTM1_positively correlated

C SQSTM1 transfection

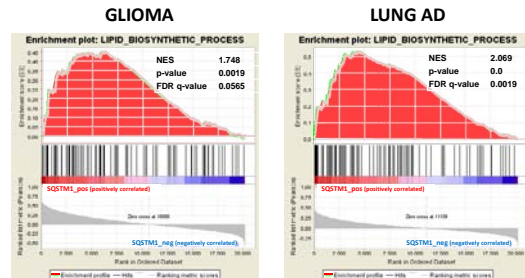


ATG5^{-/-} Bcl-2 iBMK
GSE15182 (Mathew R et al. Cell 2009)

D DE NOVO LIPOGENESIS

GSEA: LIPID_BIOSYNTHETIC_PROCESS

http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards/LIPID_BIOSYNTHETIC_PROCESS.html



SQSTM1_positively correlated

E

A549 cells – NSCLC – KRAS^{G12S}

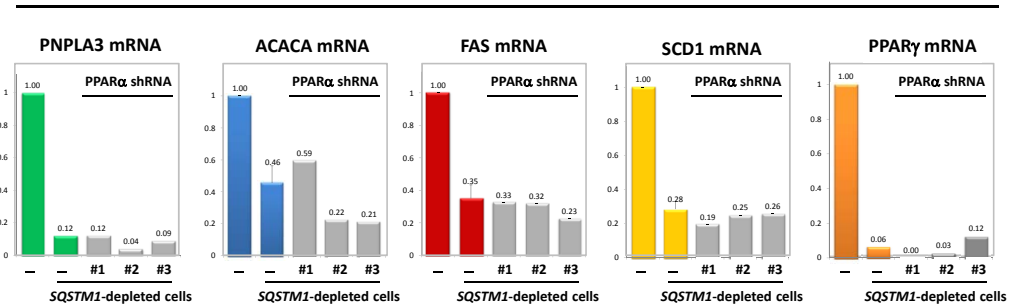
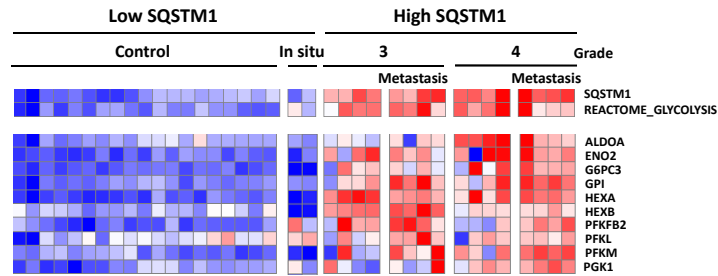
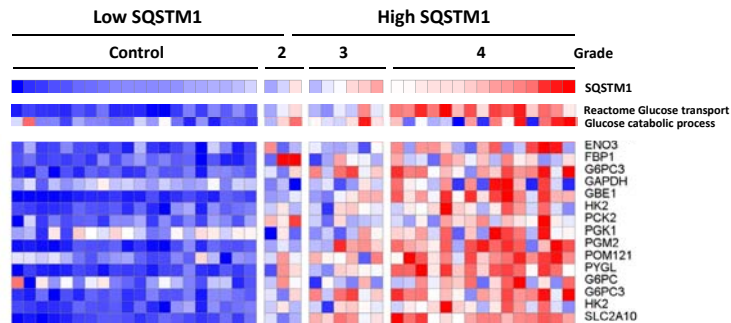
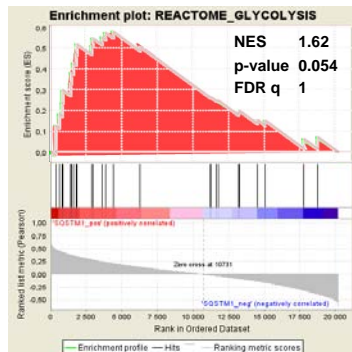
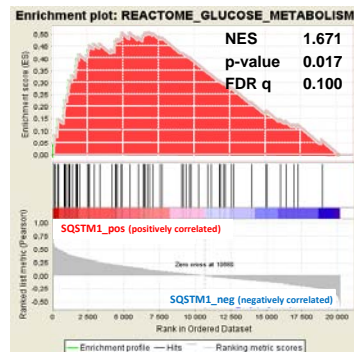
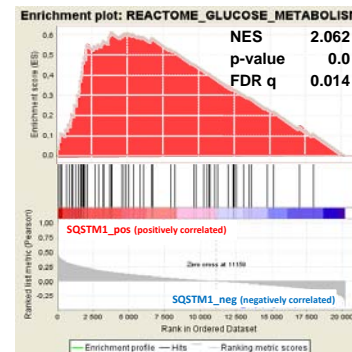
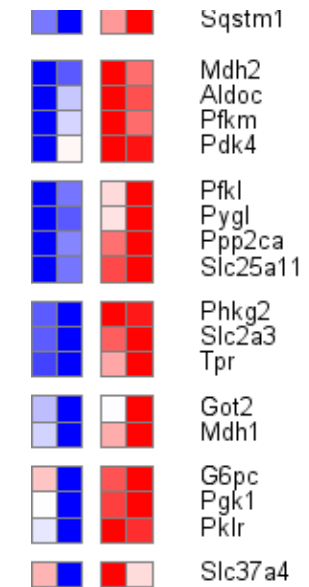
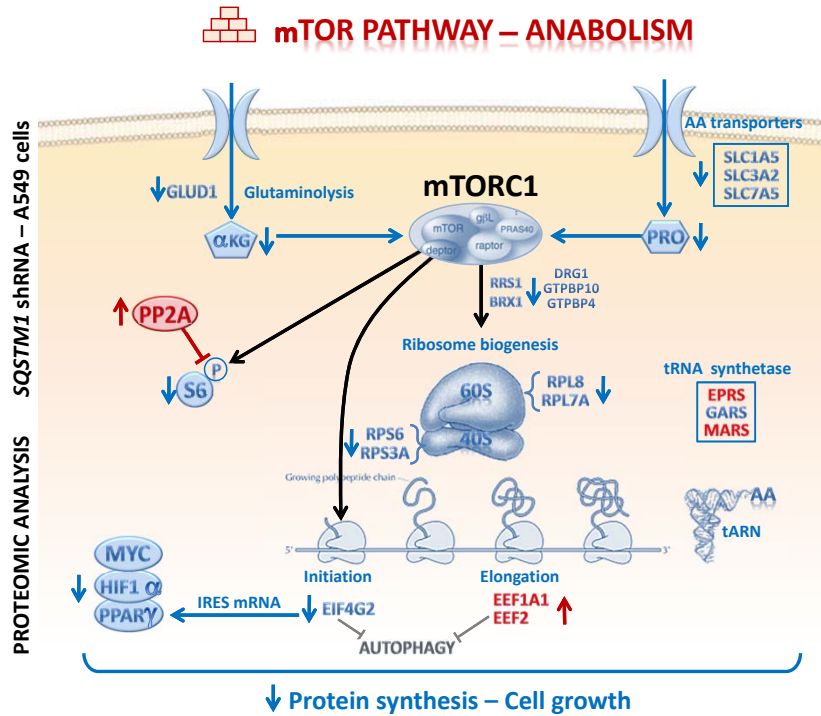


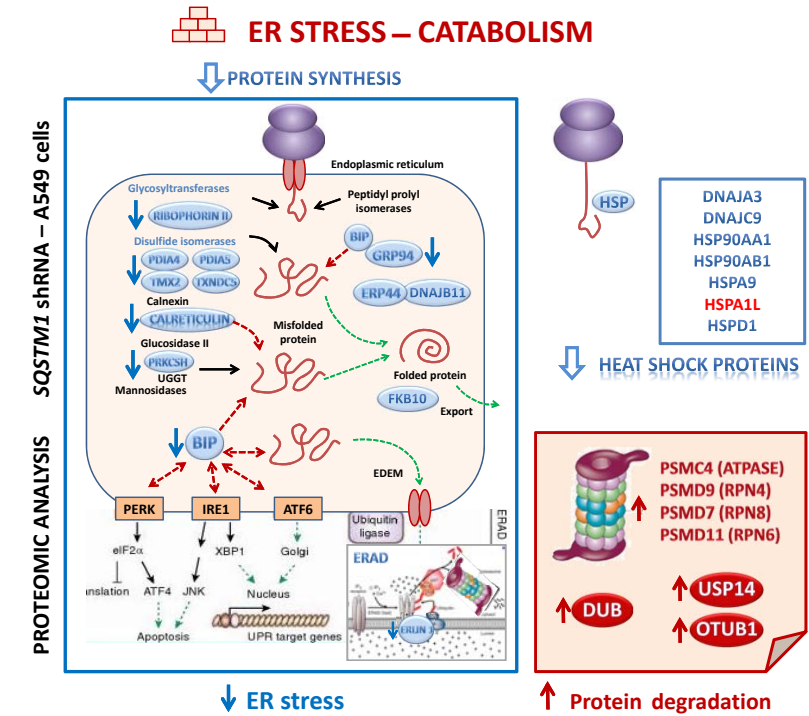
Figure S3 – Belaid et al. 2013

A**Gene Set: REACTOME_GLYCOSE_METABOLISM**http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards/REACTOME_GLYCOSE_METABOLISM.html**Gene Set: REACTOME_GLYCOLYSIS**http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards/REACTOME_GLYCOLYSIS.html**MELANOMA****GLIOMA****MELANOMA****GLIOMA****LUNG ADK****SQSTM1 positively correlated****B****SQSTM1 transfection****EGFP SQSTM1****p: 2.809 e-9****ATG5^{-/-} Bcl-2 iBMK****GSE15182 (Mathew R et al. Cell 2009)****Figure S4 – Belaid et al. 2013**

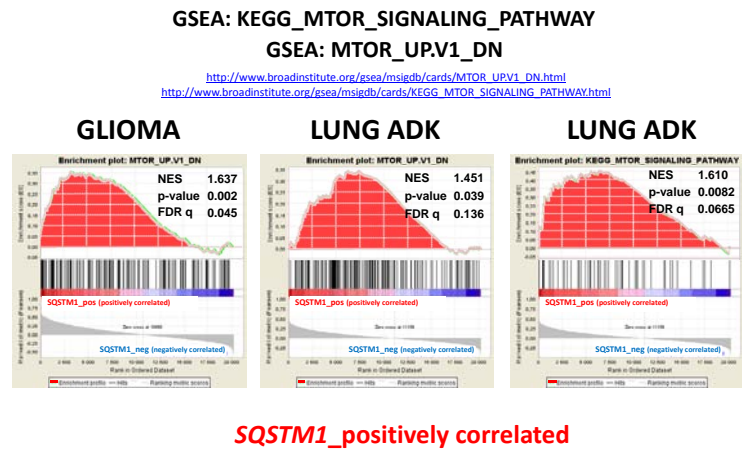
A



B



C



D

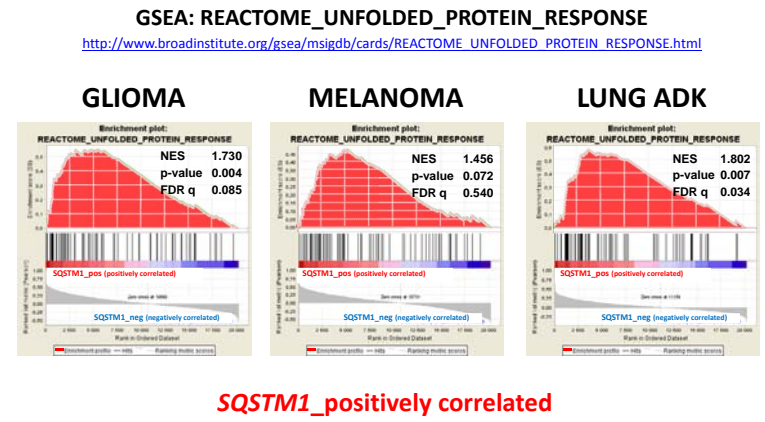
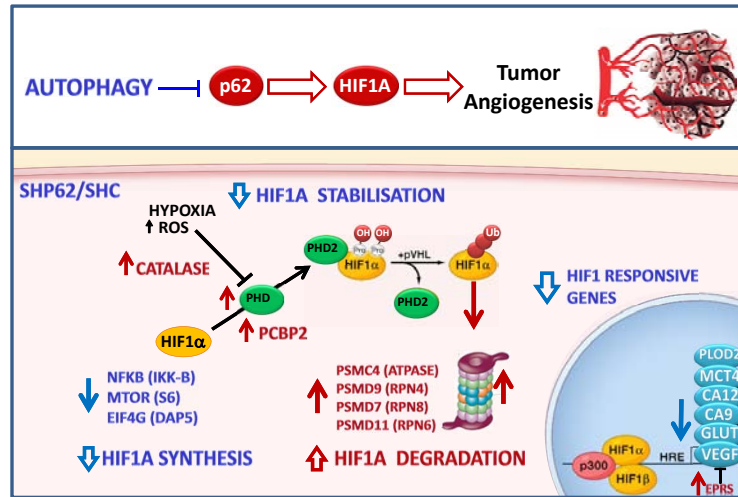
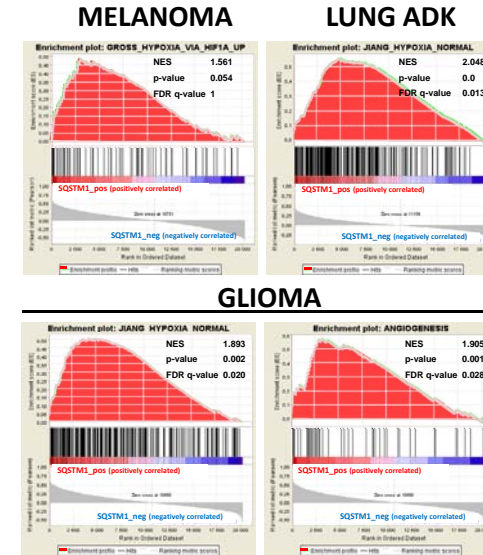
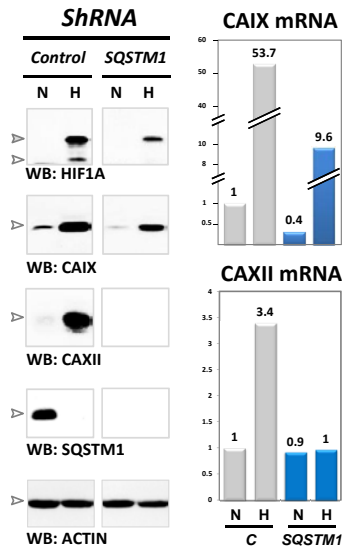
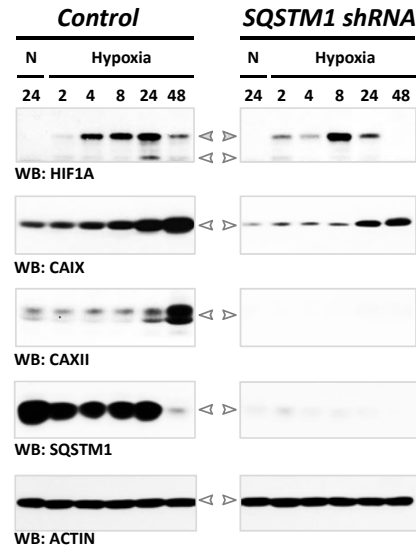
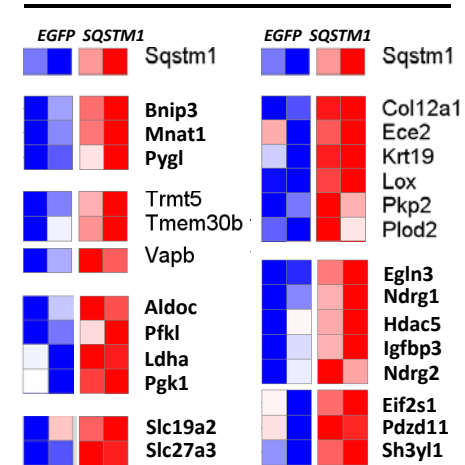
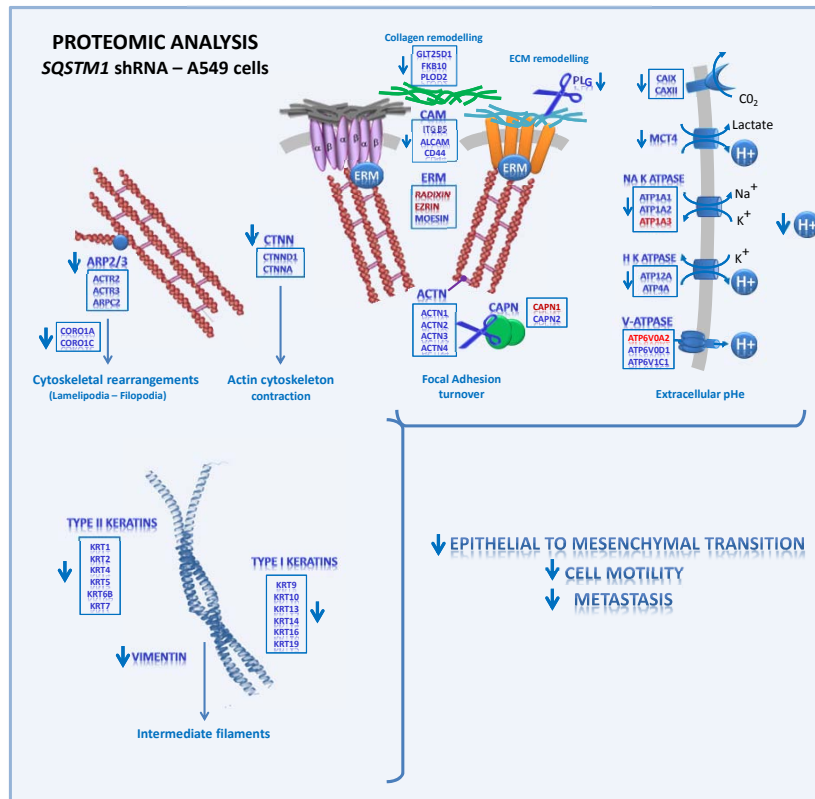


Figure S5 – Belaid *et al.* 2013

APROTEOMIC ANALYSIS *SQSTM1* shRNA – A549 cells**D**GSEA: *JIANG_HYPOXIA_NORMAL* GSEA: *ANGIOGENESIS*http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards/JIANG_HYPOXIA_NORMAL.html <http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards/ANGIOGENESIS.html>**SQSTM1_positively correlated****B****C**A549 cells – NSCLC – *KRAS*^{G12S}**E****SQSTM1 transfection**ATG5^{-/-} Bcl-2 iBMKGSE15182 (Mathew R et al. *Cell* 2009)Figure S6 – Belaid *et al.* 2013

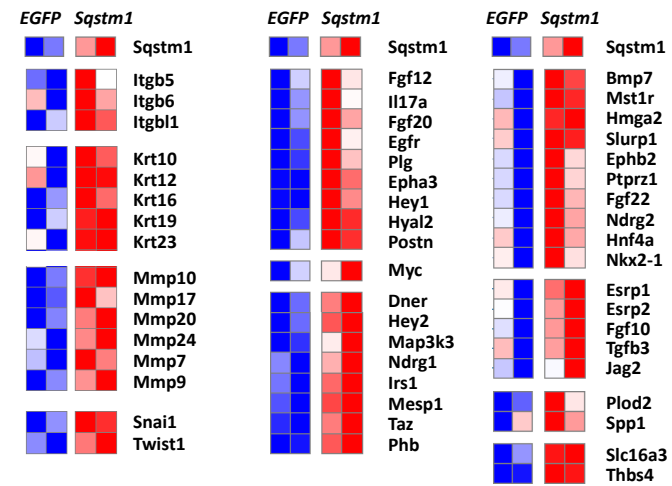
A

MIGRATION – METASTASIS



B

Sqstm1 transfection



Atg5^{-/-} Bcl-2 iBMK
 GSE15182 (Mathew R et al. Cell 2009)

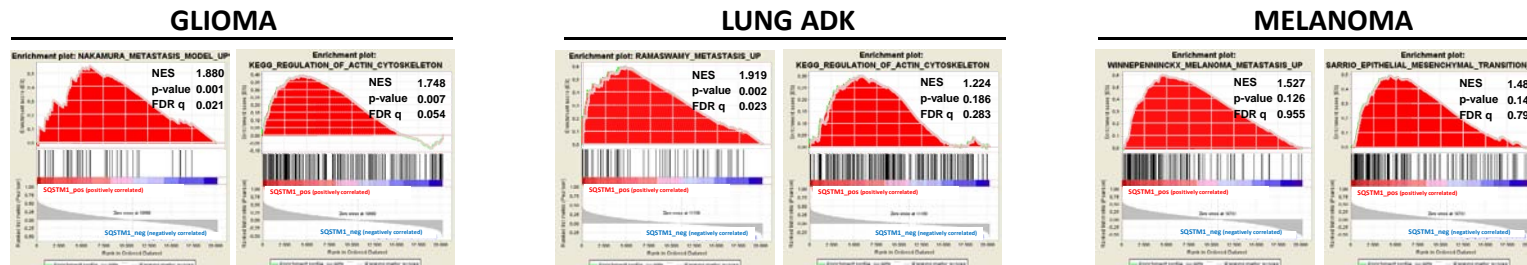
C

GSEA : EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION_UP
GSEA: KEGG_REGULATION_OF_ACTIN_CYTOSKELETON
GSEA : METASTASIS_UP

http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards/SARRIO_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION_UP.html

http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards/KEGG_REGULATION_OF_ACTIN_CYTOSKELETON.html

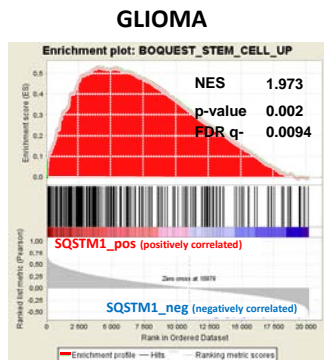
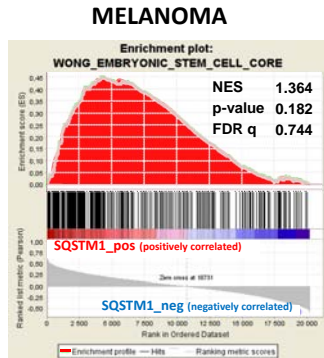
http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards/RAMASWAMY_METASTASIS_UP.html



SQSTM1_positively correlated

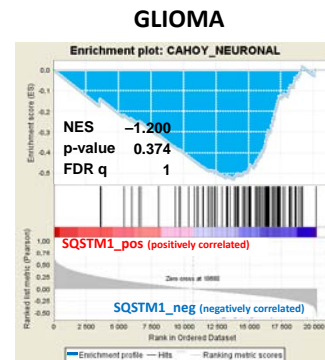
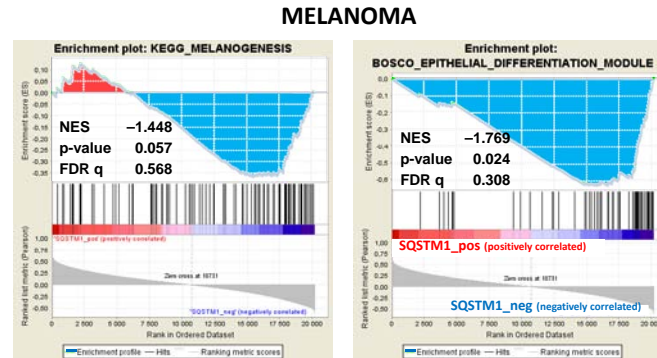
Figure S7 – Belaid et al. 2013

A GSEA: STEM_CELL_UP



SQSTM1_positively correlated

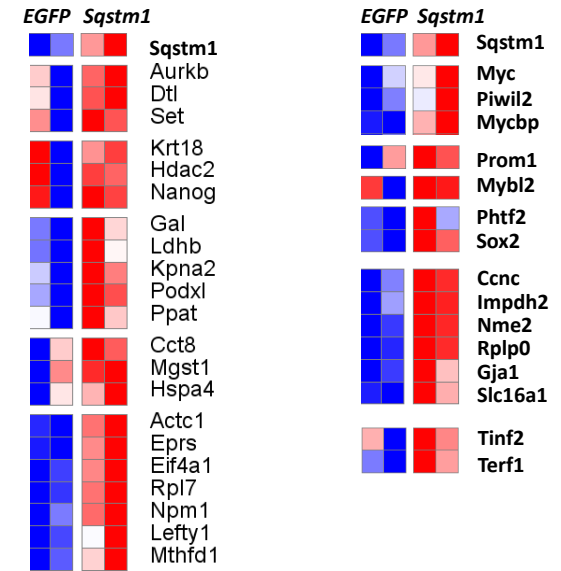
B GSEA: CELL_DIFFERENTIATION



SQSTM1_negatively correlated

C Stem cells $p = 1.004 \text{ e-}9$

Sqstm1 transfection

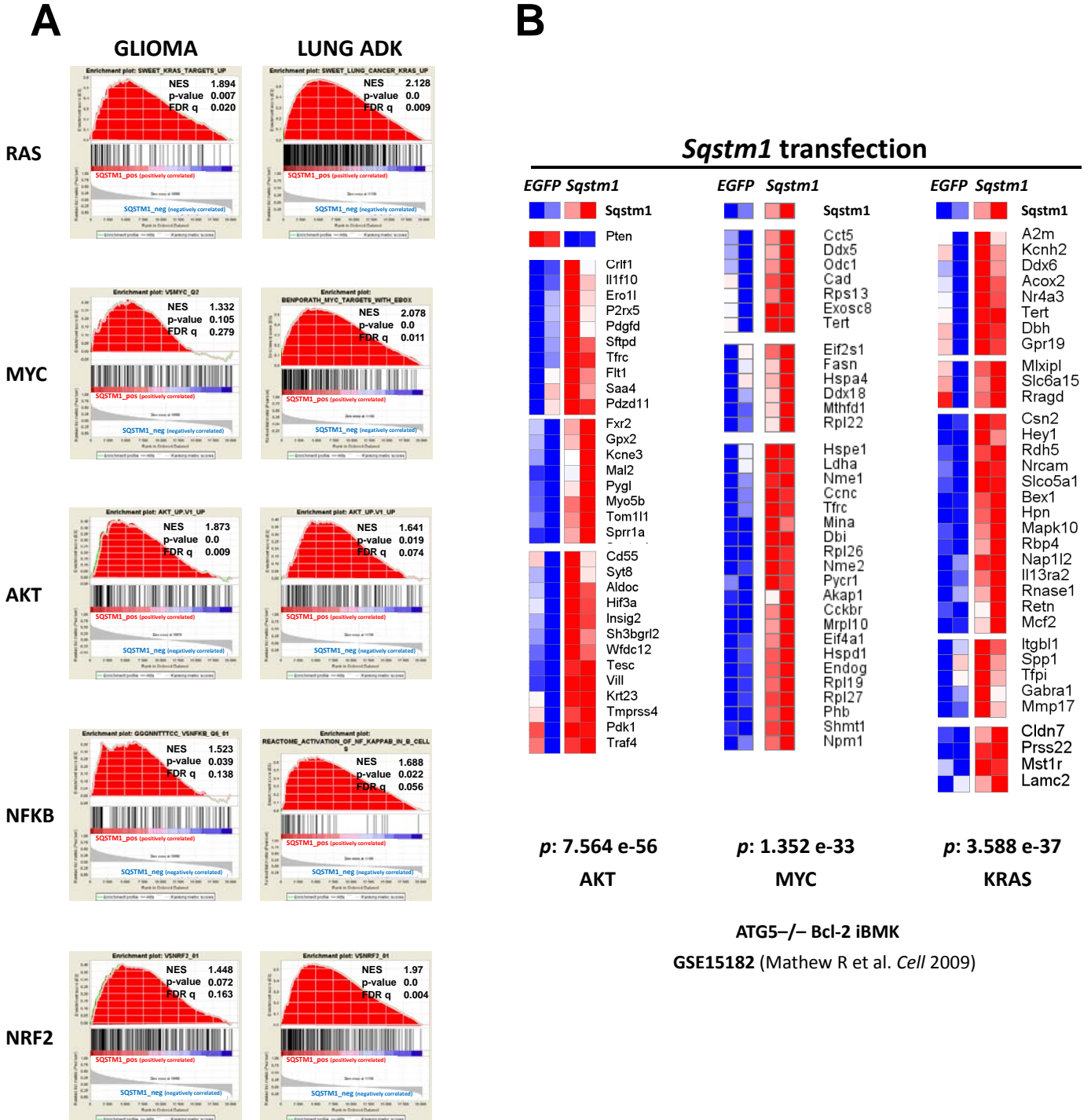


Atg5^{-/-} Bcl-2 iBMK
GSE15182 (Mathew R et al. *Cell* 2009)

Figure S8 – Belaid et al. 2013

C6: ONCOGENIC SIGNATURES

<http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/collections.jsp#C6>

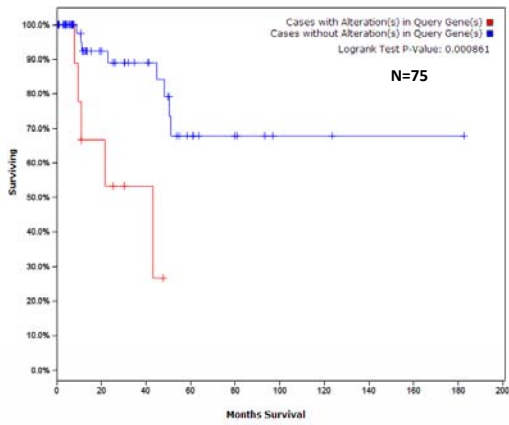


SQSTM1_positively correlated

Figure S9 – Belaid *et al.* 2013

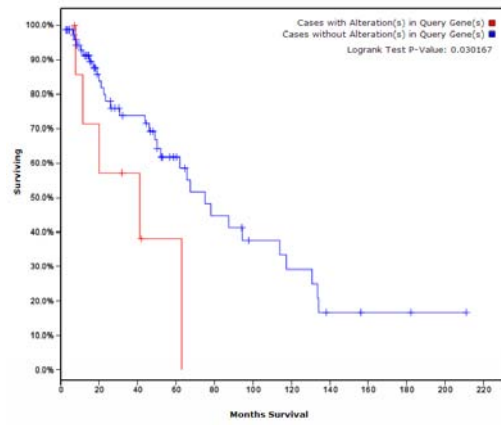
Overall Survival Kaplan-Meier Estimate

Kidney Renal Papillary Cell Carcinoma (TCGA)



	#total cases	#cases deceased	median months survival
Cases with Alteration(s) in Query Gene(s)	10	5	43.14
Cases without Alteration(s) in Query Gene(s)	58	8	0.46

Brain Lower Grade Glioma (TCGA)



	#total cases	#cases deceased	median months survival
Cases with Alteration(s) in Query Gene(s)	8	5	41.10
Cases without Alteration(s) in Query Gene(s)	75	32	75.10

Figure S10 – Belaid *et al.* 2013

BIBLIOGRAPHIE

- Amaravadi, R.K., Lippincott-Schwartz, J., Yin, X.M., Weiss, W.A., Takebe, N., Timmer, W., DiPaola, R.S., Lotze, M.T., and White, E. (2011). Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin Cancer Res* 17, 654-666.
- Aoki, Y., Sato, H., Nishimura, N., Takahashi, S., Itoh, K., and Yamamoto, M. (2001). Accelerated DNA adduct formation in the lung of the Nrf2 knockout mouse exposed to diesel exhaust. *Toxicol Appl Pharmacol* 173, 154-160.
- Archanioti, P., Gazouli, M., Theodoropoulos, G., Vaiopoulou, A., and Nikiteas, N. (2011). Micro-RNAs as regulators and possible diagnostic bio-markers in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 5, 520-524.
- Arias, E., and Cuervo, A.M. (2011). Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Current opinion in cell biology* 23, 184-189.
- Babu, J.R., Geetha, T., and Wooten, M.W. (2005). Sequestosome 1/p62 shuttles polyubiquitinated tau for proteasomal degradation. *Journal of neurochemistry* 94, 192-203.
- Bartlett, B.J., Isakson, P., Lewerenz, J., Sanchez, H., Kotzebue, R.W., Cumming, R.C., Harris, G.L., Nezis, I.P., Schubert, D.R., Simonsen, A., *et al.* (2011). p62, Ref(2)P and ubiquitinated proteins are conserved markers of neuronal aging, aggregate formation and progressive autophagic defects. *Autophagy* 7, 572-583.
- Belizario, J.E., Alves, J., Garay-Malpartida, M., and Occhiucci, J.M. (2008). Coupling caspase cleavage and proteasomal degradation of proteins carrying PEST motif. *Curr Protein Pept Sci* 9, 210-220.
- Bertolaet, B.L., Clarke, D.J., Wolff, M., Watson, M.H., Henze, M., Divita, G., and Reed, S.I. (2001). UBA domains of DNA damage-inducible proteins interact with ubiquitin. *Nat Struct Biol* 8, 417-422.
- Bhogal, R.H., Weston, C.J., Curbishley, S.M., Adams, D.H., and Afford, S.C. (2012). Autophagy: a cytoprotective mechanism which prevents primary human hepatocyte apoptosis during oxidative stress. *Autophagy* 8, 545-558.
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H., and Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *The Journal of cell biology* 171, 603-614.
- Bjorkoy, G., Lamark, T., and Johansen, T. (2006). p62/SQSTM1: a missing link between protein aggregates and the autophagy machinery. *Autophagy* 2, 138-139.
- Boya, P., Gonzalez-Polo, R.A., Casares, N., Perfettini, J.L., Dessen, P., Larochette, N., Metivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T., *et al.* (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Molecular and cellular biology* 25, 1025-1040.
- Boya, P., Reggiori, F., and Codogno, P. (2013). Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature cell biology* 15, 713-720.
- Braissant, O., Foufelle, F., Scotto, C., Dauca, M., and Wahli, W. (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137, 354-366.
- Brest, P., Corcelle, E.A., Cesaro, A., Chargui, A., Belaid, A., Klionsky, D.J., Vouret-Craviari, V., Hebuterne, X., Hofman, P., and Mograbi, B. (2010). Autophagy and Crohn's disease: at the crossroads of infection, inflammation, immunity, and cancer. *Curr Mol Med* 10, 486-502.
- Brest, P., Lapaquette, P., Souidi, M., Lebrigand, K., Cesaro, A., Vouret-Craviari, V., Mari, B., Barbry, P., Mosnier, J.F., Hebuterne, X., *et al.* (2011). A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat Genet* 43, 242-245.
- Cecconi, F., and Levine, B. (2008). The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death. *Developmental cell* 15, 344-357.
- Chang, S., Kim, J.H., and Shin, J. (2002). p62 forms a ternary complex with PKCzeta and PAR-4 and antagonizes PAR-4-induced PKCzeta inhibition. *FEBS Lett* 510, 57-61.

Chargui, A., Zekri, S., Jacquillet, G., Rubera, I., Ilie, M., Belaid, A., Duranton, C., Tauc, M., Hofman, P., Poujeol, P., *et al.* (2011). Cadmium-induced autophagy in rat kidney: an early biomarker of subtoxic exposure. *Toxicol Sci* 121, 31-42.

Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F., and Maity, A. (2001a). Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *The Journal of biological chemistry* 276, 9519-9525.

Chen, L., Shinde, U., Ortolan, T.G., and Madura, K. (2001b). Ubiquitin-associated (UBA) domains in Rad23 bind ubiquitin and promote inhibition of multi-ubiquitin chain assembly. *EMBO reports* 2, 933-938.

Chen, N., Eritja, N., Lock, R., and Debnath, J. (2013). Autophagy restricts proliferation driven by oncogenic phosphatidylinositol 3-kinase in three-dimensional culture. *Oncogene* 32, 2543-2554.

Cherra, S.J., 3rd, Kulich, S.M., Uechi, G., Balasubramani, M., Mountzouris, J., Day, B.W., and Chu, C.T. (2010). Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. *The Journal of cell biology* 190, 533-539.

Choi, A.M., Ryter, S.W., and Levine, B. (2013). Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med* 368, 1845-1846.

Christian, F., Anthony, D.F., Vadrevu, S., Riddell, T., Day, J.P., McLeod, R., Adams, D.R., Baillie, G.S., and Houslay, M.D. (2010). p62 (SQSTM1) and cyclic AMP phosphodiesterase-4A4 (PDE4A4) locate to a novel, reversible protein aggregate with links to autophagy and proteasome degradation pathways. *Cell Signal* 22, 1576-1596.

Chun, S.Y., Johnson, C., Washburn, J.G., Cruz-Correa, M.R., Dang, D.T., and Dang, L.H. (2010). Oncogenic KRAS modulates mitochondrial metabolism in human colon cancer cells by inducing HIF-1 α and HIF-2 α target genes. *Mol Cancer* 9, 293.

Ciani, B., Layfield, R., Cavey, J.R., Sheppard, P.W., and Searle, M.S. (2003). Structure of the ubiquitin-associated domain of p62 (SQSTM1) and implications for mutations that cause Paget's disease of bone. *The Journal of biological chemistry* 278, 37409-37412.

Corcelle, E., Nebout, M., Bekri, S., Gauthier, N., Hofman, P., Poujeol, P., Fenichel, P., and Mograbi, B. (2006). Disruption of autophagy at the maturation step by the carcinogen lindane is associated with the sustained mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activity. *Cancer Res* 66, 6861-6870.

Croci, C., Brandstatter, J.H., and Enz, R. (2003). ZIP3, a new splice variant of the PKC-zeta-interacting protein family, binds to GABAC receptors, PKC-zeta, and Kv beta 2. *The Journal of biological chemistry* 278, 6128-6135.

Cuervo, A.M., Hildebrand, H., Bomhard, E.M., and Dice, J.F. (1999). Direct lysosomal uptake of alpha 2-microglobulin contributes to chemically induced nephropathy. *Kidney Int* 55, 529-545.

Cuervo, A.M., Knecht, E., Terlecky, S.R., and Dice, J.F. (1995). Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation. *Am J Physiol* 269, C1200-1208.

Daniluk, J., Liu, Y., Deng, D., Chu, J., Huang, H., Gaiser, S., Cruz-Monserrate, Z., Wang, H., Ji, B., and Logsdon, C.D. (2012). An NF-kappaB pathway-mediated positive feedback loop amplifies Ras activity to pathological levels in mice. *J Clin Invest* 122, 1519-1528.

De Duve, C., and Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* 28, 435-492.

Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gelinas, C., Fan, Y., *et al.* (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 10, 51-64.

DeNicola, G.M., Karreth, F.A., Humpton, T.J., Gopinathan, A., Wei, C., Frese, K., Mangal, D., Yu, K.H., Yeo, C.J., Calhoun, E.S., *et al.* (2011). Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* 475, 106-109.

Dice, J.F. (2007). Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 3, 295-299.

Dice, J.F., Terlecky, S.R., Chiang, H.L., Olson, T.S., Isenman, L.D., Short-Russell, S.R., Freundlieb, S., and Terlecky, L.J. (1990). A selective pathway for degradation of cytosolic proteins by lysosomes. *Semin Cell Biol* 1, 449-455.

Dieckmann, T., Withers-Ward, E.S., Jarosinski, M.A., Liu, C.F., Chen, I.S., and Feigon, J. (1998). Structure of a human DNA repair protein UBA domain that interacts with HIV-1 Vpr. *Nat Struct Biol* 5, 1042-1047.

Diradourian, C., Le May, C., Cauzac, M., Girard, J., Burnol, A.F., and Pegorier, J.P. (2008). Involvement of ZIP/p62 in the regulation of PPARalpha transcriptional activity by p38-MAPK. *Biochim Biophys Acta* 1781, 239-244.

Dohi, E., Tanaka, S., Seki, T., Miyagi, T., Hide, I., Takahashi, T., Matsumoto, M., and Sakai, N. (2012). Hypoxic stress activates chaperone-mediated autophagy and modulates neuronal cell survival. *Neurochem Int* 60, 431-442.

Donaldson, K.M., Li, W., Ching, K.A., Batalov, S., Tsai, C.C., and Joazeiro, C.A. (2003). Ubiquitin-mediated sequestration of normal cellular proteins into polyglutamine aggregates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 8892-8897.

Drew, B.A., Burow, M.E., and Beckman, B.S. (2012). MEK5/ERK5 pathway: the first fifteen years. *Biochimica et biophysica acta* 1825, 37-48.

Du, Y., Wooten, M.C., Gearing, M., and Wooten, M.W. (2009). Age-associated oxidative damage to the p62 promoter: implications for Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 46, 492-501.

Duran, A., Amanchy, R., Linares, J.F., Joshi, J., Abu-Baker, S., Porollo, A., Hansen, M., Moscat, J., and Diaz-Meco, M.T. (2011). p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. *Mol Cell* 44, 134-146.

Duran, A., Linares, J.F., Galvez, A.S., Wikenheiser, K., Flores, J.M., Diaz-Meco, M.T., and Moscat, J. (2008). The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell* 13, 343-354.

Duran, A., Serrano, M., Leitges, M., Flores, J.M., Picard, S., Brown, J.P., Moscat, J., and Diaz-Meco, M.T. (2004). The atypical PKC-interacting protein p62 is an important mediator of RANK-activated osteoclastogenesis. *Dev Cell* 6, 303-309.

Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S., Kohnz, R.A., Mair, W., Vasquez, D.S., Joshi, A., Gwinn, D.M., Taylor, R., *et al.* (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 331, 456-461.

Eskelinen, E.L. (2005). Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy* 1, 1-10.

Fader, C.M., Sanchez, D., Furlan, M., and Colombo, M.I. (2008). Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells. *Traffic* 9, 230-250.

Fader, C.M., Sanchez, D.G., Mestre, M.B., and Colombo, M.I. (2009). TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochimica et biophysica acta* 1793, 1901-1916.

Falchetti, A., Di Stefano, M., Marini, F., Ortolani, S., Ulivieri, M.F., Bergui, S., Masi, L., Cepollaro, C., Benucci, M., Di Munno, O., *et al.* (2009). Genetic epidemiology of Paget's disease of bone in Italy: sequestosome1/p62 gene mutational test and haplotype analysis at 5q35 in a large representative series of sporadic and familial Italian cases of Paget's disease of bone. *Calcif Tissue Int* 84, 20-37.

Fecto, F., Yan, J., Vemula, S.P., Liu, E., Yang, Y., Chen, W., Zheng, J.G., Shi, Y., Siddique, N., Arrat, H., *et al.* (2011). SQSTM1 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 68, 1440-1446.

Filimonenko, M., Isakson, P., Finley, K.D., Anderson, M., Jeong, H., Melia, T.J., Bartlett, B.J., Myers, K.M., Birkeland, H.C., Lamark, T., *et al.* (2010). The selective macroautophagic degradation of aggregated proteins requires the PI3P-binding protein Alfy. *Mol Cell* 38, 265-279.

Fliiss, P.M., Jowers, T.P., Brinkmann, M.M., Holstermann, B., Mack, C., Dickinson, P., Hohenberg, H., Ghazal, P., and Brune, W. (2012). Viral mediated redirection of NEMO/IKKgamma to autophagosomes curtails the inflammatory cascade. *PLoS pathogens* 8, e1002517.

Frankel, L.B., and Lund, A.H. (2012). MicroRNA regulation of autophagy. *Carcinogenesis* 33, 2018-2025.

Funderburk, S.F., Wang, Q.J., and Yue, Z. (2010). The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends Cell Biol* 20, 355-362.

Gal, J., Strom, A.L., Kilty, R., Zhang, F., and Zhu, H. (2007). p62 accumulates and enhances aggregate formation in model systems of familial amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of biological chemistry* *282*, 11068-11077.

Galavotti, S., Bartesaghi, S., Faccenda, D., Shaked-Rabi, M., Sanzone, S., McEvoy, A., Dinsdale, D., Condorelli, F., Brandner, S., Campanella, M., *et al.* (2013). The autophagy-associated factors DRAM1 and p62 regulate cell migration and invasion in glioblastoma stem cells. *Oncogene* *32*, 699-712.

Ganley, I.G., Lam du, H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., and Jiang, X. (2009). ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *The Journal of biological chemistry* *284*, 12297-12305.

Gao, X., Zacharek, A., Salkowski, A., Grignon, D.J., Sakr, W., Porter, A.T., and Honn, K.V. (1995). Loss of heterozygosity of the BRCA1 and other loci on chromosome 17q in human prostate cancer. *Cancer Res* *55*, 1002-1005.

Geetha, T., Seibenhener, M.L., Chen, L., Madura, K., and Wooten, M.W. (2008). p62 serves as a shuttling factor for TrkA interaction with the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* *374*, 33-37.

Geetha, T., and Wooten, M.W. (2002). Structure and functional properties of the ubiquitin binding protein p62. *FEBS letters* *512*, 19-24.

Giatromanolaki, A., Koukourakis, M.I., Koutsopoulos, A., Chloropoulou, P., Liberis, V., and Sivridis, E. (2011). High Beclin 1 expression defines a poor prognosis in endometrial adenocarcinomas. *Gynecol Oncol* *123*, 147-151.

Gibbins, D., Mostowy, S., Jay, F., Schwab, Y., Cossart, P., and Voinnet, O. (2012). Selective autophagy degrades DICER and AGO2 and regulates miRNA activity. *Nature cell biology* *14*, 1314-1321.

Glickman, M.H., and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological reviews* *82*, 373-428.

Goehe, R.W., Di, X., Sharma, K., Bristol, M.L., Henderson, S.C., Valerie, K., Rodier, F., Davalos, A.R., and Gewirtz, D.A. (2012). The autophagy-senescence connection in chemotherapy: must tumor cells (self) eat before they sleep? *J Pharmacol Exp Ther* *343*, 763-778.

Gong, J., Xu, J., Bezanilla, M., van Huizen, R., Derin, R., and Li, M. (1999). Differential stimulation of PKC phosphorylation of potassium channels by ZIP1 and ZIP2. *Science* *285*, 1565-1569.

Goode, A., and Layfield, R. (2010). Recent advances in understanding the molecular basis of Paget disease of bone. *J Clin Pathol* *63*, 199-203.

Gozuacik, D., and Kimchi, A. (2007). Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol* *78*, 217-245.

Guo, J.Y., Chen, H.Y., Mathew, R., Fan, J., Strohecker, A.M., Karsli-Uzunbas, G., Kamphorst, J.J., Chen, G., Lemons, J.M., Karantza, V., *et al.* (2011). Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes & development* *25*, 460-470.

Guo, J.Y., Karsli-Uzunbas, G., Mathew, R., Aisner, S.C., Kamphorst, J.J., Strohecker, A.M., Chen, G., Price, S., Lu, W., Teng, X., *et al.* (2013). Autophagy suppresses progression of K-ras-induced lung tumors to oncocytomas and maintains lipid homeostasis. *Genes & development* *27*, 1447-1461.

Hamai, A., and Codogno, P. (2012). New targets for acetylation in autophagy. *Sci Signal* *5*, pe29.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.

Hirano, M., Nakamura, Y., Saigoh, K., Sakamoto, H., Ueno, S., Isono, C., Miyamoto, K., Akamatsu, M., Mitsui, Y., and Kusunoki, S. (2013). Mutations in the gene encoding p62 in Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* *80*, 458-463.

Hofmann, K., and Bucher, P. (1996). The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. *Trends in biochemical sciences* *21*, 172-173.

Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., *et al.* (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Molecular biology of the cell* *20*, 1981-1991.

Hoyvik, H., Gordon, P.B., Berg, T.O., Stromhaug, P.E., and Seglen, P.O. (1991). Inhibition of autophagic-lysosomal delivery and autophagic lactolysis by asparagine. *The Journal of cell biology* *113*, 1305-1312.

Huang, J., and Manning, B.D. (2009). A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans* *37*, 217-222.

Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., *et al.* (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* *408*, 488-492.

Ichimura, Y., Waguri, S., Sou, Y.S., Kageyama, S., Hasegawa, J., Ishimura, R., Saito, T., Yang, Y., Kouno, T., Fukutomi, T., *et al.* (2013). Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Molecular cell* *51*, 618-631.

Inami, Y., Waguri, S., Sakamoto, A., Kouno, T., Nakada, K., Hino, O., Watanabe, S., Ando, J., Iwadate, M., Yamamoto, M., *et al.* (2011). Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. *The Journal of cell biology* *193*, 275-284.

Inoue, D., Suzuki, T., Mitsuishi, Y., Miki, Y., Suzuki, S., Sugawara, S., Watanabe, M., Sakurada, A., Endo, C., Uruno, A., *et al.* (2012). Accumulation of p62/SQSTM1 is associated with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Sci* *103*, 760-766.

Isakson, P., Lystad, A.H., Breen, K., Koster, G., Stenmark, H., and Simonsen, A. (2013). TRAF6 mediates ubiquitination of KIF23/MKLP1 and is required for midbody ring degradation by selective autophagy. *Autophagy* *9*.

Ishii, T., Yanagawa, T., Kawane, T., Yuki, K., Seita, J., Yoshida, H., and Bannai, S. (1996). Murine peritoneal macrophages induce a novel 60-kDa protein with structural similarity to a tyrosine kinase p56lck-associated protein in response to oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* *226*, 456-460.

Ito, T., Matsui, Y., Ago, T., Ota, K., and Sumimoto, H. (2001). Novel modular domain PB1 recognizes PC motif to mediate functional protein-protein interactions. *EMBO J* *20*, 3938-3946.

Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes & development* *13*, 76-86.

Jahreiss, L., Menzies, F.M., and Rubinsztein, D.C. (2008). The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic* *9*, 574-587.

Jain, A., Lamark, T., Sjøttem, E., Larsen, K.B., Awuh, J.A., Overvatn, A., McMahon, M., Hayes, J.D., and Johansen, T. (2010). p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J Biol Chem* *285*, 22576-22591.

Jin, S., DiPaola, R.S., Mathew, R., and White, E. (2007). Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. *Journal of cell science* *120*, 379-383.

Jin, W., Chang, M., Paul, E.M., Babu, G., Lee, A.J., Reiley, W., Wright, A., Zhang, M., You, J., and Sun, S.C. (2008). Deubiquitinating enzyme CYLD negatively regulates RANK signaling and osteoclastogenesis in mice. *J Clin Invest* *118*, 1858-1866.

Jin, Z., Li, Y., Pitti, R., Lawrence, D., Pham, V.C., Lill, J.R., and Ashkenazi, A. (2009). Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell* *137*, 721-735.

Johansen, T., and Lamark, T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* *7*, 279-296.

Joung, I., Strominger, J.L., and Shin, J. (1996). Molecular cloning of a phosphotyrosine-independent ligand of the p56lck SH2 domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 5991-5995.

Juhasz, G., and Neufeld, T.P. (2006). Autophagy: a forty-year search for a missing membrane source. *PLoS Biol* *4*, e36.

Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.H., Kim, Y.M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M., and Kim, D.H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular biology of the cell* *20*, 1992-2003.

Kaiser, S., Park, Y.K., Franklin, J.L., Halberg, R.B., Yu, M., Jessen, W.J., Freudenberg, J., Chen, X., Haigis, K., Jegga, A.G., *et al.* (2007). Transcriptional recapitulation and subversion of embryonic colon development by mouse colon tumor models and human colon cancer. *Genome Biol* *8*, R131.

Karantza-Wadsworth, V., Patel, S., Kravchuk, O., Chen, G., Mathew, R., Jin, S., and White, E. (2007). Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev* 21, 1621-1635.

Kawai, A., Uchiyama, H., Takano, S., Nakamura, N., and Ohkuma, S. (2007). Autophagosome-lysosome fusion depends on the pH in acidic compartments in CHO cells. *Autophagy* 3, 154-157.

Kawai, K., Saito, A., Sudo, T., and Osada, H. (2008). Specific regulation of cytokine-dependent p38 MAP kinase activation by p62/SQSTM1. *J Biochem* 143, 765-772.

Kerscher, O., Felberbaum, R., and Hochstrasser, M. (2006). Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annual review of cell and developmental biology* 22, 159-180.

Kiffin, R., Christian, C., Knecht, E., and Cuervo, A.M. (2004). Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Molecular biology of the cell* 15, 4829-4840.

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology* 13, 132-141.

Kim, J.E., You, D.J., Lee, C., Ahn, C., Seong, J.Y., and Hwang, J.I. (2010). Suppression of NF-kappaB signaling by KEAP1 regulation of IKKbeta activity through autophagic degradation and inhibition of phosphorylation. *Cell Signal* 22, 1645-1654.

Kirkin, V., McEwan, D.G., Novak, I., and Dikic, I. (2009). A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell* 34, 259-269.

Kitamura, H., Torigoe, T., Asanuma, H., Hisasue, S.I., Suzuki, K., Tsukamoto, T., Satoh, M., and Sato, N. (2006). Cytosolic overexpression of p62 sequestosome 1 in neoplastic prostate tissue. *Histopathology* 48, 157-161.

Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A., Jr., Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., *et al.* (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental cell* 5, 539-545.

Komatsu, M., and Ichimura, Y. (2010). Selective autophagy regulates various cellular functions. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 15, 923-933.

Komatsu, M., Kageyama, S., and Ichimura, Y. (2012). p62/SQSTM1/A170: physiology and pathology. *Pharmacol Res* 66, 457-462.

Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y.S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K.I., *et al.* (2010). The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol* 12, 213-223.

Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y.S., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J., Ezaki, J., Murata, S., *et al.* (2007). Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 131, 1149-1163.

Kon, M., and Cuervo, A.M. (2010). Chaperone-mediated autophagy in health and disease. *FEBS letters* 584, 1399-1404.

Kosaka, K., Mimura, J., Itoh, K., Satoh, T., Shimojo, Y., Kitajima, C., Maruyama, A., Yamamoto, M., and Shirasawa, T. (2010). Role of Nrf2 and p62/ZIP in the neurite outgrowth by carnosic acid in PC12h cells. *J Biochem* 147, 73-81.

Koukourakis, M.I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Pitiakoudis, M., Gatter, K.C., and Harris, A.L. (2010). Beclin 1 over- and underexpression in colorectal cancer: distinct patterns relate to prognosis and tumour hypoxia. *Br J Cancer* 103, 1209-1214.

Kovacs, J.R., Li, C., Yang, Q., Li, G., Garcia, I.G., Ju, S., Roodman, D.G., Windle, J.J., Zhang, X., and Lu, B. (2012). Autophagy promotes T-cell survival through degradation of proteins of the cell death machinery. *Cell Death Differ* 19, 144-152.

Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhiya, T., and Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432, 1032-1036.

Kuusisto, E., Parkkinen, L., and Alafuzoff, I. (2003). Morphogenesis of Lewy bodies: dissimilar incorporation of alpha-synuclein, ubiquitin, and p62. *J Neuropathol Exp Neurol* 62, 1241-1253.

Kuusisto, E., Salminen, A., and Alafuzoff, I. (2001). Ubiquitin-binding protein p62 is present in neuronal and glial inclusions in human tauopathies and synucleinopathies. *Neuroreport* *12*, 2085-2090.

Kwok, C.T., Morris, A., and de Belleruche, J.S. (2013). Sequestosome-1 (SQSTM1) sequence variants in ALS cases in the UK: prevalence and coexistence of SQSTM1 mutations in ALS kindred with PDB. *Eur J Hum Genet*.

Ladoire, S., Chaba, K., Martins, I., Sukkurwala, A.Q., Adjemian, S., Michaud, M., Poirier-Colame, V., Andreiuolo, F., Galluzzi, L., White, E., *et al.* (2012). Immunohistochemical detection of cytoplasmic LC3 puncta in human cancer specimens. *Autophagy* *8*, 1175-1184.

Lamark, T., and Johansen, T. (2012). Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy. *Int J Cell Biol* *2012*, 736905.

Lamark, T., Perander, M., Outzen, H., Kristiansen, K., Overvatn, A., Michaelsen, E., Bjorkoy, G., and Johansen, T. (2003). Interaction codes within the family of mammalian Phox and Bem1p domain-containing proteins. *J Biol Chem* *278*, 34568-34581.

Lan, S.H., Wu, S.Y., Zuchini, R., Lin, X.Z., Su, I.J., Tsai, T.F., Lin, Y.J., Wu, C.T., and Liu, H.S. (2013). Autophagy suppresses tumorigenesis of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma through degradation of miR-224. *Hepatology*.

Laurin, N., Brown, J.P., Morissette, J., and Raymond, V. (2002). Recurrent mutation of the gene encoding sequestosome 1 (SQSTM1/p62) in Paget disease of bone. *Am J Hum Genet* *70*, 1582-1588.

Lee, D.F., Kuo, H.P., Liu, M., Chou, C.K., Xia, W., Du, Y., Shen, J., Chen, C.T., Huo, L., Hsu, M.C., *et al.* (2009). KEAP1 E3 ligase-mediated downregulation of NF-kappaB signaling by targeting IKKbeta. *Molecular cell* *36*, 131-140.

Lee, J.A., Beigneux, A., Ahmad, S.T., Young, S.G., and Gao, F.B. (2007a). ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr Biol* *17*, 1561-1567.

Lee, J.W., Jeong, E.G., Lee, S.H., and Yoo, N.J. (2007b). Somatic mutations of BECN1, an autophagy-related gene, in human cancers. *Apmis* *115*, 750-756.

Lee, S.J., Pfluger, P.T., Kim, J.Y., Nogueiras, R., Duran, A., Pages, G., Pouyssegur, J., Tschop, M.H., Diaz-Meco, M.T., and Moscat, J. (2010). A functional role for the p62-ERK1 axis in the control of energy homeostasis and adipogenesis. *EMBO reports* *11*, 226-232.

Lee, Y.H., Ko, J., Joung, I., Kim, J.H., and Shin, J. (1998). Immediate early response of the p62 gene encoding a non-proteasomal multiubiquitin chain binding protein. *FEBS letters* *438*, 297-300.

Levine, B., and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* *132*, 27-42.

Li, W.W., Li, J., and Bao, J.K. (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci* *69*, 1125-1136.

Liang, C., Feng, P., Ku, B., Dotan, I., Canaani, D., Oh, B.H., and Jung, J.U. (2006). Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nature cell biology* *8*, 688-699.

Liang, C., Lee, J.S., Inn, K.S., Gack, M.U., Li, Q., Roberts, E.A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C., *et al.* (2008). Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nature cell biology* *10*, 776-787.

Liang, J., Shao, S.H., Xu, Z.X., Hennessy, B., Ding, Z., Larrea, M., Kondo, S., Dumont, D.J., Gutterman, J.U., Walker, C.L., *et al.* (2007). The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nature cell biology* *9*, 218-224.

Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* *402*, 672-676.

Lin, S.Y., Li, T.Y., Liu, Q., Zhang, C., Li, X., Chen, Y., Zhang, S.M., Lian, G., Ruan, K., Wang, Z., *et al.* (2012). GSK3-TIP60-ULK1 signaling pathway links growth factor deprivation to autophagy. *Science* *336*, 477-481.

Linares, J.F., Amanchy, R., Greis, K., Diaz-Meco, M.T., and Moscat, J. (2011). Phosphorylation of p62 by cdk1 controls the timely transit of cells through mitosis and tumor cell proliferation. *Mol Cell Biol* *31*, 105-117.

Linares, J.F., Duran, A., Yajima, T., Pasparakis, M., Moscat, J., and Diaz-Meco, M.T. (2013). K63 Polyubiquitination and Activation of mTOR by the p62-TRAF6 Complex in Nutrient-Activated Cells. *Mol Cell* 51, 283-296.

Ling, J., Kang, Y., Zhao, R., Xia, Q., Lee, D.F., Chang, Z., Li, J., Peng, B., Fleming, J.B., Wang, H., *et al.* (2012). KrasG12D-induced IKK2/beta/NF-kappaB activation by IL-1alpha and p62 feedforward loops is required for development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 21, 105-120.

Liu, B., Wen, X., and Cheng, Y. (2013). Survival or death: disequilibrating the oncogenic and tumor suppressive autophagy in cancer. *Cell death & disease* 4, e892.

Liu, J., Qu, W., and Kadiiska, M.B. (2009). Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 238, 209-214.

Lo Re, A.E., Fernandez-Barrena, M.G., Almada, L.L., Mills, L.D., ElSawa, S.F., Lund, G., Ropolo, A., Molejon, M.I., Vaccaro, M.I., and Fernandez-Zapico, M.E. (2012). Novel AKT1-GLI3-VMP1 Pathway Mediates KRAS Oncogene-induced Autophagy in Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry* 287, 25325-25334.

Lock, R., Roy, S., Kenific, C.M., Su, J.S., Salas, E., Ronen, S.M., and Debnath, J. (2011). Autophagy facilitates glycolysis during Ras-mediated oncogenic transformation. *Molecular biology of the cell* 22, 165-178.

Long, J., Gallagher, T.R., Cavey, J.R., Sheppard, P.W., Ralston, S.H., Layfield, R., and Searle, M.S. (2008). Ubiquitin recognition by the ubiquitin-associated domain of p62 involves a novel conformational switch. *The Journal of biological chemistry* 283, 5427-5440.

Lu, C., Chen, J., Xu, H.G., Zhou, X., He, Q., Li, Y.L., Jiang, G., Shan, Y., Xue, B., Zhao, R.X., *et al.* (2013). MIR106B and MIR93 Prevent Removal of Bacteria From Epithelial Cells by Disrupting ATG16L1-Mediated Autophagy. *Gastroenterology*.

Lu, C., Huang, X., Zhang, X., Roensch, K., Cao, Q., Nakayama, K.I., Blazar, B.R., Zeng, Y., and Zhou, X. (2011). miR-221 and miR-155 regulate human dendritic cell development, apoptosis, and IL-12 production through targeting of p27kip1, KPC1, and SOCS-1. *Blood* 117, 4293-4303.

Lum, J.J., Bauer, D.E., Kong, M., Harris, M.H., Li, C., Lindsten, T., and Thompson, C.B. (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120, 237-248.

Ma, L., Tao, Y., Duran, A., Llado, V., Galvez, A., Barger, J.F., Castilla, E.A., Chen, J., Yajima, T., Porollo, A., *et al.* (2013). Control of nutrient stress-induced metabolic reprogramming by PKCzeta in tumorigenesis. *Cell* 152, 599-611.

Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 741-752.

Majeski, A.E., and Dice, J.F. (2004). Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2435-2444.

Mari, M., Griffith, J., Rieter, E., Krishnappa, L., Klionsky, D.J., and Reggiori, F. (2010). An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. *The Journal of cell biology* 190, 1005-1022.

Mariño, G., Salvador-Montoliu, N., Fueyo, A., Knecht, E., Mizushima, N., and Lopez-Otin, C. (2007). Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. *J Biol Chem* 282, 18573-18583.

Mashima, T., Seimiya, H., and Tsuruo, T. (2009). De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. *Br J Cancer* 100, 1369-1372.

Massey, A., Kiffin, R., and Cuervo, A.M. (2004). Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2420-2434.

Massoumi, R. (2010). Ubiquitin chain cleavage: CYLD at work. *Trends in biochemical sciences* 35, 392-399.

Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., and White, E. (2007a). Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 7, 961-967.

Mathew, R., Karp, C.M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H.Y., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., Gelinas, C., *et al.* (2009). Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 137, 1062-1075.

Mathew, R., Kongara, S., Beaudoin, B., Karp, C.M., Bray, K., Degenhardt, K., Chen, G., Jin, S., and White, E. (2007b). Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev* *21*, 1367-1381.

Matsumoto, G., Wada, K., Okuno, M., Kurosawa, M., and Nukina, N. (2011). Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Mol Cell* *44*, 279-289.

Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., Isobe, T., *et al.* (2009). Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nature cell biology* *11*, 385-396.

McEwan, D.G., and Dikic, I. (2011). The Three Musketeers of Autophagy: phosphorylation, ubiquitylation and acetylation. *Trends Cell Biol* *21*, 195-201.

Meenhuis, A., van Veelen, P.A., de Looper, H., van Boxtel, N., van den Berge, I.J., Sun, S.M., Taskesen, E., Stern, P., de Ru, A.H., van Adrichem, A.J., *et al.* (2011). MiR-17/20/93/106 promote hematopoietic cell expansion by targeting sequestosome 1-regulated pathways in mice. *Blood* *118*, 916-925.

Meijer, A.J., and Codogno, P. (2009). Autophagy: regulation and role in disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* *46*, 210-240.

Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2003a). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *Journal of cell science* *116*, 1679-1688.

Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* *451*, 1069-1075.

Mizushima, N., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1999). Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *The EMBO journal* *18*, 3888-3896.

Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Klionsky, D.J., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* *395*, 395-398.

Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhisa, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *The Journal of cell biology* *152*, 657-668.

Mizushima, N., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2003b). Role of the Apg12 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* *35*, 553-561.

Moreau, K., Ravikumar, B., Renna, M., Puri, C., and Rubinsztein, D.C. (2011). Autophagosome precursor maturation requires homotypic fusion. *Cell* *146*, 303-317.

Morissette, J., Laurin, N., and Brown, J.P. (2006). Sequestosome 1: mutation frequencies, haplotypes, and phenotypes in familial Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res* *21 Suppl 2*, P38-44.

Morselli, E., Marino, G., Bennetzen, M.V., Eisenberg, T., Megalou, E., Schroeder, S., Cabrera, S., Benit, P., Rustin, P., Criollo, A., *et al.* (2011). Spermidine and resveratrol induce autophagy by distinct pathways converging on the acetylproteome. *The Journal of cell biology* *192*, 615-629.

Moscat, J., Diaz-Meco, M.T., Albert, A., and Campuzano, S. (2006). Cell signaling and function organized by PB1 domain interactions. *Mol Cell* *23*, 631-640.

Moscat, J., Diaz-Meco, M.T., and Wooten, M.W. (2009). Of the atypical PKCs, Par-4 and p62: recent understandings of the biology and pathology of a PB1-dominated complex. *Cell Death Differ* *16*, 1426-1437.

Mukhopadhyay, D., and Riezman, H. (2007). Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* *315*, 201-205.

Muller, O., Sattler, T., Flotenmeyer, M., Schwarz, H., Plattner, H., and Mayer, A. (2000). Autophagic tubes: vacuolar invaginations involved in lateral membrane sorting and inverse vesicle budding. *The Journal of cell biology* *151*, 519-528.

Muller, T.D., Lee, S.J., Jastroch, M., Kabra, D., Stemmer, K., Aichler, M., Abplanalp, B., Ananthakrishnan, G., Bhardwaj, N., Collins, S., *et al.* (2013). p62 links beta-adrenergic input to mitochondrial function and thermogenesis. *J Clin Invest* *123*, 469-478.

Nair, U., Jotwani, A., Geng, J., Gammoh, N., Richerson, D., Yen, W.L., Griffith, J., Nag, S., Wang, K., Moss, T., *et al.* (2011). SNARE proteins are required for macroautophagy. *Cell* *146*, 290-302.

Nakahira, K., Haspel, J.A., Rathinam, V.A., Lee, S.J., Dolinay, T., Lam, H.C., Englert, J.A., Rabinovitch, M., Cernadas, M., Kim, H.P., *et al.* (2011). Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nature immunology* *12*, 222-230.

Nakamura, K., Kimple, A.J., Siderovski, D.P., and Johnson, G.L. (2010). PB1 domain interaction of p62/sequestosome 1 and MEK3 regulates NF-kappaB activation. *J Biol Chem* *285*, 2077-2089.

Narendra, D.P., and et al., x. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* *8*, e1000298.

Nazio, F., Strappazon, F., Antonioli, M., Bielli, P., Cianfanelli, V., Bordi, M., Gretzmeier, C., Dengjel, J., Piacentini, M., Fimia, G.M., *et al.* (2013). mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nature cell biology* *15*, 406-416.

Niida, M., Tanaka, M., and Kamitani, T. (2010). Downregulation of active IKK beta by Ro52-mediated autophagy. *Mol Immunol* *47*, 2378-2387.

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

O'Donnell, M.A., Perez-Jimenez, E., Oberst, A., Ng, A., Massoumi, R., Xavier, R., Green, D.R., and Ting, A.T. (2011). Caspase 8 inhibits programmed necrosis by processing CYLD. *Nature cell biology* *13*, 1437-1442.

Ohashi, Y., and Munro, S. (2010). Membrane delivery to the yeast autophagosome from the Golgi-endosomal system. *Molecular biology of the cell* *21*, 3998-4008.

Okada, K., Yanagawa, T., Warabi, E., Yamastu, K., Uwayama, J., Takeda, K., Utsunomiya, H., Yoshida, H., Shoda, J., and Ishii, T. (2009). The alpha-glucosidase inhibitor acarbose prevents obesity and simple steatosis in sequestosome 1/A170/p62 deficient mice. *Hepatology* *49*, 490-500.

Okatsu, K., Saisho, K., Shimanuki, M., Nakada, K., Shitara, H., Sou, Y.S., Kimura, M., Sato, S., Hattori, N., Komatsu, M., *et al.* (2010). p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* *15*, 887-900.

Okawa, H., Motohashi, H., Kobayashi, A., Aburatani, H., Kensler, T.W., and Yamamoto, M. (2006). Hepatocyte-specific deletion of the keap1 gene activates Nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* *339*, 79-88.

Okazaki, M., Ito, S., Kawakita, K., Takeshita, S., Kawai, S., Makishima, F., Oda, H., and Kakinuma, A. (1999). Cloning, expression profile, and genomic organization of the mouse STAP/A170 gene. *Genomics* *60*, 87-95.

Olzmann, J.A., and Chin, L.S. (2008). Parkin-mediated K63-linked polyubiquitination: a signal for targeting misfolded proteins to the aggresome-autophagy pathway. *Autophagy* *4*, 85-87.

Orsi, A., Razi, M., Dooley, H.C., Robinson, D., Weston, A.E., Collinson, L.M., and Tooze, S.A. (2012). Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Molecular biology of the cell* *23*, 1860-1873.

Orvedahl, A., Sumpter, R., Jr., Xiao, G., Ng, A., Zou, Z., Tang, Y., Narimatsu, M., Gilpin, C., Sun, Q., Roth, M., *et al.* (2011). Image-based genome-wide siRNA screen identifies selective autophagy factors. *Nature* *480*, 113-117.

Pan, J.A., Fan, Y., Gandhirajan, R.K., Madesh, M., and Zong, W.X. (2013). Hyperactivation of the mammalian degenerin MDEG promotes caspase-8 activation and apoptosis. *J Biol Chem* *288*, 2952-2963.

Pan, J.A., Ullman, E., Dou, Z., and Zong, W.X. (2011). Inhibition of protein degradation induces apoptosis through a microtubule-associated protein 1 light chain 3-mediated activation of caspase-8 at intracellular membranes. *Mol Cell Biol* *31*, 3158-3170.

Pankiv, S., and et al., x. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* *282*, 24131-24145.

Pankiv, S., Lamark, T., Bruun, J.A., Overvatn, A., Bjorkoy, G., and Johansen, T. (2010). Nucleocytoplasmic shuttling of p62/SQSTM1 and its role in recruitment of nuclear polyubiquitinated proteins to promyelocytic leukemia bodies. *J Biol Chem* **285**, 5941-5953.

Park, I., Chung, J., Walsh, C.T., Yun, Y., Strominger, J.L., and Shin, J. (1995). Phosphotyrosine-independent binding of a 62-kDa protein to the src homology 2 (SH2) domain of p56lck and its regulation by phosphorylation of Ser-59 in the lck unique N-terminal region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 12338-12342.

Parkhitko, A., Myachina, F., Morrison, T.A., Hindi, K.M., Auricchio, N., Karbowiczek, M., Wu, J.J., Finkel, T., Kwiatkowski, D.J., Yu, J.J., *et al.* (2011). Tumorigenesis in tuberous sclerosis complex is autophagy and p62/sequestosome 1 (SQSTM1)-dependent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 12455-12460.

Parkinson, N., Ince, P.G., Smith, M.O., Highley, R., Skibinski, G., Andersen, P.M., Morrison, K.E., Pall, H.S., Hardiman, O., Collinge, J., *et al.* (2006). ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). *Neurology* **67**, 1074-1077.

Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **122**, 927-939.

Peng, J., Schwartz, D., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., and Gygi, S.P. (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* **21**, 921-926.

Pikkarainen, M., Hartikainen, P., and Alafuzoff, I. (2008). Neuropathologic features of frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions visualized with ubiquitin-binding protein p62 immunohistochemistry. *J Neuropathol Exp Neurol* **67**, 280-298.

Pikkarainen, M., Hartikainen, P., Soininen, H., and Alafuzoff, I. (2011). Distribution and pattern of pathology in subjects with familial or sporadic late-onset cerebellar ataxia as assessed by p62/sequestosome immunohistochemistry. *Cerebellum* **10**, 720-731.

Ponting, C.P., Ito, T., Moscat, J., Diaz-Meco, M.T., Inagaki, F., and Sumimoto, H. (2002). OPR, PC and AID: all in the PB1 family. *Trends in biochemical sciences* **27**, 10.

Puissant, A., and Auberger, P. (2010). AMPK- and p62/SQSTM1-dependent autophagy mediate resveratrol-induced cell death in chronic myelogenous leukemia. *Autophagy* **6**, 655-657.

Puissant, A., Robert, G., Fenouille, N., Luciano, F., Cassuto, J.P., Raynaud, S., and Auberger, P. (2010). Resveratrol promotes autophagic cell death in chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression and AMPK activation. *Cancer Res* **70**, 1042-1052.

Puls, A., Schmidt, S., Grawe, F., and Stabel, S. (1997). Interaction of protein kinase C zeta with ZIP, a novel protein kinase C-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 6191-6196.

Pursiheimo, J.P., Rantanen, K., Heikkinen, P.T., Johansen, T., and Jaakkola, P.M. (2009). Hypoxia-activated autophagy accelerates degradation of SQSTM1/p62. *Oncogene* **28**, 334-344.

Qiang, L., Wu, C., Ming, M., Viollet, B., and He, Y.Y. (2013). Autophagy controls p38 activation to promote cell survival under genotoxic stress. *J Biol Chem* **288**, 1603-1611.

Qing, G., Yan, P., and Xiao, G. (2006). Hsp90 inhibition results in autophagy-mediated proteasome-independent degradation of I κ B kinase (IKK). *Cell Res* **16**, 895-901.

Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E.L., Mizushima, N., Ohsumi, Y., *et al.* (2003). Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* **112**, 1809-1820.

Raasi, S., Varadan, R., Fushman, D., and Pickart, C.M. (2005). Diverse polyubiquitin interaction properties of ubiquitin-associated domains. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 708-714.

Rabinowitz, J.D., and White, E. (2010). Autophagy and metabolism. *Science* **330**, 1344-1348.

Ramos-Gomez, M., Kwak, M.K., Dolan, P.M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P., and Kensler, T.W. (2001). Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 3410-3415.

Rantanen, K., Pursiheimo, J.P., Hogel, H., Miikkulainen, P., Sundstrom, J., and Jaakkola, P.M. (2013). p62/SQSTM1 regulates cellular oxygen sensing by attenuating PHD3 activity through aggregate sequestration and enhanced degradation. *Journal of cell science* *126*, 1144-1154.

Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J.E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z.W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S., *et al.* (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* *90*, 1383-1435.

Rechsteiner, M., and Rogers, S.W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in biochemical sciences* *21*, 267-271.

Reggiori, F., and Klionsky, D.J. (2002). Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell* *1*, 11-21.

Reinhard, W., Stark, K., Sedlacek, K., Fischer, M., Baessler, A., Neureuther, K., Weber, S., Kaess, B., Wiedmann, S., Mitsching, S., *et al.* (2008). Association between PPARalpha gene polymorphisms and myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)* *115*, 301-308.

Rello-Varona, S., Lissa, D., Shen, S., Niso-Santano, M., Senovilla, L., Marino, G., Vitale, I., Jemaa, M., Harper, F., Pierron, G., *et al.* (2012). Autophagic removal of micronuclei. *Cell Cycle* *11*, 170-176.

Rodriguez, A., Duran, A., Selloum, M., Champy, M.F., Diez-Guerra, F.J., Flores, J.M., Serrano, M., Auwerx, J., Diaz-Meco, M.T., and Moscat, J. (2006). Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62. *Cell Metab* *3*, 211-222.

Rolland, P., Madjd, Z., Durrant, L., Ellis, I.O., Layfield, R., and Spendlove, I. (2007). The ubiquitin-binding protein p62 is expressed in breast cancers showing features of aggressive disease. *Endocr Relat Cancer* *14*, 73-80.

Rubino, E., Rainero, I., Chio, A., Rogaeva, E., Galimberti, D., Fenoglio, P., Grinberg, Y., Isaia, G., Calvo, A., Gentile, S., *et al.* (2012). SQSTM1 mutations in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* *79*, 1556-1562.

Rubinsztein, D.C., Codogno, P., and Levine, B. (2012). Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat Rev Drug Discov* *11*, 709-730.

Rusten, T.E., Vaccari, T., Lindmo, K., Rodahl, L.M., Nezis, I.P., Sem-Jacobsen, C., Wendler, F., Vincent, J.P., Brech, A., Bilder, D., *et al.* (2007). ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy. *Curr Biol* *17*, 1817-1825.

Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C.C., Cannizzo, E.S., Scharf, B., Follenzi, A., Potolicchio, I., Nieves, E., Cuervo, A.M., and Santambrogio, L. (2011). Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Developmental cell* *20*, 131-139.

Saito, A., Kawai, K., Takayama, H., Sudo, T., and Osada, H. (2008). Improvement of photoaffinity SPR imaging platform and determination of the binding site of p62/SQSTM1 to p38 MAP kinase. *Chem Asian J* *3*, 1607-1612.

Saito, H., Inazawa, J., Saito, S., Kasumi, F., Koi, S., Sagae, S., Kudo, R., Saito, J., Noda, K., and Nakamura, Y. (1993). Detailed deletion mapping of chromosome 17q in ovarian and breast cancers: 2-cM region on 17q21.3 often and commonly deleted in tumors. *Cancer Res* *53*, 3382-3385.

Saitoh, T., Fujita, N., Jang, M.H., Uematsu, S., Yang, B.G., Satoh, T., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Komatsu, M., *et al.* (2008). Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature* *456*, 264-268.

Santambrogio, L., and Cuervo, A.M. (2011). Chasing the elusive mammalian microautophagy. *Autophagy* *7*, 652-654.

Sanz, L., Diaz-Meco, M.T., Nakano, H., and Moscat, J. (2000). The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF-kappaB activation by the IL-1-TRAF6 pathway. *The EMBO journal* *19*, 1576-1586.

Satoh, H., Moriguchi, T., Taguchi, K., Takai, J., Maher, J.M., Suzuki, T., Winnard, P.T., Jr., Raman, V., Ebina, M., Nukiwa, T., *et al.* (2010). Nrf2-deficiency creates a responsive microenvironment for metastasis to the lung. *Carcinogenesis* *31*, 1833-1843.

Seibenhener, M.L., Babu, J.R., Geetha, T., Wong, H.C., Krishna, N.R., and Wooten, M.W. (2004). Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Molecular and cellular biology* *24*, 8055-8068.

Seibenhener, M.L., Du, Y., Diaz-Meco, M.T., Moscat, J., Wooten, M.C., and Wooten, M.W. (2013). A role for sequestosome 1/p62 in mitochondrial dynamics, import and genome integrity. *Biochimica et biophysica acta* *1833*, 452-459.

Seibenhener, M.L., Geetha, T., and Wooten, M.W. (2007). Sequestosome 1/p62--more than just a scaffold. *FEBS Lett* *581*, 175-179.

Semenza, G.L. (2010). HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev* *20*, 51-56.

Shelton, P., and Jaiswal, A.K. (2013). The transcription factor NF-E2-related factor 2 (Nrf2): a protooncogene? *Faseb J* *27*, 414-423.

Shi, C.S., and Kehrl, J.H. (2010). Traf6 and A20 differentially regulate TLR4-induced autophagy by affecting the ubiquitination of Beclin 1. *Autophagy* *6*, 986-987.

Shibata, T., Ohta, T., Tong, K.I., Kokubu, A., Odogawa, R., Tsuta, K., Asamura, H., Yamamoto, M., and Hirohashi, S. (2008). Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 13568-13573.

Shimizu, H., Toyoshima, Y., Shiga, A., Yokoseki, A., Arakawa, K., Sekine, Y., Shimohata, T., Ikeuchi, T., Nishizawa, M., Kakita, A., *et al.* (2013). Sporadic ALS with compound heterozygous mutations in the SQSTM1 gene. *Acta Neuropathol* *126*, 453-459.

Shrivastava, S., Raychoudhuri, A., Steele, R., Ray, R., and Ray, R.B. (2011). Knockdown of autophagy enhances the innate immune response in hepatitis C virus-infected hepatocytes. *Hepatology* *53*, 406-414.

Shvets, E., Fass, E., Scherz-Shouval, R., and Elazar, Z. (2008). The N-terminus and Phe52 residue of LC3 recruit p62/SQSTM1 into autophagosomes. *Journal of cell science* *121*, 2685-2695.

Singh, A., Boldin-Adamsky, S., Thimmulappa, R.K., Rath, S.K., Ashush, H., Coulter, J., Blackford, A., Goodman, S.N., Bunz, F., Watson, W.H., *et al.* (2008). RNAi-mediated silencing of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 gene expression in non-small cell lung cancer inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy. *Cancer Res* *68*, 7975-7984.

Singh, K., Matsuyama, S., Drazba, J.A., and Almasan, A. (2012). Autophagy-dependent senescence in response to DNA damage and chronic apoptotic stress. *Autophagy* *8*, 236-251.

Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., and Czaja, M.J. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* *458*, 1131-1135.

Starczynowski, D.T., Lockwood, W.W., Delehouzee, S., Chari, R., Wegrzyn, J., Fuller, M., Tsao, M.S., Lam, S., Gazdar, A.F., Lam, W.L., *et al.* (2011). TRAF6 is an amplified oncogene bridging the RAS and NF-kappaB pathways in human lung cancer. *J Clin Invest* *121*, 4095-4105.

Stephan, J.S., Yeh, Y.Y., Ramachandran, V., Deminoff, S.J., and Herman, P.K. (2009). The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 17049-17054.

Strohecker, A.M., Guo, J.Y., Karsli-Uzunbas, G., Price, S.M., Chen, G.J., Mathew, R., McMahon, M., and White, E. (2013). Autophagy Sustains Mitochondrial Glutamine Metabolism and Growth of BrafV600E-Driven Lung Tumors. *Cancer Discov* *3*, 1272-1285.

Stumptner, C., Fuchsbichler, A., Heid, H., Zatloukal, K., and Denk, H. (2002). Mallory body--a disease-associated type of sequestosome. *Hepatology* *35*, 1053-1062.

Stumptner, C., Heid, H., Fuchsbichler, A., Hauser, H., Mischinger, H.J., Zatloukal, K., and Denk, H. (1999). Analysis of intracytoplasmic hyaline bodies in a hepatocellular carcinoma. Demonstration of p62 as major constituent. *The American journal of pathology* *154*, 1701-1710.

Sudo, T., Maruyama, M., and Osada, H. (2000). p62 functions as a p38 MAP kinase regulator. *Biochem Biophys Res Commun* *269*, 521-525.

Sugimoto, R., Warabi, E., Katayanagi, S., Sakai, S., Uwayama, J., Yanagawa, T., Watanabe, A., Harada, H., Kitamura, K., Noguchi, N., *et al.* (2010). Enhanced neointimal hyperplasia and carotid artery remodelling in sequestosome 1 deficient mice. *Journal of cellular and molecular medicine* *14*, 1546-1554.

Sumimoto, H., Kamakura, S., and Ito, T. (2007). Structure and function of the PB1 domain, a protein interaction module conserved in animals, fungi, amoebas, and plants. *Sci STKE* 2007, re6.

Sun, L., and Chen, Z.J. (2004). The novel functions of ubiquitination in signaling. *Current opinion in cell biology* 16, 119-126.

Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cualing, H.D., Sun, M., Sato, Y., Liang, C., Jung, J.U., Cheng, J.Q., Mulé, J.J., *et al.* (2007). Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 9, 1142-1151.

Takamura, A., Komatsu, M., Hara, T., Sakamoto, A., Kishi, C., Waguri, S., Eishi, Y., Hino, O., Tanaka, K., and Mizushima, N. (2011). Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev* 25, 795-800.

Tang, B., Li, N., Gu, J., Zhuang, Y., Li, Q., Wang, H.G., Fang, Y., Yu, B., Zhang, J.Y., Xie, Q.H., *et al.* (2012). Compromised autophagy by MIR30B benefits the intracellular survival of *Helicobacter pylori*. *Autophagy* 8, 1045-1057.

Teter, S.A., Eggerton, K.P., Scott, S.V., Kim, J., Fischer, A.M., and Klionsky, D.J. (2001). Degradation of lipid vesicles in the yeast vacuole requires function of Cvt17, a putative lipase. *The Journal of biological chemistry* 276, 2083-2087.

Teyssou, E., Takeda, T., Lebon, V., Boillee, S., Doukoure, B., Bataillon, G., Sazdovitch, V., Cazeneuve, C., Meininger, V., LeGuern, E., *et al.* (2013). Mutations in SQSTM1 encoding p62 in amyotrophic lateral sclerosis: genetics and neuropathology. *Acta Neuropathol* 125, 511-522.

Thompson, H.G., Harris, J.W., Wold, B.J., Lin, F., and Brody, J.P. (2003). p62 overexpression in breast tumors and regulation by prostate-derived Ets factor in breast cancer cells. *Oncogene* 22, 2322-2333.

Thu Nguyen, H.T., Dalmasso, G., Muller, S., Carriere, J., Seibold, F., and Darfeuille-Michaud, A. (2013). Crohn's Disease-associated Adherent Invasive *Escherichia coli* Affect Levels of microRNAs in Intestinal Epithelial Cells to Reduce Autophagy. *Gastroenterology*.

Thurston, T.L., Ryzhakov, G., Bloor, S., von Muhlinen, N., and Randow, F. (2009). The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat Immunol* 10, 1215-1221.

Turchi, L., Aberdam, E., Mazure, N., Pouyssegur, J., Deckert, M., Kitajima, S., Aberdam, D., and Virolle, T. (2008). Hif-2alpha mediates UV-induced apoptosis through a novel ATF3-dependent death pathway. *Cell death and differentiation* 15, 1472-1480.

Vadlamudi, R.K., Joung, I., Strominger, J.L., and Shin, J. (1996). p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins. *The Journal of biological chemistry* 271, 20235-20237.

Vadlamudi, R.K., and Shin, J. (1998). Genomic structure and promoter analysis of the p62 gene encoding a non-proteasomal multiubiquitin chain binding protein. *FEBS letters* 435, 138-142.

Van Laethem, A., Van Kelst, S., Lippens, S., Declercq, W., Vandenabeele, P., Janssens, S., Vandenheede, J.R., Garmyn, M., and Agostinis, P. (2004). Activation of p38 MAPK is required for Bax translocation to mitochondria, cytochrome c release and apoptosis induced by UVB irradiation in human keratinocytes. *Faseb J* 18, 1946-1948.

Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029-1033.

von Muhlinen, N., Thurston, T., Ryzhakov, G., Bloor, S., and Randow, F. (2010). NDP52, a novel autophagy receptor for ubiquitin-decorated cytosolic bacteria. *Autophagy* 6, 288-289.

Wang, K., and Klionsky, D.J. (2011). Mitochondria removal by autophagy. *Autophagy* 7, 297-300.

Wang, R.C., Wei, Y., An, Z., Zou, Z., Xiao, G., Bhagat, G., White, M., Reichelt, J., and Levine, B. (2012). Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science* 338, 956-959.

Wei, H., Wei, S., Gan, B., Peng, X., Zou, W., and Guan, J.L. (2011). Suppression of autophagy by FIP200 deletion inhibits mammary tumorigenesis. *Genes & development* 25, 1510-1527.

White, E. (2012). Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nature reviews Cancer* 12, 401-410.

White, E., and DiPaola, R.S. (2009). The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res* 15, 5308-5316.

Wild, P., Farhan, H., McEwan, D.G., Wagner, S., Rogov, V.V., Brady, N.R., Richter, B., Korac, J., Waidmann, O., Choudhary, C., *et al.* (2011). Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. *Science* 333, 228-233.

Wilkinson, C.R., Seeger, M., Hartmann-Petersen, R., Stone, M., Wallace, M., Semple, C., and Gordon, C. (2001). Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nature cell biology* 3, 939-943.

Wilson, M.I., Gill, D.J., Perisic, O., Quinn, M.T., and Williams, R.L. (2003). PB1 domain-mediated heterodimerization in NADPH oxidase and signaling complexes of atypical protein kinase C with Par6 and p62. *Molecular cell* 12, 39-50.

Wooten, M.W., Geetha, T., Babu, J.R., Seibenhener, M.L., Peng, J., Cox, N., Diaz-Meco, M.T., and Moscat, J. (2008). Essential role of sequestosome 1/p62 in regulating accumulation of Lys63-ubiquitinated proteins. *The Journal of biological chemistry* 283, 6783-6789.

Wooten, M.W., Geetha, T., Seibenhener, M.L., Babu, J.R., Diaz-Meco, M.T., and Moscat, J. (2005). The p62 scaffold regulates nerve growth factor-induced NF-kappaB activation by influencing TRAF6 polyubiquitination. *The Journal of biological chemistry* 280, 35625-35629.

Wooten, M.W., Seibenhener, M.L., Mamidipudi, V., Diaz-Meco, M.T., Barker, P.A., and Moscat, J. (2001). The atypical protein kinase C-interacting protein p62 is a scaffold for NF-kappaB activation by nerve growth factor. *The Journal of biological chemistry* 276, 7709-7712.

Xie, Z., and Klionsky, D.J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature cell biology* 9, 1102-1109.

Xu, J., Reumers, J., Couceiro, J.R., De Smet, F., Gallardo, R., Rudyak, S., Cornelis, A., Rozenski, J., Zwolinska, A., Marine, J.C., *et al.* (2011a). Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nat Chem Biol* 7, 285-295.

Xu, P., Das, M., Reilly, J., and Davis, R.J. (2011b). JNK regulates FoxO-dependent autophagy in neurons. *Genes & development* 25, 310-322.

Xue, J., Wang, S., Wu, J., Hannafon, B.N., and Ding, W.Q. (2013). Zinc at sub-cytotoxic concentrations induces heme oxygenase-1 expression in human cancer cells. *Cell Physiol Biochem* 32, 100-110.

Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R., and Tashiro, Y. (1998). Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct* 23, 33-42.

Yang, S., Wang, X., Contino, G., Liesa, M., Sahin, E., Ying, H., Bause, A., Li, Y., Stommel, J.M., Dell'antonio, G., *et al.* (2011). Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes & development* 25, 717-729.

Yang, W.L., Wang, J., Chan, C.H., Lee, S.W., Campos, A.D., Lamothe, B., Hur, L., Grabiner, B.C., Lin, X., Darnay, B.G., *et al.* (2009). The E3 ligase TRAF6 regulates Akt ubiquitination and activation. *Science* 325, 1134-1138.

Yang, Z., Huang, J., Geng, J., Nair, U., and Klionsky, D.J. (2006). Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Molecular biology of the cell* 17, 5094-5104.

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

Young, M.M., Takahashi, Y., Khan, O., Park, S., Hori, T., Yun, J., Sharma, A.K., Amin, S., Hu, C.D., Zhang, J., *et al.* (2012). Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *J Biol Chem* 287, 12455-12468.

Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A.J., and Heintz, N. (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 15077-15082.

Zatloukal, K., Stumptner, C., Fuchsbichler, A., Heid, H., Schnoelzer, M., Kenner, L., Kleinert, R., Prinz, M., Aguzzi, A., and Denk, H. (2002). p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am J Pathol* 160, 255-263.

Zhai, Z., Wu, F., Chuang, A.Y., and Kwon, J.H. (2013). miR-106b fine tunes ATG16L1 expression and autophagic activity in intestinal epithelial HCT116 cells. *Inflamm Bowel Dis* 19, 2295-2301.

Zhang, D.D., Lo, S.C., Cross, J.V., Templeton, D.J., and Hannink, M. (2004). Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Molecular and cellular biology* 24, 10941-10953.

Zhang, H., Cicchetti, G., Onda, H., Koon, H.B., Asrican, K., Bajraszewski, N., Vazquez, F., Carpenter, C.L., and Kwiatkowski, D.J. (2003). Loss of Tsc1/Tsc2 activates mTOR and disrupts PI3K-Akt signaling through downregulation of PDGFR. *J Clin Invest* 112, 1223-1233.

Zhang, H., Gao, P., Fukuda, R., Kumar, G., Krishnamachary, B., Zeller, K.I., Dang, C.V., and Semenza, G.L. (2007). HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* 11, 407-420.

Zhang, Y.B., Gong, J.L., Xing, T.Y., Zheng, S.P., and Ding, W. (2013). Autophagy protein p62/SQSTM1 is involved in HAMLET-induced cell death by modulating apoptosis in U87MG cells. *Cell death & disease* 4, e550.

Zheng, B., Jeong, J.H., Asara, J.M., Yuan, Y.Y., Granter, S.R., Chin, L., and Cantley, L.C. (2009). Oncogenic B-RAF negatively regulates the tumor suppressor LKB1 to promote melanoma cell proliferation. *Molecular cell* 33, 237-247.

Zhong, Y., Wang, Q.J., Li, X., Yan, Y., Backer, J.M., Chait, B.T., Heintz, N., and Yue, Z. (2009). Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nature cell biology* 11, 468-476.

Zong, Z.H., Du, Z.X., Li, N., Li, C., Zhang, Q., Liu, B.Q., Guan, Y., and Wang, H.Q. (2012). Implication of Nrf2 and ATF4 in differential induction of CHOP by proteasome inhibition in thyroid cancer cells. *Biochimica et biophysica acta* 1823, 1395-1404.

Zou, X., Feng, Z., Li, Y., Wang, Y., Wertz, K., Weber, P., Fu, Y., and Liu, J. (2012). Stimulation of GSH synthesis to prevent oxidative stress-induced apoptosis by hydroxytyrosol in human retinal pigment epithelial cells: activation of Nrf2 and JNK-p62/SQSTM1 pathways. *J Nutr Biochem* 23, 994-1006.

RESUME

Malgré les avancées récentes, le **cancer** reste la première cause de mortalité en France avec ~ 150000 décès recensés par an (INCa 2012). Notamment, le cancer broncho-pulmonaire est l'un des plus agressifs, avec 29100 décès en 2011. La survie à cinq ans de seulement 10% des patients atteints des **cancers du poumon non à petites cellules** (NSCLC, 80% des cancers bronchiques), pose un problème d'ordre scientifique, médical et de santé publique. Il est communément admis qu'une sous-population de la tumeur acquiert en raison d'une instabilité génétique de nouvelles propriétés agressives nécessaires à sa dissémination, sa prolifération et une plus grande résistance aux chimiothérapies. Une meilleure compréhension de ces **propriétés tumorales** constitue un enjeu majeur pour prévenir à terme cette progression maligne.

Nous avons axé notre recherche sur la **macro-autophagie**, un processus catabolique lysosomal essentiel à l'homéostasie cellulaire et sur un de ses substrats **SQSTM1** (séquestosome ou p62). Au moment où j'ai initié ma thèse, une relation étroite entre l'autophagie, SQSTM1 et la **progression tumorale** venait d'être mise en lumière. Plusieurs membres de la machinerie autophagique sont fréquemment mutés/déletés dans les cancers. De façon paradoxale, l'autophagie peut également permettre la survie des cellules tumorales face à l'hypoxie, la carence nutritionnelle ou les chimiothérapies. Comment comprendre ces fonctions opposées avec les seuls substrats de l'autophagie connus alors, limités aux protéines à demi-vie longue, aux organelles endommagées et à une plateforme de signalisation SQSTM1, aux fonctions encore peu connues ? Fait marquant, SQSTM1 est indispensable à l'oncogénèse induite par RasV12 (Duran A et al, Cancer Cell 2008). Ainsi **SQSTM1** serait un nouvel **acteur pro-oncogénique** et l'autophagie préviendrait le développement tumoral en le dégradant (Mathew R et al, Cell 2009). Cependant à ce jour, cibler l'autophagie ou SQSTM1 comme stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses n'a pas encore rencontré le succès espéré, certainement car nous ne disposons pas d'informations claires quant à leur fonction dans le cancer.

L'objectif de ma thèse était donc de clarifier les **fonctions pro-tumorales** et **anti-tumorales** de l'**autophagie** en identifiant les substrats qu'elle dégrade, et de définir les fonctions pro-tumorales de SQSTM1.

Pour aborder ces questions, notre stratégie a été de combiner des approches cellulaires, moléculaires, *in silico* et *ex vivo* complémentaires. Nous avons bloqué le processus autophagique à l'étape de dégradation afin d'accumuler et d'**identifier ses substrats**. En parallèle, nous avons généré des lignées tumorales (cancer du poumon, mélanomes et gliomes) déplétées en ATG5, ATG7 et SQSTM1 afin de définir leur **protéome**. Tous les résultats obtenus ont été validés sur des **cohortes** des patients atteints du cancer du **poumon**, des **mélanomes**, et des **gliomes** qui sont les cancers les plus agressifs et pour lesquels il n'y a aucun traitement efficace (tumorothèque, biopuces, et analyse *in silico*).

Ainsi nous sommes les premiers à mettre en évidence

- 1) qu'il existe deux types d'autophagie qui dégradent des substrats différents et assurent des fonctions différentes. En dégradant les protéines polyubiquitinées sur K63, l'autophagie constitutive serait une voie essentielle à la répression de l'ubiquitination sur K63, un signal d'activation de la voie NFκB, de la survie et de la prolifération cellulaires, et de l'inflammation, en relation avec la fonction suppresseur de tumeur. Fait marquant, seule l'autophagie constitutive est inactivée sous l'influence du carcinogène environnemental Cadmium, confortant sa fonction suppresseur de tumeur.
- 2) Parmi ces substrats, nous avons mis en évidence que l'**autophagie constitutive** est un « gardien du génome », qui limite dans le temps et l'espace l'activation de **RhoA**. RhoA une fois active est ubiquitinée, se lie à SQSTM1 et est ainsi adressée à l'autophagie. Un défaut d'autophagie sélective (quel que soit sa nature) dérégule toutes les réponses cellulaires en aval de RHOA conduisant à un défaut de **cytokinèse** et à une **instabilité génomique**.
- 3) En accord avec ce scénario, nous avons démontré que l'**autophagie-dépendante** de **SQSTM1** est essentielle au maintien du bon niveau de **RHOA** au niveau du **lamellipode**, permettant ainsi la **migration** cellulaire.
- 4) Faits marquants, l'activité de l'**autophagie** est **inhibée** dans 80 % des **stades III des cancers du poumon** (NSCLC, tumorothèque). Les défauts observés sont là encore des défauts de dégradation et de localisation de RHOA, associés à un caractère plus **invasif** et une plus grande **instabilité génomique** des cancers.
- 5) Nous proposons de ce fait le terme "**signalphagie**" à ce type de macro-autophagie qui dégrade et donc maintient le bon niveau de molécules de signalisation active, expliquant en partie la fonction suppresseur de tumeur.
- 6) Bien au-delà de RHOA, l'analyse du protéome a révélé de façon inattendue que le **SQSTM1** orchestre la progression tumorale en régulant 9 des 10 caractéristiques fondamentales de la tumorigénèse (Hanahan D, Weinberg RA. Cell 2011). Le **mécanisme moléculaire** sous-jacent fait l'objet d'un dépôt de **brevet** en partenariat avec l'**Inserm Transfert**.

Ainsi l'ensemble de ces résultats identifie plusieurs substrats et mécanismes par lesquels l'autophagie constitutive est suppresseur de tumeur. Plus important encore, cette thèse met en évidence le rôle majeur de SQSTM1 dans la médiation de l'oncogénèse ainsi que ses intérêts cliniques en tant que marqueur et cible thérapeutique.